



**EVALUACIÓN DE ALTERACIONES EN LAS FUNCIONES
EJECUTIVAS DADAS POR LA SOBREEXPRESIÓN DE EAAT3
EN MODELO DE RATÓN.**

**Tesis entregada a la
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
En cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de
Doctor en Ciencias con Mención en Neurociencias**

**Facultad de ciencias
Por
Francisca Henríquez Belmar
Octubre 2023
Dirigida por: Dr. Pablo Moya
Co-Dirigida por: Dr. Andrés Chávez**

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO**

**Se informa a la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por:
FRANCISCA HENRÍQUEZ BELMAR**

**Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para
optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Neurociencia, en el examen
de Defensa de Tesis rendido el día del Mes dede 2023**

Director/a de Tesis:

Dr. Pablo R. Moya

Co-Director/a de Tesis:

Dr. Andrés E. Chávez

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. María Estela Andrés

Dr. Marco Fuenzalida

Dr. Javier Bravo

INDICE

EVALUACIÓN DE ALTERACIONES EN LAS FUNCIONES EJECUTIVAS DADAS POR LA SOBREEXPRESIÓN DE EAAT3 EN MODELO DE RATÓN.....	1
INDICE	3
INDICE DE FIGURAS	5
INDICE DE TABLAS	7
ABREVIATURAS.....	8
RESUMEN	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1 FUNCIONES EJECUTIVAS.....	11
1.1.1 Control Inhibitorio	12
1.1.2 Memoria de trabajo.....	13
1.1.3 Flexibilidad cognitiva.....	14
1.2 DISFUNCIONES EJECUTIVAS	14
1.3 EL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO	15
1.4 EL ROL DEL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EN FUNCIONES EJECUTIVAS.....	18
1.5 DISFUNCIONES EN LA NEUROTRANSMISIÓN GLUTAMATÉRGICA Y EN FUNCIONES EJECUTIVAS EN EL TRASTORNO OBSESIVO-COMPULSIVO	19
1.5.1 Trastorno obsesivo compulsivo	19
1.5.2 Disfunción glutamatérgica asociada a TOC	19
1.5.3 Disfunción ejecutiva en pacientes con TOC.....	20
1.6 RATÓN EAAT3glo/CAMKII COMO MODELO DE ESTUDIO DE DISFUNCIONES EJECUTIVAS	20
1.6.1 El transportador de aminoácidos excitatorios EAAT3.	20
1.6.2 EAAT3 en trastorno obsesivo compulsivo	21
1.6.3 Modelo EAAT3glo/CaMKII	21
1.7 HIPÓTESIS	23
1.8 OBJETIVOS DE LA TESIS	23
1.8.1 Objetivos generales	23
1.8.2 Objetivos específicos	23
2. METODOLOGÍA	24
2.1 ANIMALES.....	24
2.1.1 Generación de animales con sobre expresión de EAAT3 en el cerebro anterior	24
2.2 GENOTIPIFICACIÓN	26
2.2.1 Extracción de DNA genómico	26
2.2.2 PCR convencional	26
2.3 PRUEBAS CONDUCTUALES.....	27
2.3.1 Protocolo de restricción leve de alimento.....	27
2.3.2 Condicionamiento operante.....	27
2.3.3 Condicionamiento operante en cámara operante Bussey-Saksida con pantalla táctil.	30
2.3.3.1 Five choice serial reaction time task (5-CSRTT).	31
2.3.3.2. Trial Unique non-matching to location task (TUNL)	36
2.3.4 Evaluación de flexibilidad cognitiva mediante aprendizaje reverso usando Morris Water maze.....	41

2.3.5 Evaluación de la memoria de trabajo usando la prueba de alternancia espontánea en T-maze.	42
3. RESULTADOS	44
3.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE EAAT3 SOBRE LA ADQUISICIÓN DEL CONDICIONAMIENTO OPERANTE BÁSICO EN RATONES EAAT3 ^{glo} /CAMKII.....	44
3.1.1 Validación del protocolo para adquisición de conducta operante simple.	44
3.1.2. Evaluación de la adquisición de la conducta operante simple en animales EAAT3 ^{glo} /CaMKII.	45
3.2 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE EAAT3 SOBRE LA EXTINCIÓN DEL CONDICIONAMIENTO OPERANTE SIMPLE USANDO ANIMALES EAAT3 ^{glo} /CAMKII	47
3.2.1 Validación del protocolo para Extinción de conducta operante simple.	47
3.2.2. Evaluación de la extinción de la conducta operante simple en animales EAAT3 ^{glo} /CaMKII.	48
3.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE EAAT3 SOBRE LA FLEXIBILIDAD COGNITIVA USANDO ANIMALES EAAT3 ^{glo} /CAMKII.	50
3.3.1 Prueba de aprendizaje reverso del condicionamiento operante simple.....	50
3.3.2 Prueba de aprendizaje reverso visuoespacial utilizando el laberinto acuático de Morris.	54
3.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE EAAT3 SOBRE EL CONTROL INHIBITORIO EN ANIMALES EAAT3 ^{glo} /CAMKII EN EL TEST 5-CSRT.	57
3.4.1. Evaluación de atención y control inhibitorio mediante prueba 5-CSRT estándar en animales EAAT3 ^{glo} /CaMKII.	57
3.4.2 Evaluación del efecto de la duración de estímulo en la prueba 5-CSRT sobre la atención global y sostenida en animales EAAT3 ^{glo} /CaMKII.	59
3.4.3 Evaluación del efecto de la duración del intervalo inter trial (ITI) en la prueba 5-CSRT sobre el control inhibitorio en animales EAAT3 ^{glo} /CaMKII.	61
3.4.3.1 Prueba ITI variable (ITI corto)	61
3.4.3.2 Prueba de ITI variable (ITI Largo).....	64
3.5 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE EAAT3 SOBRE LA MEMORIA DE TRABAJO EN ANIMALES EAAT3 ^{glo} /CAMKII.	65
3.5.1. Evaluación de la memoria de trabajo mediante el uso de la prueba TUNL (Trial Unique Nonmatching to Location).....	65
3.5.2 Evaluación de la memoria de trabajo en animales EAAT3 ^{glo} /CaMKII. Mediante el uso de la prueba de alternancia espontánea en T-maze.....	67
4. DISCUSIÓN	69
4.1 LA SOBREENPRESIÓN DE EAAT3 PRODUCE UN DETERIORO EN EL PROCESO DE EXTINCIÓN DE MEMORIAS.	69
4.2 EL RATÓN EAAT3 ^{glo} /CAMKII COMO MODELO DE ESTUDIO DE FUNCIONES EJECUTIVAS.	72
4.3 USO DEL CONDICIONAMIENTO OPERANTE PARA EL ESTUDIO DE LA DISFUNCIÓN EJECUTIVA.	75
5. CONCLUSIONES	77
6. REFERENCIAS	78

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Funciones ejecutivas y su interrelación.....	13
Figura 2. Principales componentes de la sinapsis glutamatérgica.....	16
Figura 3. Caracterización del vector pCLE-EAAT3.....	25
Figura 4. Esquema de las cruzas necesarias para obtener ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 restringida a neuronas que expresan CaMKII α en el prosencéfalo.....	25
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones obtenidos por PCR convencional..	27
Figura 6. Diagrama del protocolo utilizado para realizar las pruebas de condicionamiento operante básico.....	28
Figura 7. Caja ROBucket para condicionamiento operante.....	28
Figura 8. Esquema de la configuración de Agujeros Activo (CS+), Inactivo (CS-) y centro durante las pruebas de adquisición, extinción y aprendizaje reverso del condicionamiento operante. ...	30
Figura 9. Plataforma de condicionamiento operante Campdent Instruments.....	31
Figura 10. Prueba 5-CSRT.....	35
Figura 11. Prueba TUNL.....	38
Figura 12. Prueba de aprendizaje reverso visoespacial en Morris Water Maze	41
Figura 13. Esquema de laberinto en T utilizado para la prueba de alternancia espontanea.....	42
Figura 14. Diagrama representativo de la prueba de alternancia espontanea en T-maze.....	43
Figura 15. Progresión de la adquisición del condicionamiento operante a través de los días de duración del protocolo en animales WT.....	44
Figura 16. Animales controles (WT) presentan una correcta adquisición del condicionamiento operante.....	45
Figura 17. Comparación en la progresión de la adquisición del condicionamiento operante a través de los días de duración del protocolo entre animales EAAT3 ^{glo} y EAAT3 ^{glo} /CaMKII.....	46
Figura 18. Animales controles EAAT3 ^{glo} y EAAT3 ^{glo} /CAMKII presentan una correcta adquisición del condicionamiento operante.....	46
Figura 19. Progresión temporal de la extinción del condicionamiento operante en animales WT.....	47
Figura 20. Animales control (WT) presentan una correcta extinción del condicionamiento operante.....	48
Figura 21. Progresión temporal de la extinción del condicionamiento operante, comparada entre animales EAAT3 ^{glo} y EAAT3 ^{glo} /CaMKII.....	49
Figura 22. La sobreexpresión de EAAT3 altera la extinción del condicionamiento operante simple.....	50
Figura 23. Sobre expresión de EAAT3 en las neuronas principales del cerebro anterior altera el proceso de aprendizaje reverso del condicionamiento operante simple.....	51
Figura 24. Sobre expresión de EAAT3 en las neuronas principales del cerebro anterior altera el proceso de aprendizaje reverso del condicionamiento operante simple.....	52
Figura 25. La sobreexpresión de EAAT3 no altera el número de respuestas en el centro durante el proceso de aprendizaje reverso del condicionamiento operante.....	53
Figura 26. Animales EAAT3 ^{glo} /CaMKII no presentaron cambios en motivación entre el protocolo de adquisición y aprendizaje reverso.....	54
Figura 27. Animales EAAT3 ^{glo} /CaMKII y EAAT3 ^{glo} adquieren correctamente el aprendizaje visoespacial en Morris water maze.....	55
Figura 28. Animales EAAT3 ^{glo} /CaMKII no revierten aprendizaje visoespacial durante Morris water maze.....	56
Figura 29. Animales EAAT3 ^{glo} y EAAT3 ^{glo} /CaMKII no muestran diferencias en motivación durante la prueba 5-CSRT estándar.....	58
Figura 30. Animales EAAT3 ^{glo} y EAAT3 ^{glo} /CaMKII no muestran alteraciones en atención durante la prueba 5-CSRT standard.....	58
Figura 31. Animales EAAT3 ^{glo} y EAAT3 ^{glo} /CaMKII no muestran cambios significativos en control inhibitorio durante la prueba 5-CSRT standard.....	59

Figura 32. Animales EAAT3 ^{glo} y EAAT3 ^{glo} /CaMKII no muestran diferencias significativas en porcentaje de precisión de respuesta durante la prueba 5-CSRT de un día con duración de estímulo variable.....	60
Figura 33. Animales EAAT3 ^{glo} /CaMKII no muestran alteraciones en atención durante prueba de un día de ITI variable (ITI corto)	62
Figura 34. Animales EAAT3 ^{glo} /CaMKII no muestran cambios en control inhibitorio comparado a animales EAAT3 ^{glo} en prueba de un día de ITI variable (corto).	63
Figura 35. Animales EAAT3 ^{glo} y EAAT3 ^{glo} /CaMKII no muestran diferencias significativas en número de respuestas prematuras ni perseverativas durante la prueba de un día de duración de ITI variable (largo).....	64
Figura 36 Animales EAAT3 ^{glo} /CaMKII requieren significativamente más sesiones que los animales EAAT3 ^{glo} para alcanzar el criterio de adquisición en las fases de pre entrenamiento para la prueba TUNL.....	66
Figura 37. Animales EAAT3 ^{glo} /CaMKII no adquieren correctamente el aprendizaje necesario para realizar la prueba TUNL.....	67
Figura 38. Sobre expresión de EAAT3 altera el proceso de memoria de trabajo en la prueba de alternancia espontanea en T maze.....	68
Figura 39. Sobre expresión de EAAT3 no altera el proceso de toma de decisiones en la prueba de alternancia espontanea en T-maze.....	68

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: <i>Etapas de la fase de pre-entrenamiento 5-CSRTT</i>	33
Tabla 2: <i>Etapas fase de entrenamiento 5-CSRTT</i>	35
Tabla 3: <i>Fases y sub-fases de la etapa de entrenamiento de la prueba TUNL</i>	39
Tabla 4: <i>Descripción de desafíos cognitivos realizados durante la etapa de prueba TUNL</i>	40

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
5-CSRTT	Five Choice Serial Reaction Time Task
5HT2A	Receptor de Serotonina 2A
5HTT	Transportador de Serotonina
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AMPA	Receptor de AMPA
ANOVA	Análisis de la Varianza
AR	Aprendizaje Reverso
bp	Pares de Base
Ca ⁺⁺	Ion Calcio
CaMKII	Calmodulina kinasa tipo 2
Cl ⁻	Ion Cloro
cm	Centímetro
CS	Estímulo Condicionante
CSTC	Cortico-Estriado-Tálamo-Cortical
D1R	Receptor de Dopamina 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMTP	Delayed matching to position/non-matching to position task
EAAT1-3	Transportador de aminoácidos excitatorios tipo 1-3
EDTA	Ácido Etilendiaminicotetraacético
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genómico
GFP	Green Fluorescent Protein
GluR1-9	Receptor de Glutamato tipo 1-9
gr	Gramo
h	Hora
H ⁺	Protón
ITI	Intervalo Inter Trial
K ⁺	Ion Potasio
KA1-2	Receptor de Kainato tipo 1-2
KO	Receptor de Kainato tipo 1-2+B32
L-AP4	ácido L-2-amino-4-phosphonobutírico
LCD	Liquid Crystal Display
M	Molar
MAO-B	Monoamino Oxidasa tipo B
mGluR1-9	Receptor metabotrópico de Glutamato tipo 1-9

min	Minutos
mL	Mili Litro
mM	Mili Molar
mPFC	Corteza Pre-Frontal Medial
N	Tamaño de Población
Na ⁺	Ion Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMDAR	Receptor NMDA
NR1	subunidad de NMDAR tipo 1
NR2A-D	subunidad de NMDAR tipo 2A-D
NW	Noroeste
OFC	Corteza Orbito Frontal
P	Valor de Probabilidad
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PFC	Corteza Pre-Frontal
rpm	Revoluciones por minuto
SAPAP3	SAP90/PSD95-associated protein 3
SDS	Dodecil Sulfato Sódico
SE	Sureste
sem	Error Estandar de Medición
SERT	Transportador de Serotonina
SLC1A1	Solute Carrier Family 1 Member 1
SNC	Sistema Nervioso Central
SSRI	Inhibidor Selectivo de la recaptura de Serotonina
SW	Suroeste
T-ACDP	ácido 1-amino-cyclopentano-trans-1,3-dicarboxílico
TBE	Tris-Borato-EDTA
TOC	Trastorno Obsesivo Compulsivo
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TUNL	Trial-unique, delayed nonmatching-to-location
uL	Micro Litro
uM	Micro Molar
UV	Ultra Violeta
V	Voltios
VDCC	Voltage-dependent calcium channel
vGLUT	Transportador Vesicular de Glutamato
WT	Wild Tipe (Tipo Salvaje)

RESUMEN

Las funciones ejecutivas (control inhibitorio, memoria de trabajo y flexibilidad cognitiva) corresponden a una serie de operaciones cerebrales necesarias para procesar la información (procesos cognitivos) que coordinan y regulan otros subprocesos cognitivos y conductuales. A partir de ellas, pueden construirse funciones ejecutivas de alto orden como el razonamiento, la resolución de problemas y la planificación.

Diversos trastornos neuropsiquiátricos presentan alteraciones en las funciones ejecutivas; en particular, en el trastorno obsesivo compulsivo (TOC) se han descrito déficits en el control inhibitorio, flexibilidad cognitiva y memoria de trabajo.

El modelo animal EAAT3^{glo}/CaMKII, que sobre expresa el transportador neuronal de aminoácidos excitatorios EAAT3 presenta, a nivel comportamental, aumentos en conductas compulsivas y ansiosas basales, mientras que a nivel cognitivo presenta déficits en la extinción a largo plazo de la memoria de miedo condicionado. En base a los hallazgos originales, surgió el interés por estudiar posibles alteraciones en funciones ejecutivas en este modelo animal de compulsividad. Para ello, evaluamos la flexibilidad cognitiva, la memoria de trabajo y el control inhibitorio en nuestro modelo EAAT3^{glo}/CaMKII usando pruebas comportamentales de condicionamiento operante y aprendizaje visuoespacial.

Nuestros resultados demuestran que los animales EAAT3^{glo}/CaMKII presentan disfunciones ejecutivas, específicamente un deterioro en la flexibilidad cognitiva dado por el mal desempeño en la prueba de aprendizaje reverso. Del mismo modo, presenta alteraciones en la memoria de trabajo tanto en tareas de aprendizaje operante como visuoespacial, ya que los animales EAAT3^{glo}/CaMKII no logran alcanzar los criterios mínimos de adquisición para la prueba Trial-unique, delayed nonmatching-to-location (TUNL) ni de alternancia espontánea. Por el contrario, encontramos que este modelo animal no presenta alteraciones en el control inhibitorio en tareas de condicionamiento operante evaluado a través de la prueba 5-choice serial reaction task time(5-CSRT).

Estos hallazgos demuestran que el aumento de expresión de EAAT3 afecta a dominios comportamentales más amplios que los originalmente descritos en este modelo, y que impacta de manera selectiva a algunas, pero no todas las funciones ejecutivas, . De esta manera, nuestros resultados contribuyen a comprender de mejor manera el impacto funcional posee este transportador en el desarrollo de la sintomatología compulsiva, demostrando su rol en tareas ejecutivas como son la flexibilidad cognitiva y la memoria de trabajo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Funciones ejecutivas

Las funciones ejecutivas (también llamadas control cognitivo, o control ejecutivo) se refieren a procesos cognitivos de alto orden los que, al operar sobre procesos mentales de nivel inferior (procesos relacionados con la captación y mantenimiento de la información), son capaces de regular y controlar nuestros pensamientos y comportamientos, permitiéndonos alcanzar objetivos representados internamente (Ambrosini et al 2019). Se definen como una “colección de procesos que incluyen seleccionar, actualizar y planear secuencias motoras; retener y detener acciones; monitorizar y cambiar comportamientos cuando sea apropiado y dividir, cambiar y sostener la atención” (Jurado & Rosselli 2007; Diamond 2013).

A la fecha, se han descrito tres funciones ejecutivas principales:

- (1) La inhibición o control inhibitorio, que se divide en a) el auto-control o inhibición comportamental y b) el control de interferencia, referido a la atención selectiva y la inhibición cognitiva;
- (2) la memoria de trabajo, y
- (3) la flexibilidad cognitiva, también llamada cambio de conjunto o tarea, flexibilidad mental, o cambio de tarea o conjunto mental.

A pesar de describirse de manera separada, la correcta acción de las funciones ejecutivas operan de manera interrelacionada, es decir, dependen unas de otras (Friedman & Robbins, 2022). Es a partir de estas funciones ejecutivas centrales que pueden construirse, entonces, funciones ejecutivas de alto orden tales como el razonamiento, la resolución de problemas y la planificación (Jurado & Rosselli 2007; Diamond 2013; Mar et al 2013; Oomen et al 2013), siendo estas funciones esenciales para la salud física y mental, y el desarrollo social, cognitivo y psicológico (Figura 1). Las funciones ejecutivas tienen muchas similitudes con la distinción entre “respuesta controlada” y “respuesta automática” propuesta en teorías psicológicas de fines de los años 70 acerca del procesamiento de la información (Schneider & Shiffrin 1977), y coincide a grandes rasgos con la distinción de la teoría del aprendizaje entre una respuesta dirigida a un objetivo y una respuesta habitual (Balleine & O’Doherty, 2010). Por tanto, se esperaría que la ausencia de funciones ejecutivas produzca un comportamiento automático; la respuesta controlada, por el contrario, está dirigida a un objetivo y es flexible (Friedman & Robbins, 2022).

1.1.1 Control Inhibitorio

El control inhibitorio consiste en la capacidad de controlar la atención, comportamiento, pensamientos y/o emociones con el fin de anular una fuerte predisposición interna o distracción externa, y en cambio hacer lo que es más apropiado o necesario para el contexto en el que nos encontramos (Diamond, 2013). Sin esta función ejecutiva, nuestro comportamiento quedaría a disposición de nuestros impulsos o respuestas condicionadas. Dentro del control inhibitorio tenemos al control de interferencia y el autocontrol. El control de interferencia hace referencia al control de la atención y nos permite atender selectivamente y poner foco selectivamente a un estímulo de interés mientras suprimimos los otros estímulos externos. Por otra parte, el autocontrol es el dominio del control inhibitorio que se encarga del control de nuestro comportamiento y emociones. En otras palabras, el autocontrol consiste en resistir tentaciones, controlar nuestros impulsos y tener disciplina, con el fin de comportarnos correctamente y alcanzar objetivos (Diamond, 2013).

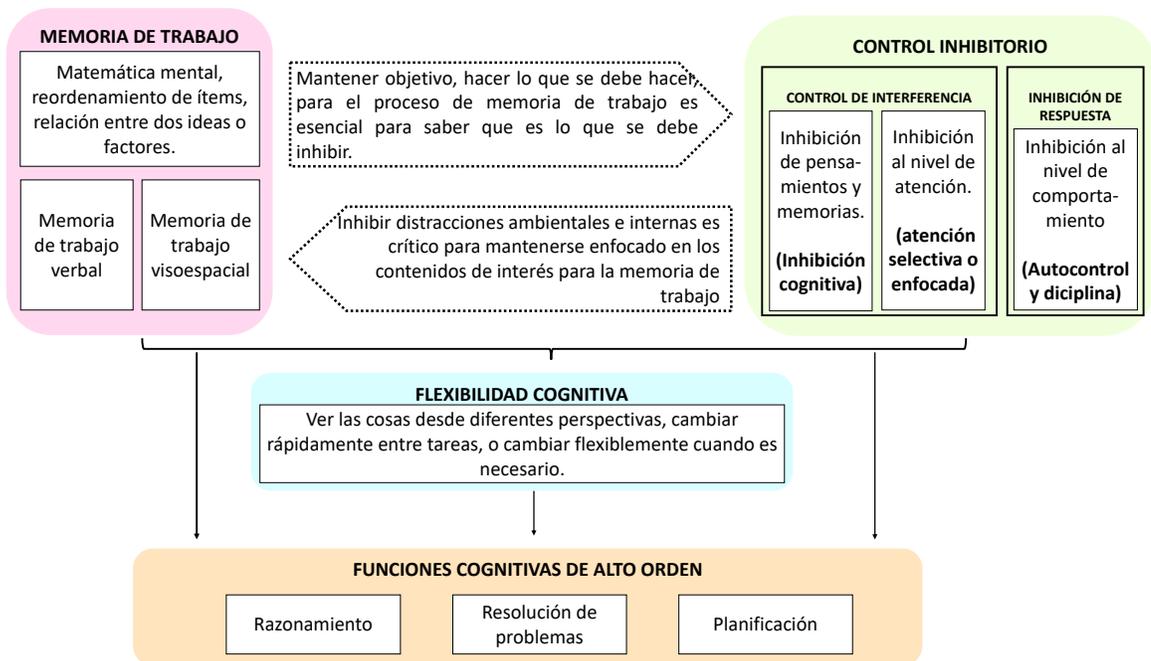


Figura 1. Modelo de funcionamiento de las funciones ejecutivas. El esquema muestra como el control inhibitorio requiere de la memoria de trabajo para su buen funcionamiento y viceversa. Mientras que la flexibilidad cognitiva depende de memoria de trabajo y control inhibitorio. Asimismo, es necesario el correcto funcionamiento de las 3 funciones ejecutivas para dar paso a la aparición de funciones cognitivas de alto orden como el razonamiento, resolución de problemas y planificación, entre otras. (modificada desde *Jurado & Rosselli 2007*)

Diferentes áreas cerebrales han sido involucradas en el proceso del control inhibitorio, incluyendo la vía corteza prefrontal-estriado (PFC-Striatum) involucrada en procesos de autocontrol (Eagle & Robbins 2003; Zhuang et al 2021). El hipocampo es otra área cerebral involucrada en el control de interferencia, controlando la aparición de pensamientos intrusivos (Shmitz et al 2017). Se ha descrito también que el cerebelo estaría asociado a la regulación de la atención y el control inhibitorio en tareas “Go/Not Go” (Mannarelli et al 2020), así como la vía participación de la víaínsula-ganglios basales, que estaría asociada al desarrollo del control inhibitorio en el caso de niños (Cai et al 2019) y de que, evidenciando que no es solo un área o circuito en específico el que se encuentra involucrado en este proceso.

1.1.2 Memoria de trabajo

La memoria de trabajo es el proceso encargado de retener información y trabajar mentalmente con ella (trabajar con información no presente perceptualmente). Esta función es indispensable para darle sentido a cualquier evento que haya que seguir a través del tiempo, para lo cual es necesario retener lo que pasó anteriormente y relacionarlo con lo que viene después (Diamond 2013).

La memoria de trabajo puede ser subdividida en tres funciones o componentes: a) el componente ejecutivo central, que se propone que es un sistema de control de la atención, importante en habilidades como el ajedrez y es particularmente susceptible a los efectos de la enfermedad de Alzheimer; (b) el bloc de dibujo visuoespacial, que manipula imágenes visuales y (c) el bucle fonológico, que almacena y ensaya información basada en el habla y es necesario para la adquisición del vocabulario nativo y del segundo idioma (Baddeley, 1992).

Se ha propuesto que, durante ciertas instancias, el control inhibitorio y la memoria de trabajo dependen el uno del otro y ocurren simultáneamente, por ejemplo, cuando debes actuar en contra de tu voluntad en base de la información que tienes en mente.

En cuanto a los sustratos anatómicos involucrados en la memoria de trabajo, se ha observado que la corteza prefrontal tiene un papel muy importante en el proceso de memoria de trabajo, pero no es la única área que se encuentra involucrada en este proceso. Por ejemplo, se ha descrito que el núcleo talámico anterior, más específicamente su subdivisión antero ventral se encuentra involucrada en este proceso (Roy et al 2022). Importantly se demostró que las fibras del tálamo involucradas en la memoria de trabajo proyectan hacia la corteza entorrinal del hipocampo, pasando por el parasubiculum (Roy et al 2022). En este sentido, se ha reportado que la memoria de trabajo espacial requiere tanto la codificación de información relevante para la tarea en el momento apropiado y posteriormente la recuperación de esa información en el

momento exacto en que se necesita, procesos para los cuales la vía corteza prefrontal (PFC)-tálamo-hipocampo es clave (Griffin 2021).

1.1.3 Flexibilidad cognitiva.

La flexibilidad cognitiva es una función que se construye a partir de la memoria de trabajo y el control inhibitorio y, dada su complejidad, aparece mucho más tarde en el desarrollo. Esta función nos permite cambiar perspectivas espacial o interpersonalmente, para lo cual necesitamos inhibir o “desactivar” la antigua perspectiva y cargar en nuestra memoria de trabajo o “activar” una perspectiva diferente. Es en este sentido entonces, que la flexibilidad cognitiva depende activamente de la memoria de trabajo y el control inhibitorio.

La flexibilidad cognitiva es indispensable para ajustarse a demandas o prioridades cambiantes, admitir una equivocación, aprovechar las oportunidades repentinas e inesperadas, entre otras (Diamond, 2013). En cuanto a las áreas cerebrales involucradas en este proceso, estudios en humanos destacan la importancia de PFC (Yun et al, 2017) y del hipocampo (Vilá-Balló et al 2017) en el correcto rendimiento de los individuos en pruebas de aprendizaje reverso.

1.2 Disfunciones ejecutivas

Dado que las funciones ejecutivas son críticas para la adaptación al entorno, la resolución de problemas y el alcance de metas, y que alteraciones en ellas impactan severamente en funciones y actividades necesarias para el diario vivir, no es sorprendente que diversos trastornos neuropsiquiátricos presenten alteraciones en estos procesos cognitivos (Mar et al 2013; Elliot 2003; Rabinovici et al, 2015).

Estudios de neuroimagen han reportado que la funcionalidad ejecutiva depende de redes neuronales distribuidas principalmente en la corteza prefrontal, pero también pueden comprometer la corteza parietal, los ganglios basales, tálamo, hipotálamo, hipocampo y cerebelo dado que se ha observado la activación de estas regiones en paradigmas que involucran la memoria de trabajo, cambio de set, inhibición de respuesta, fluidez, planificación y respuesta anticipatoria (Rabinovici et al, 2015; Dolleman-Van Der Well et al 2019; Vilá-Valló et al 2017). Por lo tanto, la disfunción ejecutiva puede surgir de cualquier proceso neurológico que involucre estas regiones, sus conexiones o sistemas de neurotransmisores (Rabinovici et al, 2015).

Diversos estudios clínicos han descrito disfunciones ejecutivas en esquizofrenia, trastorno de déficit atencional con hiperactividad, trastorno de depresión mayor y trastorno obsesivo compulsivo (TOC), entre, otras patologías en las que dichas áreas han sido implicadas (Mar et al 2013; Elliot 2003). En particular, para el caso del TOC, se han descrito déficits en control inhibitorio (Penades et al 2006; Mirabella 2020), flexibilidad cognitiva (Yun et al, 2017) y memoria

de trabajo. Por ejemplo, pruebas cognitivas realizadas en pacientes con TOC han reportado que, en comparación con controles, individuos afectados con TOC obtienen peores puntuaciones en pruebas relacionadas a flexibilidad cognitiva, y que dichas alteraciones que no se ven atenuadas con el uso de medicamentos (Rosa-Alcazar et al 2019). Del mismo modo, pruebas cognitivas realizadas a pacientes con TOC arrojaron alteraciones de la inhibición selectiva de sus respuestas motoras y en la inhibición de la interferencia cognitiva (Penades et al 2006). Junto con esto, Macini y cols reportaron que en niños/adolescentes con TOC, tanto la inhibición reactiva como la proactiva estaban alteradas (Macini et al 2018) dando cuenta de déficits en control inhibitorio asociados a TOC (Penades et al 2006; Macini et al 2018; Mirabella 2020). En cuanto a la memoria de trabajo, un estudio en pacientes con TOC mediante el uso de una batería de pruebas neurofisiológicas combinadas con métodos de imagen funcional (fMRI) demostró la existencia de un déficit en memoria de trabajo asociado a una sobreactivación cortical en pacientes comparados con un grupo control, siendo los pacientes con obsesiones y comprobación excesiva los que mostraban una mayor severidad en las alteraciones (Nakao et al 2009). Esto se vio reafirmado por un meta-análisis realizado por Abramovitch y cols., donde describen la presencia de alteraciones en memoria de trabajo visoespacial, no verbal y verbal en pacientes con TOC (Abramovitch et al 2013),

1.3 El sistema glutamatérgico

Uno de los sistemas de neurotransmisores que participan en los circuitos implicados en funciones ejecutivas es el glutamato, y además, la evidencia sugiere que existen alteraciones en la transmisión glutamatérgica en diversas patologías, incluyendo el TOC (O'Donovan et al 2017; Farber et al 1998; Danbolt 2001).

El aminoácido L-glutamato es el mayor mediador de señales excitatorias en el sistema nervioso central (SNC) de mamíferos, y está involucrado en una serie de funciones cerebrales incluyendo cognición, memoria y aprendizaje. Además, está involucrado en procesos del desarrollo del SNC, tales como inducción de sinapsis y migración, diferenciación y muerte celular, siendo uno de los componentes claves en el metabolismo celular (Danbolt, 2001). Es producido como derivado del ciclo de Krebs. Las neuronas glutamatérgicas participan en todos los circuitos presentes en el SNC adulto (Pittenger et al., 2011).

El glutamato se encuentra empaquetado en vesículas sinápticas que contienen transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT). Su liberación desde las neuronas glutamatérgicas, ocurre generalmente por la entrada de calcio a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VDCC) cuando se produce el potencial de acción (Fonnum, 1984; Pittenger et al., 2011). Las neuronas glutamatérgicas son catalogadas como neuronas de

proyección, donde sus axones se extienden hacia sitios distantes dentro del SNC. Cuando se produce el potencial de acción, se despolarizan los terminales sinápticos, generando la entrada de Ca^{2+} , favoreciéndose la rápida liberación del glutamato desde las vesículas presentes en la neurona pre-sináptica, difundiéndose a través del espacio sináptico para unirse tanto a receptores como transportadores (Figura 2).

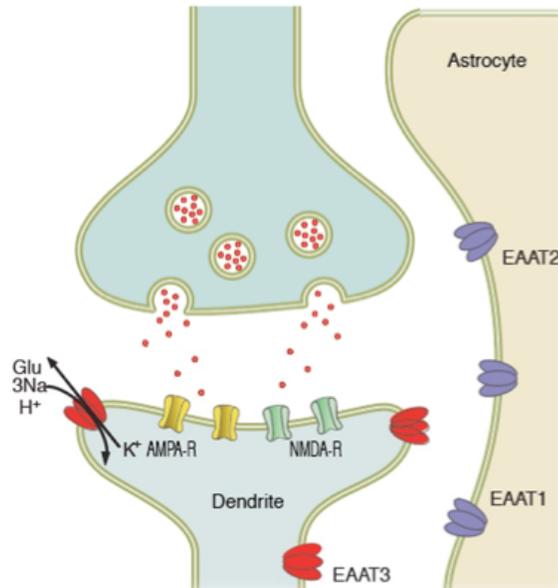


Figura 2. Principales componentes de la sinapsis glutamatergica. El glutamato es el neurotransmisor excitatorio principal en el cerebro. Este es empaquetado en el terminal axónico dentro de vesículas por el transportador de glutamato vesicular (vGluT). El glutamato se une a receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA y kainato) y/o metabotrópicos (mGluRs) que pueden estar expresados tanto pre- como post-sinápticamente. Las células gliales, principalmente los astrocitos, juegan el papel importante en la recaptación de glutamato a través de transportadores EAAT1 y EAAT2 contribuyendo a la finalización de la señal glutamatergica en las sinapsis. No obstante, el transportador neuronal de glutamato, EAAT3, también contribuye en este proceso. (Imagen tomada desde Vandenberg et al 2013.)

Cuando el glutamato es liberado al espacio sináptico, es inmediatamente reconocido por receptores de glutamato. La primera familia de estos receptores son los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), los cuales presentan diferentes subunidades (NR1, NR2A, NR2B, NR2C y NR2D) las cuales confieren la funcionalidad y temporalidad de la respuesta glutamatergica. La segunda familia de receptores de glutamato, es la activada por α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazola propionic acid (AMPA) y por Kainato, por lo que esta familia de receptores se conocen como receptores de glutamato del tipo no-NMDA, y que se sub-divide en receptores de AMPA (GluR1-4) y receptores de Kainato (GluR5-9, KA1 y KA2). Ambas familias de receptores son

ionotrópicas y funcionan como canales iónicos, permitiendo el paso de iones Na^+ y/o Ca^{2+} cuando son activados (Danbolt, 2001).

La tercera familia de receptores glutamatérgicos corresponde a los receptores acoplados a proteína G, y son llamados receptores metabotrópicos. Esta familia de receptores se subdivide en grupo I, (mGluR1 y mGluR5) que se encuentra acoplado a fosfolipasa C; grupo II (mGluR 2 y mGluR 3), que se encuentra acoplado a adenilato ciclasa y grupo III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8) que, al igual que el grupo II está acoplado a adenilato ciclasa. Los grupos I y II son activados por ácido 1-amino-cyclopentano-trans-1,3-dicarboxílico (trans-ACPD), mientras que el grupo III es activado por ácido L-2-amino-4-phosphonobutírico (L-AP4) (Danbolt, 2001).

Otro paso fundamental durante la transmisión glutamatérgica es el proceso de término de señal, debido a que un aumento del glutamato extracelular por un periodo prolongado de tiempo produce excitotoxicidad (Conti et al 1999). Para este fin, las células gliales y nerviosas expresan diferentes proteínas transportadoras de glutamato que se encuentran presentes en la membrana plasmática. Dentro de estos diversos tipos de transportadores, se encuentran los transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs); estas proteínas son los principales encargados de regular las concentraciones de glutamato extracelulares, manteniendo así bajos los niveles de excitotoxicidad y contribuyendo a la remoción de glutamato en el espacio sináptico. El transporte de glutamato a través de estas proteínas se realiza acoplado al co-transporte de 3 iones Na^+ y 1 H^+ y al anti-transporte de un ion K^+ (Figura 2). El co-transporte de iones Cl^- también se encuentra asociado al transporte de glutamato, pero en diferente proporción, dependiendo del transportador que se esté utilizando (Amara & Fontana, 2002)

Estudios recientes sugieren que la mayoría de los EAATs se encuentran localizados tanto en células gliales como en neuronas. Hasta ahora, se han identificado 2 subtipos localizados en las células gliales: GLT-1 (EAAT2) y GLAST-1 (EAAT1); Estos transportadores serían los encargados de regular las concentraciones de glutamato en el espacio extracelular (Amara & Fontana, 2002). A diferencia de los transportadores gliales, los transportadores neuronales, EAAT3 (EAAC1) y EAAT4, se encuentran localizados a nivel postsináptico, en los cuerpos celulares y en las dendritas de las neuronas (Amara & Fontana, 2002), y su función aun no es del todo comprendida, aunque la evidencia sugiere que ellos jugarían un papel en la difusión de glutamato fuera de las sinapsis o espacios extra-sinápticos (He et al 2000; Scimemi et al 2009; Bellini et al 2018) .

1.4 El rol del sistema glutamatérgico en funciones ejecutivas

Como ya se mencionó anteriormente, las funciones ejecutivas dependen de varias áreas cerebrales, incluidas la PFC y sus proyecciones hacia centros subcorticales, el hipocampo y sus proyecciones, entre otras. En este sentido, se ha demostrado que si bien el PFC puede ser importante para cambiar o integrar representaciones abstractas, se requiere que el hipocampo forme y despliegue esas representaciones de manera flexible para su uso por otros sistemas neuronales, jugando un papel esencial en el pensamiento anticipatorio durante tareas asociadas a la flexibilidad cognitiva y memoria de trabajo (Dollemann-Van Der Well et al 2019).

Es ampliamente conocido que las proyecciones que van desde PFC o desde el hipocampo hacia distintos centros subcorticales son en su mayoría proyecciones glutamatérgicas. Por ello, surge el interés en el estudio del rol del sistema glutamatérgico en las distintas funciones ejecutivas.

La evidencia clínica y preclínica sugiere que las alteraciones en las funciones ejecutivas se correlacionan con cambios en actividad de áreas discretas del lóbulo prefrontal, como el área medial (mPFC) y orbitofrontal (OFC) de la PFC (Elliot, 2003). Por ejemplo, en el ratón SAPAP3 knockout (KO), un modelo genético propuesto para TOC, se han descrito déficits en la flexibilidad cognitiva que han sido recientemente vinculados a un aumento de la actividad de la mPFC (Manning et al 2019). Asimismo, evidencia experimental sugiere que cambios en la composición y/o función de los receptores de NMDAR (que conllevan a una disfunción de la neurotransmisión glutamatérgica) afectan el desempeño de los ratones en distintas pruebas conductuales que evalúan funciones ejecutivas. Por ejemplo, la aplicación de un antagonista NMDAR selectivo por la subunidad NR2A agrava el desempeño de ratones en la prueba de aprendizaje reverso, vinculada a la flexibilidad cognitiva en ratones (Kumar et al, 2015). Correspondientemente, la subunidad NR2A de NMDAR ha sido descrita como relevante para procesos de memoria de trabajo (Mónaco et al, 2015). Así mismo, se ha observado que la depresión a largo plazo dependiente de mGluR1 participa en el proceso de aprendizaje reverso viso-espacial, lo cual implica una participación de estos receptores en este modelo experimental de flexibilidad cognitiva (Privitera et al, 2019 ; Eales et al 2014). En esta misma línea, hay estudios clínicos que han encontrado polimorfismos en el gen para el transportador de glutamato glial EAAT2 asociados a déficits en la memoria de trabajo (Karlson et al, 2009).

Junto con esto, estudios en humanos, han reportado que los pacientes que presentan una lesión hipocampal presentan un peor desempeño en tareas asociadas a flexibilidad cognitiva (Vilá-Balló et al 2017). Importantly, se ha visto que en este tipo de tareas en el Nucleus Reunians del hipotálamo quien se encarga de mediar la comunicación entre mPFC e hipocampo. (Dollemann- Vander Well et al 2019). Estos hallazgos refuerzan la importancia que se le ha atribuido al sistema glutamatérgico en el correcto funcionamiento de las funciones ejecutivas.

1.5 Disfunciones en la neurotransmisión glutamatérgica y en funciones ejecutivas en el trastorno obsesivo-compulsivo

1.5.1 Trastorno obsesivo compulsivo

El trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) es una condición clínica severa e incapacitante, que se presenta generalmente en la adolescencia tardía o la edad adulta y, si no se trata, tiene un curso crónico (Abramowitz, Taylor, & McKay, 2009). El TOC es caracterizado por imágenes o pensamientos intrusivos (obsesiones), los cuales aumentan la ansiedad, seguidos por rituales o acciones repetitivas (compulsiones), los que disminuirían la ansiedad, según la concepción clásica de la patología. Algunos de los síntomas más frecuentes en este trastorno son las preocupaciones de contaminación con el consiguiente lavado, o preocupaciones sobre el daño a sí mismo o a los demás, con la consiguiente comprobación (Stein, 2002).

En cuanto a su etiología, este trastorno se ha relacionado con una interrupción del sistema serotoninérgico cerebral, más específicamente con la hipersensibilidad de los receptores de serotonina post sinápticos. Hay evidencia de que individuos con este trastorno pueden tener una disfunción específica en los genes que codifican para el transportador de serotonina (5-HTT, SERT) y del receptor de serotonina 5-HT_{2A}, pero estos estudios no han sido replicados sistemáticamente en las diversas poblaciones (etnias) humanas (Adams et al 2005; Reimond et al 2007). Por otro lado, hay fuerte evidencia de que el sistema glutamatérgico puede presentar una disfuncionalidad en el TOC (Abramowitz et al., 2009; Stein, 2002; Dickel et al., 2006; Arnold et al., 2006; Ting & Feng, 2008).

1.5.2 Disfunción glutamatérgica asociada a TOC

Diversas investigaciones han implicado a genes que codifican proteínas que participan en la neurotransmisión glutamatérgica, como *SAPAP3* y *SLC1A1* (Abramowitz et al., 2009; Stein, 2002). El gen *SLC1A1*, que codifica para EAAT3, está altamente expresado dentro de la PFC, el cuerpo estriado, y el tálamo, hipocampo y todas las regiones del cerebro que componen el circuito Cortico-Estriado-Tálamo-Cortical (CSTC) el cual ha sido ampliamente implicado en el TOC (Hanna et al., 2002; Pittenger et al., 2011). Dada su ubicación estratégica en la peri sinapsis glutamatérgica, se piensa que EAAT3 puede facilitar la neurotransmisión a través del ajuste fino de concentraciones locales de glutamato (Arnold et al., 2006).

Estudios genéticos en TOC han sugerido sistemáticamente al gen *SLC1A1* (solute carrier family 1, member 1) 3) como un candidato asociado a esta patología (Hanna et al., 2002; Dickel et al., 2006; Arnold et al., 2006; Ting & Feng, 2008; Wendland et al., 2009).

Por otra parte, estudios de neuroimagen estructural han mostrado anormalidades, como la disminución del volumen o aumento de la densidad de materia gris en el circuito CSTC.

Estudios de neuroimagen en TOC han descrito un aumento del metabolismo de glucosa y del flujo sanguíneo (lo que da cuenta de un aumento de actividad) en núcleos centrales del circuito CSTC como corteza orbitofrontal, corteza cingulada anterior, caudado y tálamo. (Stein, 2002, Ting & Feng, 2008). Además, se han realizado estudios de imagenología en pacientes con TOC antes y después del tratamiento con SSRI o Clomipramina; los resultados muestran que, después de tratamiento con estos fármacos, ocurre una disminución del metabolismo de glucosa y del flujo sanguíneo en este circuito. Por lo que podríamos inferir que este circuito tiene un rol fundamental en la etiología del TOC (Pittenger, 2011).

Importantemente, se ha descrito que la sobre expresión de EAAT3 en neuronas dopaminérgicas se encuentra asociada al aumento de conductas estereotípicas las cuales se encuentran altamente presentes en TOC (Muhammad et al, 2022). Junto con ello, nuestro grupo encontró que la sobre expresión de EAAT3 en neuronas principales impacta en la transmisión dopaminérgica, aumentando la sensibilidad de las neuronas dopaminérgicas a amfetamina, llevando a un desbalance entre las vías estriatales directas e indirectas, lo que favorecería el desarrollo de comportamientos repetitivos (Escobar et al 2021).

1.5.3 Disfunción ejecutiva en pacientes con TOC

Es importante destacar que los síntomas del TOC surgen de deficiencias en el comportamiento dirigido a un objetivo, lo que lleva a un comportamiento habitual autónomo como consecuencia de los desequilibrios funcionales en el circuito frontoestriatal.

Estudios clínicos han reportado alteraciones en el desempeño de pacientes con TOC en pruebas asociadas a control inhibitorio (Norman et al, 2019), memoria de trabajo (Tomiyama et al, 2019) y flexibilidad cognitiva (Pittenger et al, 2017). Estas alteraciones fueron relacionadas a una mayor actividad de PFC medida por fMRI durante la realización de las tareas asociadas a control inhibitorio (Norman et al, 2019), memoria de trabajo (Tomiyama et al, 2019) y flexibilidad cognitiva (Vagui et al, 2017), sin observarse alteraciones en otros núcleos involucrados en estas funciones como tálamo, cuerpo estriado e hipocampo.

1.6 Ratón EAAT3^{glo}/CaMKII como modelo de estudio de disfunciones ejecutivas

1.6.1 El transportador de aminoácidos excitatorios EAAT3.

El transportador EAAT3, al igual que las otras proteínas pertenecientes a la familia EAAT, se encuentra en forma de homotrímero, formado por subunidades idénticas que contribuyen para formar el poro transportador en la membrana plasmática (Danbolt, 2001). Debido a que EAAT3 es capaz de movilizarse rápidamente a la membrana plasmática, se cree que debe estar unido a

proteínas ancladas al citoesqueleto que dirigen al transportador hasta la membrana de la célula para que ahí formen el poro transportador (Danbolt, 2001).

Aunque su papel en la comunicación neuronal aún no están completamente elucidado, He y colaboradores (He et al., 2000), sugieren que EAAT3 se encuentra en la membrana perisináptica donde controla la difusión de glutamato, así como también impacta sobre la captura de glutamato por los transportadores EAAT1 y EAAT2 localizados en astrocitos. Consistente con esta idea, Bellini y colaboradores demostraron que, en el cuerpo estriado, EAAT3 (Bellini et al, 2018) limita la activación de los receptores mGluR1 (los cuales generalmente se expresan en la membrana perisináptica), lo cual promueve la expresión de receptores de dopamina D1 (D1R) y modifica la plasticidad a largo plazo. De este modo, se ha propuesto la participación de EAAT3 en el control fásico de los niveles de glutamato, mientras que EAAT1 y EAAT2 participarían en el control tónico (Bellini et al, 2018).

Recientemente, mediante estudios electrofisiológicos y conductuales en ratones EAAT3 KO, se demostró que la pérdida de función de EAAT3 tiene consecuencias directas sobre la excitabilidad de las neuronas espinosas medias que expresan al receptor de dopamina D1 (D1-DMS) en el estriado lateral dorsal (DLS), lo cual lleva a alteraciones en la flexibilidad conductual en pruebas de comportamiento recompensado (Petroccione et al, 2023).

1.6.2 EAAT3 en trastorno obsesivo compulsivo

Estudios genéticos en pacientes con TOC han sugerido sistemáticamente al gen *SLC1A1* como un candidato asociado a esta patología. El grupo de Hanna identificó una región del cromosoma 9p, que contiene *SLC1A1*, a través de un estudio de ligamiento en familias a nivel de genoma completo. En 2006, los grupos de Arnold y Dickel publicaron, simultáneamente, estudios genéticos de asociación en distintos grupos de pacientes que demuestran la existencia de variantes en el gen *SLC1A1* y que están asociadas con TOC (Arnold et al 2006 ; Dickel et al 2006). En el 2009, Wendland y colaboradores publicaron un estudio de asociación genética con el mayor número de individuos a esa fecha, y describieron la existencia de combinaciones de variantes genéticas (haplotipos) en *SLC1A1*, cuyos alelos que aumentan la expresión génica están fuertemente asociados con TOC (Wendland et al 2009). El gen *SLC1A1* está altamente expresado en de la corteza cerebral, el cuerpo estriado, y el tálamo, el hipocampo, y otras regiones del cerebro que componen el circuito CSTC implicado en el TOC (Escobar et al, 2019)

1.6.3 Modelo EAAT3glo/CaMKII

Nuestro laboratorio generó y caracterizó un modelo de ratón con sobre-expresión de EAAT3 bajo el promotor de CamKII (EAAT3glo/CaMKII), el cual presenta aumentos en conductas

compulsivas y ansiosas basales, así como déficits la extinción a largo plazo de la memoria de condicionamiento del miedo (Delgado et al, 2019). Además, este modelo tiene déficits en la plasticidad excitatoria cortico-estriatal dependiente de NMDAR, que se corresponden con los cambios observados en la composición de subunidades de receptores, presentando una mayor razón NR2B/NR2A (Delgado et al, 2019).

Considerando la evidencia disponible, que indica:

- a) que existen déficits de funciones ejecutivas en individuos afectados con TOC, así como en algunos modelos animales de este trastorno;
 - b) que el ratón EAAT3glo/CaMKII exhibe un fenotipo compulsivo en conductas basales;
 - c) que el ratón EAAT3glo/CaMKII presenta una alteración de la recuperación espontánea de la memoria de miedo, y
 - d) que el ratón EAAT3glo/CaMKII tiene déficits en la plasticidad sináptica a nivel cortico-estriatal, la que está asociada a cambios en la composición de los receptores NMDA,
- es que surge la pregunta si este modelo animal exhibe alteraciones en funciones ejecutivas similares a lo observado en individuos afectados con TOC.

1.7 Hipótesis

Basados en la evidencia, nuestra hipótesis de trabajo es:

“La sobreexpresión de EAAT3 produce un deterioro de las funciones ejecutivas”

1.8 Objetivos de la tesis

1.8.1 Objetivos generales

- 1) Evaluar alteraciones en aprendizaje instrumental en animales EAAT3glo/CaMKII adultos.
- 2) Evaluar alteraciones en las funciones ejecutivas en animales EAAT3glo/CaMKII adultos.

1.8.2 Objetivos específicos

1.- Evaluar alteraciones en aprendizaje instrumental en animales EAAT3glo/CaMKII adultos.

1.a.- Determinar si los animales EAAT3glo/CaMKII presentan alteraciones en la adquisición del condicionamiento operante.

1.b.- Determinar si los animales EAAT3glo/CaMKII presentan alteraciones en la extinción del condicionamiento operante.

2.- Evaluar alteraciones en las funciones ejecutivas en animales EAAT3glo/CaMKII adultos.

2.a.- Determinar si los animales EAAT3glo/CaMKII presentan alteraciones en flexibilidad cognitiva mediante la evaluación de la prueba de reversión del aprendizaje/condicionamiento operante.

2.b.- Determinar si los animales EAAT3glo/CaMKII presentan alteraciones del control inhibitorio mediante la evaluación de la prueba Five-choice serial-reaction time (5CSRT).

2.c.- Determinar si los animales EAAT3glo/CaMKII presentan alteraciones en la memoria de trabajo mediante la evaluación de su desempeño en la prueba Trial-unique, delayed nonmatching-to-location (TUNL).

2. METODOLOGÍA

2.1 Animales

Se utilizaron ratones de la línea transgénica EAAT3^{glo} (control, sin Cre) y doble transgénica EAAT3^{glo}/CaMKII (con sobreexpresión de EAAT3 dirigida por promotor CaMKII) (Delgado-Acevedo et al., 2019) de 10 semanas de edad, de la cepa C57BL/6J y de ambos sexos. En algunos experimentos (Figura 15 y 16), se utilizaron ratones silvestres (Wild Type, WT) de la misma cepa y edad similar. Los ratones fueron destetados al día postnatal 21, y fueron agrupados de a 4-6 animales por caja en el bioterio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso, con temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) y humedad (40-70%), controladas, en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (las luces se encendieron a las 8:00 AM), y con acceso ilimitado de agua y comida. Todos los experimentos fueron realizados en ciego con respecto al genotipo de los animales. Además, todos los procedimientos experimentales y de manejo animal fueron evaluados y aprobados por el comité de bioética Institucional de la Universidad de Valparaíso (Acta BEA 131-19).

2.1.1 Generación de animales con sobre expresión de EAAT3 en el cerebro anterior

Los animales transgénicos con sobreexpresión condicional de EAAT3 en el cerebro anterior fueron generados mediante el sistema Cre/LoxP, utilizando un vector pCLE-EAAT3 (Figura 3A; Delgado-Acevedo et al., 2019), que permite la expresión de EAAT3 bajo la acción de la recombinasa Cre. Posee un promotor constitutivo CMV/ β -actina que dirige la expresión de una proteína fluorescente verde (EGFP) flanqueada por sitios LoxP, y río abajo se encuentra la secuencia de EAAT3 de ratón. El vector pCLE-EAAT3 fue ampliamente caracterizado in vitro (Figura 3B y C), y posteriormente se usó para generar los ratones EAAT3^{glo} (Figura 3D) (Delgado-Acevedo et al., 2019).

Para obtener los ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 en neuronas principales del cerebro anterior, se cruzaron ratones EAAT3^{glo} con ratones CaMKII α -Cre. Esta línea promueve la recombinación Cre/LoxP bajo el control del promotor del gen de la proteína quinasa II dependiente de alfa-calcio/calmodulina (CaMKII α) (Tsien et al., 1996). Por lo tanto, en presencia de Cre recombinasa, se remueve la EGFP "floxeada" y se expresa EAAT3 en aquellas neuronas en las que el promotor CamKII α es activo (Figura 4).

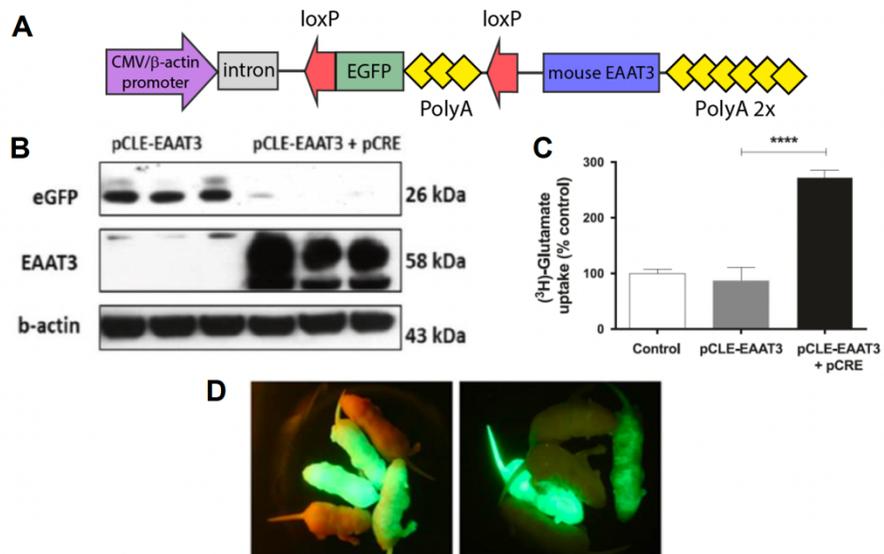


Figura 3. Caracterización del vector pCLE-EAAT3. El vector pCLE-EAAT3 contiene una secuencia EGFP floxeada. Una vez que se produce la recombinación de Cre, la secuencia EGFP y la secuencia de parada son liberadas y EAAAT3 es expresado (A). Inmunoblots representativos para la expresión de EGFP, EAAT3 y B-actina en células N2A transfectadas con pCLE-EAAT3 y pCLE-EAAT3 + pCMV-Cre durante 24 h (B). Determinación de la recaptura de [3H]-Glutamato en células N2A transfectadas con pCLE-EAAT3 y pCLE-EAAT3 + pCMV-Cre durante 24 (C). Ratón EAAT3^{glo} visualizado bajo luz UV (D).

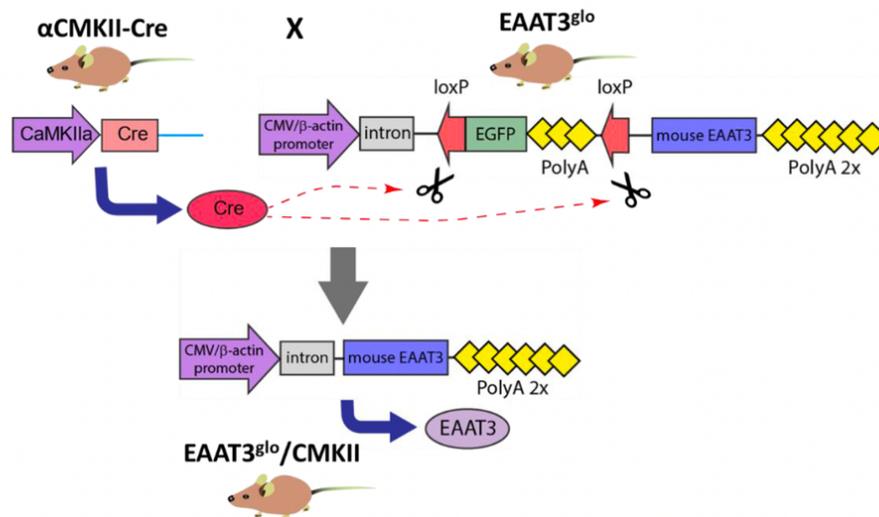


Figura 4. Esquema de las cruces necesarias para obtener ratones con sobreexpresión condicional de EAAT3 restringida a neuronas que expresan CaMKIIα en el prosencéfalo.

2.2 Genotipificación

2.2.1 Extracción de DNA genómico

El DNA genómico fue extraído desde un trozo de cola de 0,5 cm de largo. Se agregaron a las muestras 400 μ L de buffer de lisis (0.1 M Tris, 0.2 M NaCl, 5 mM EDTA and 0.4% SDS) suplementado con proteinasa K 0.2 mg/ml (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, USA) y se incubaron a 55°C y en agitación constante hasta que las colas se disgregaron completamente. El tejido disgregado fue centrifugado a 13000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente, se rescató el sobrenadante obtenido y se añadieron 500 μ L de isopropanol puro (Sigma Aldrich). Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante, para luego agregar 1 mL de etanol al 70% (Etanol para biología molecular, Sigma Aldrich) a cada pellet. Luego de homogenizar en vortex, los tubos fueron nuevamente centrifugados a 13000 rpm por 3 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes fueron descartados y el pellet obtenido se dejó secar a temperatura ambiente durante 10-15 minutos. Luego fueron re-suspendidos en 100 μ L de agua molecular estéril precalentada a 37°C y se homogenizaron hasta que el pellet se re suspendió completamente. El DNA obtenido fue cuantificado en un espectrofotómetro.

2.2.2 PCR convencional

Nuestro laboratorio desarrolló un ensayo de PCR triple para GFP (presencia o ausencia del transgén EAAT3), CRE (presencia o ausencia de CaMKII α -Cre) y MAO-B (control interno positivo). Los primers para la región promotora de GFP son: PROM-For: 5'-CTCTAGAGCCTCTGCTAACC-3'; EGFP-Rev: 5'-TGATGCCGTTCTTCTGCTTGTC-3', y el amplicon obtenido es de 346 bp; los primers para CRE fueron: CRE-For: 5'-GCATACCTGGAAAATGCTTCTGT-3'; CRE-Rev: 5'-GGCCCAAATGTTGCTGGATAGTT-3', y el amplicon obtenido fue de 164 bp. Por último, los primers para MAO-B fueron: MAO-B-For: 5'-CTACAAAGCAGATTGCCACGC-3'; MAO-B-Rev: 5'-TACCTGACATCAACTGGTCCC-3', y el amplicon obtenido fue de 292 bp. Para realizar el PCR convencional se mezclaron 2 μ l de qDNA, 8 μ l de primer mix (0.4 μ M concentración final de cada primer), y 10 μ l 2X de Sapphire (RR350A, Takara Bio USA, Inc, Mountain View, CA, USA) para cada muestra. El protocolo de temperatura utilizado fue: 95°C 10 min; [94°C 30 s, 62°C 30 s, 72°C 30 s] X 30 ciclos; 72°C 10 min. Para identificar los amplicones obtenidos, se corrió una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2% en Buffer TBE (pH 8.4) a 100V por 90 min.

Para muestras obtenidas desde animales WT se observa solo la banda correspondiente al control interno (MAO-B) a 292pb (Figura 5, línea 2). En las muestras correspondientes a animales control EAAT3^{glo}, se observan dos bandas: una a 346pb correspondiente al transgén

para EAAT3 y la correspondiente a MAO-B, (Figura 5, línea 3). Las muestras correspondientes a animales CaMKII α -Cre, presentan dos bandas: la correspondiente a MAO-B y una a 164pb correspondiente a la CRE recombinasa (Figura 5, línea 4). Por último, las muestras correspondientes a ratones EAAT3^{glo}/CMKII presentan 3 bandas: la correspondiente a MAO-B, la correspondiente a CRE y la correspondiente al transgén para EAAT3 (Figura 5, Línea 5).

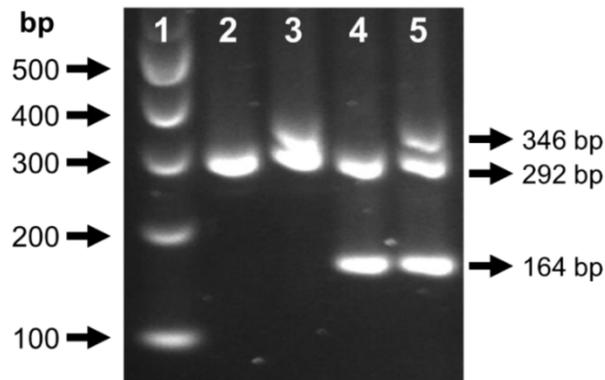


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de amplicones obtenidos por PCR convencional. Línea 1: 100 bp DNA ladder (#SM0323, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). Línea 2: WT, línea 3: EAAT3^{glo}, línea 4: CaMKII α -Cre, línea 5: EAAT3^{glo}/CMKII .

2.3 Pruebas conductuales

2.3.1 Protocolo de restricción leve de alimento

Ratones de ambos genotipos, de 10 semanas de edad, fueron dispuestos de a dos por caja para el protocolo de restricción leve de alimento, durante el cual se les proporcionó entre 2-3 gr diarios de comida por animal. El peso de cada animal se registró diariamente y cuidando que la disminución de peso del animal fuera menor a 1 gr diario, mediante el ajuste de la cantidad de comida diaria proporcionada al animal (siempre manteniéndonos entre 2-3 gr diarios) con acceso a agua *ad libitum* durante todo el protocolo. Una vez alcanzado el criterio del 85% de su peso inicial, los animales comenzaron las pruebas de condicionamiento operante, durante las cuales fueron mantenidos en restricción de alimento y su peso fue monitoreado una vez a la semana. (Horner et al, 2014)

2.3.2 Condicionamiento operante

Con el propósito de evaluar el aprendizaje asociativo en ratones EAAT3^{glo}/CaMKII, se realizó un protocolo estándar de condicionamiento operante en 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 (Figura 6). Estas cajas están compuestas principalmente por una placa con tres agujeros (izquierdo, central, derecho), cada uno con un sensor foto interruptor conectados a un Arduino UNO, y programados con diferentes funciones. Cuando el ratón introduce la nariz (“nose poke”) a uno de los agujeros laterales definido previamente como “activo”, se activa el sensor y se genera un tono audible y la correspondiente entrega de recompensa en el agujero central. Por el contrario, al introducir la nariz en el agujero lateral opuesto no se genera respuesta (inactivo). La recompensa fue 10 μ L de sacarosa al 30%, entregada por una jeringa calibrada previamente para entregar una cantidad estandarizada en cada evento.

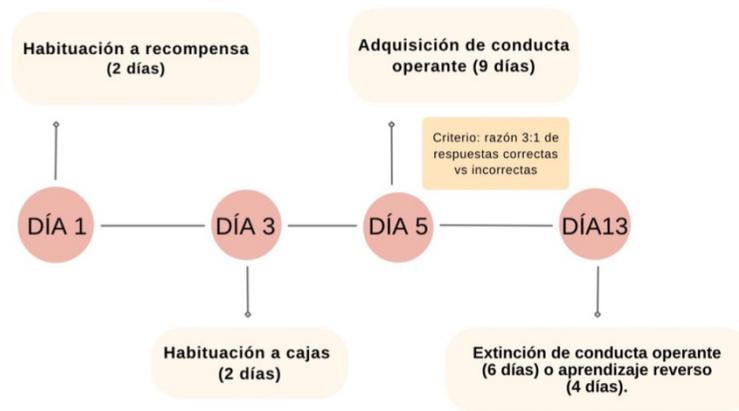


Figura 6. Diagrama del protocolo utilizado para realizar las pruebas de condicionamiento operante básico.

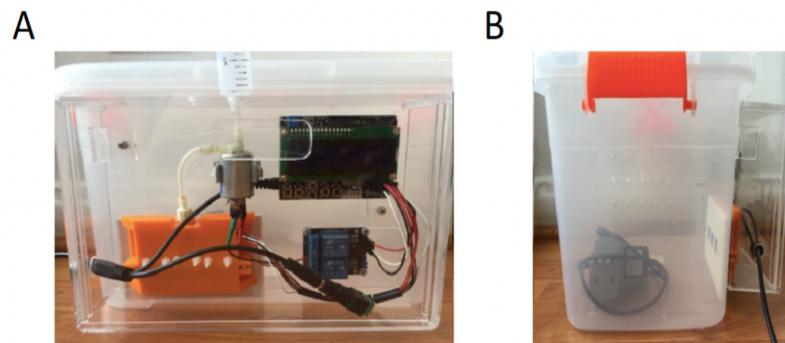


Figura 7. Caja ROBuckey para condicionamiento operante. En A se observa la vista frontal de la caja ROBuckey 2.0, en la parte superior izquierda está la pantalla LCD montada sobre la placa de Arduino Uno. La pantalla por un lado, por medio de los pines, conecta con el relé (parte inferior) y este a su vez controla la válvula solenoide (elemento del centro de metal). Por otro lado, recibe las conexiones desde los sensores de los agujeros activos.

Las cajas ROBucket se utilizaron para evaluar 3 parámetros del condicionamiento operante simple: la adquisición de conducta operante, su extinción y el aprendizaje reverso de la conducta adquirida, siguiendo el protocolo descrito en la Figura 6.

Primero, se realizó una habituación a la recompensa utilizada para el condicionamiento operante, consistente en sacarosa al 30% dispuesta en un pocillo dentro del *home cage* durante dos días consecutivos. Posterior a ello, se habituó a los animales a las cajas operantes, para lo cual fueron aclimatados a la sala de conducta durante una hora, y luego fueron puestos por una hora en las cajas ROBucket apagadas, por dos días consecutivos.

Luego de la fase de habituación, se evaluó la adquisición del condicionamiento operante. Para este fin, se utilizaron 22 animales control y 25 animales EAAT3^{gl0}/CMKII, los cuales fueron dejados durante una hora diaria en la caja ROBucket durante 9 días consecutivos, y se registraron las respuestas realizadas en los agujeros activo, inactivo y centro. Se consideró que la conducta era adquirida si cumplía los criterios (descritos en Devarakonda et al, 2016):

- obtener más de 20 entregas de sacarosa en 3 sesiones consecutivas,
- exhibir una discriminación mayor de 3:1 en respuestas activas v/s inactivas, durante tres días consecutivos.

Una vez cumplido el criterio de adquisición y pasados los 9 días del protocolo, los ratones de cada genotipo fueron divididos en 2 grupos: un grupo fue sometido al protocolo de extinción de la conducta operante, y el otro al protocolo de aprendizaje reverso, tal como se muestra en la Figura 8.

Para evaluar la extinción de la conducta operante, se dejó a los animales durante una hora en la caja ROBucket durante 6 días posteriores, con la diferencia de que, en esta etapa, el agujero activo no otorga recompensa, y solo se mantiene la emisión del tono al realizar el toque con la nariz (Figura 8B). En el caso del protocolo del aprendizaje reverso, las asociaciones de recompensa-agujero se invierten, por lo que los animales deben aprender no solo a extinguir la respuesta previamente recompensada, sino también a elegir la opción previamente no recompensada (ahora recompensada); este protocolo se realizó por 4 días (Figura 8C).

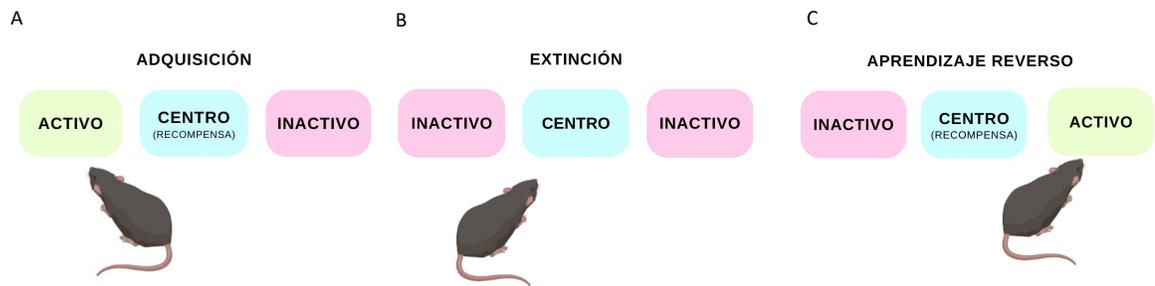


Figura 8. Esquema de la configuración de Agujeros Activo (CS+), Inactivo (CS-) y centro durante las pruebas de condicionamiento operante simple. La figura muestra la configuración de agujeros para la prueba de adquisición (A), extinción (B) y aprendizaje reverso (C). **condicionamiento operante.**

2.3.3 Condicionamiento operante en cámara operante Bussey-Saksida con pantalla táctil.

La plataforma operante Bussey-Saksida con pantalla táctil consiste en una cámara con forma trapezoidal con una pantalla táctil en su interior, que permite mostrar al animal estímulos visuales generados por computador, algo que es muy beneficioso debido a que las características perceptivas (tamaño, forma, contraste, luminancia, etc.) y similitudes de los estímulos pueden manipularse fácilmente. Al lado opuesto de la pantalla táctil se encuentra un receptáculo para recompensa líquida la cual es proporcionada mediante una bomba peristáltica. Esta plataforma también posee una cámara de video para poder monitorizar al animal, un sistema de audio que permite entregar estímulos auditivos y una luz para iluminar la cámara. El hardware es utilizado a través del software ABBET II (Lafayette instruments) y los movimientos y reconocimiento de estímulos de los animales son adquiridos mediante un sistema infra rojo (Figura 9).

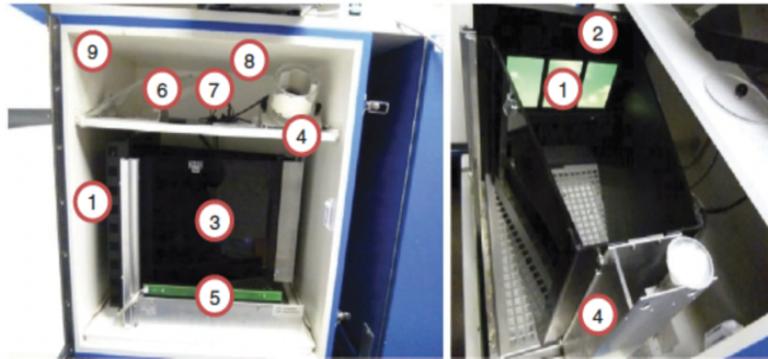


Figura 9. Plataforma de condicionamiento operante Campdent Instruments. (1) Pantalla táctil (2) máscara negra que cubre la pantalla táctil, excepto por las ventanas de respuesta (3) cámara trapezoidal (4) dispensador de recompensa líquida (5) conjunto de haz infrarrojo (6) luz (7) cámara de video (8) generador de tono y clic (9) caja de atenuación de sonido y luz. (figura modificada desde Mar et al, 2013)

2.3.3.1 Five choice serial reaction time task (5-CSRTT).

La prueba 5-CSRT (“tarea de tiempo de reacción en serie de cinco elecciones”, en español) es una tarea conductual utilizada para evaluar la atención visuoespacial, la compulsividad y la impulsividad motora en animales (Mar et al, 2013). Esta prueba requiere entrenar a los ratones para que aprendan a informar sobre la aparición y ubicación de breves estímulos visuales, presentados de forma pseudoaleatoria, en distintas ubicaciones espaciales dentro de una matriz horizontal de cinco aberturas.

La prueba 5-CSRT se puede utilizar para evaluar varios aspectos de la función ejecutiva:

- 1. Precisión de respuesta (% de precisión):** Se divide el número de respuestas correctas por el total de respuestas correctas e incorrectas. Este valor corresponde al índice principal de la atención dividida y sostenida.
- 2. Omisiones (% de omisión):** Se divide el número de ensayos en los que el ratón no respondió por el número total de ensayos completados. El porcentaje de omisiones refleja la atención global.
- 3. Respuestas Prematuras:** Corresponden al número de respuestas realizadas durante la ITI (Intervalo Inter Trial). Esta es la medida principal del comportamiento impulsivo.
- 4. Respuestas perseverantes:** Corresponden al número de respuestas (toques con nariz) en cualquier apertura después de que el ratón haya dado una respuesta correcta, pero antes de la recuperación de la recompensa. Esta es una medida del comportamiento compulsivo.
- 5. Entradas en el magazine:** Corresponde al número de respuestas de toques de nariz en el receptáculo de recompensa (magazine). Esta es una medida de la motivación del animal.

6. Latencia de recuperación de la recompensa: Corresponde a el tiempo promedio para que el ratón recupere la recompensa otorgada; este parámetro se relaciona a la motivación de los animales a desarrollar la tarea.

El protocolo de 5-CSRTT consta de 3 fases: preparación, pre-entrenamiento y prueba, cada una de las cuales contiene diferentes etapas:

Fase de preparación: consiste en 7 días de preparación en los cuales se monitorea el peso de los animales, para luego comenzar con la restricción de alimentos hasta alcanzar el 85% de su peso original (alrededor de 7 días); luego se habitúa al animal a la recompensa líquida (leche con chocolate marca Loncoleche) durante 3 días. Pasado este periodo, se comienza con la fase de preentrenamiento.

Fase de preentrenamiento: consiste en 6 etapas (4 habituaciones de entre 1-2 días) y 2 etapas de introducción al uso de las pantallas (Tabla 1). Durante esta fase, los animales deben ir habituándose a las cámaras operantes, la recompensa y los estímulos, mientras adquieren de manera gradual el comportamiento de tocar la pantalla apropiadamente cuando se presenta un estímulo.

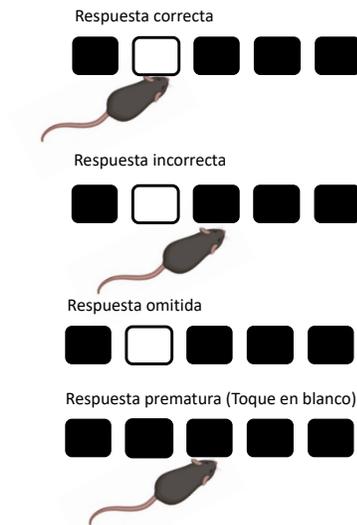
Fase de prueba: Conformada por 11 etapas, de una duración de 7-10 días cada una aproximadamente en los cuales se espera que el animal mantenga y divida su atención entre las 5 localizaciones ubicadas en línea en la pantalla, para detectar y responder a un estímulo visual, el cual será progresivamente cada vez más breve, tal como se describe en la Tabla 2. El diagrama de flujo para esta etapa se muestra en la Figura 10. Una vez el animal logra una línea base estable en el último paso de esta fase durante dos días consecutivos, se puede analizar el desempeño de los animales en la prueba 5-CSRTT básica.

Tabla 1: Etapas de la fase de pre-entrenamiento 5-CSRTT

Etapa	Descripción	Duración	Criterio
Habitación 1	El ratón se deja en la cámara durante una sesión de 10 minutos, con todas las luces apagadas. Sin presentación de estímulos o recompensas. Se controla la actividad del ratón.	1 día	-----
Habitación 2a	El ratón se deja en la cámara durante una sesión de 20 minutos , con la luz de encendida.150 μ L de recompensa son añadidos a la bandeja de comida). Una vez el ratón entre en la bandeja de comida y la abandone la luz de la bandeja se apaga, hay un retraso de 10 s antes de que se encienda la luz de la bandeja y entrega nuevamente recompensa. El procedimiento se repite hasta que finaliza la sesión.	1 día	-----
Habitación 2b	El ratón se deja en la cámara durante una sesión de 40 minutos , con la luz de encendida.150 μ L de recompensa son añadidos a la bandeja de comida). Una vez el ratón entre en la bandeja de comida y la abandone la luz de la bandeja se apaga, hay un retraso de 10 s antes de que se encienda la luz de la bandeja y entrega nuevamente recompensa. El procedimiento se repite hasta que finaliza la sesión.	1 día	-----
Habitación 2c	El ratón se deja en la cámara durante una sesión de 60 minutos , con la luz de encendida.150 μ L de recompensa son añadidos a la bandeja de comida). Una vez el ratón entre en la bandeja de comida y la abandone la luz de la bandeja se apaga, hay un retraso de 10 s antes de que se encienda la luz de la bandeja y entrega nuevamente recompensa. El procedimiento se repite hasta que finaliza la sesión.	1-2 días	El animal debe consumir toda la recompensa
Initial Touch Training	El estímulo (un cuadrado blanco) se muestra aleatoriamente en una de las 5 ventanas. Después de un retraso, la imagen se elimina y se entrega la recompensa. La entrega de alimentos va acompañada de la iluminación de la luz de la bandeja y un tono opcional. Cuando el animal va a recolectar la recompensa, se muestra el estímulo en otra ubicación. Si el ratón toca la pantalla mientras se muestra el estímulo, estese elimina, se reproduce un tono y se entrega la recompensa. La recolección de	1-3 días	Completar 30 ensayos en 30 minutos

	la recompensa hace que comience un nuevo trial.		
Must Touch Training	El estímulo (un cuadrado blanco) se muestra aleatoriamente en una de las 5 ventanas. El ratón debe tocar el estímulo para obtener una respuesta de tono/alimento. No hay respuesta si el ratón toca una parte en blanco de la pantalla. La entrega de la recompensa va acompañada de la iluminación de la luz de la bandeja y un tono. La entrada para recoger la recompensa apaga la luz de la bandeja y se inicia el ITI. Después del período ITI (predeterminado 5s) se muestra otra imagen.	1-7 días	Completar 20 ensayos en 30 minutos

A



B

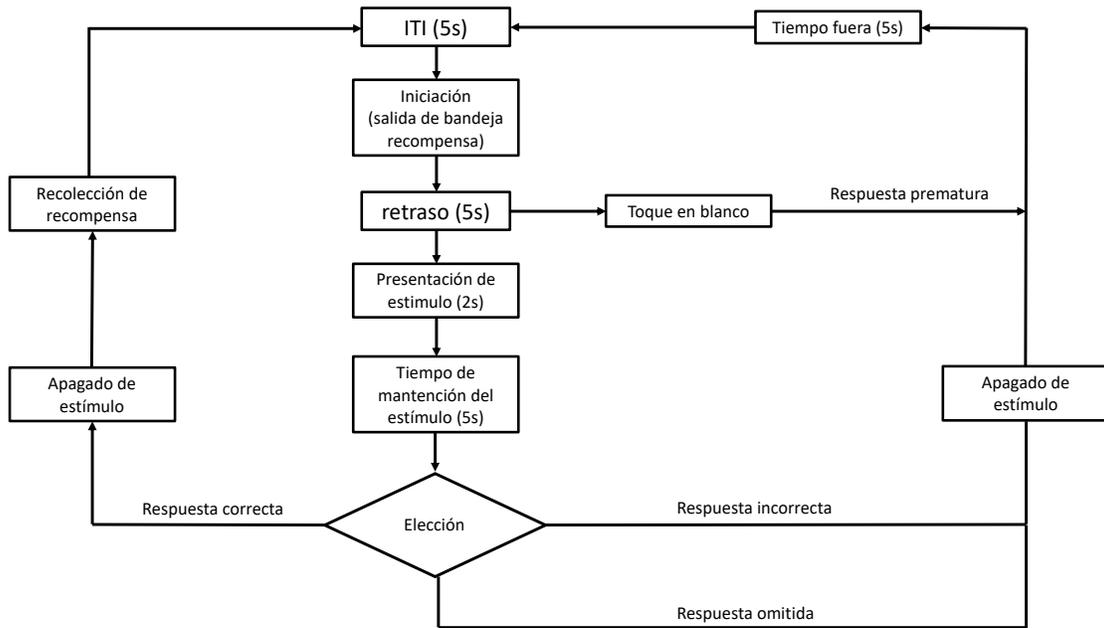


Figura 10. Prueba 5-CSRT. Esquema de la presentación del estímulo en la máscara de 5 orificios y ejemplificación de los tipos de respuestas obtenidas durante la prueba (A). Diagrama de flujo de la prueba 5-CSRT (B).

Tabla 2: Etapas de la fase de prueba (o entrenamiento) 5-CSRTT

Sesión	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	Línea base
Duración	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min	30 min					
ITI	5 seg	5 seg	5 seg	5 seg	5 seg	5 seg					
Duración estímulo	32 seg	16 seg	8 seg	4 seg	2 seg	1.8 seg	1.6 seg	1.4 seg	1.2 seg	1.0 seg	0.8 seg
Mantención de estímulo	37 seg	21 seg	13 seg	9 seg	7 seg	6.8 seg	6.6 seg	6.4 seg	6.2 seg	6.0 seg	5.8 seg

Después de que los animales alcanzaron una línea base estable de su desempeño en la prueba (>80% asertividad, < 20% omisión) con una duración de estímulo de 0,8 segundos y un ITI de 5 segundos, se analizaron las respuestas obtenidas durante los últimos 3 días de línea base estable.

2.3.3.2. Trial Unique non-matching to location task (TUNL)

La prueba TUNL (Trial-unique, delayed nonmatching-to-location) es una tarea de memoria de trabajo basada en el paradigma DNMTTP (delayed matching or nonmatching-to-position) con una alteración importante: la muestra predefinida y la ubicación de elección novedosa se pueden seleccionar al azar entre múltiples ubicaciones de respuesta y variar entre ensayos dentro de una sesión, lo que hace que esta tarea sea "única en la prueba". Específicamente, el requisito de retener información espacial durante el retraso se puede reducir aprovechando la predictibilidad de la ubicación correcta. La tarea TUNL evita este problema mediante el uso de una variedad de ubicaciones espaciales, lo que hace que la ubicación de la elección correcta sea menos predecible, y un análisis extenso de comportamientos mediadores putativos ha demostrado que es poco probable que los animales hagan uso de estrategias de mediación, lo que permite estudiar más limpiamente la memoria de trabajo. (Oomen et al 2013)

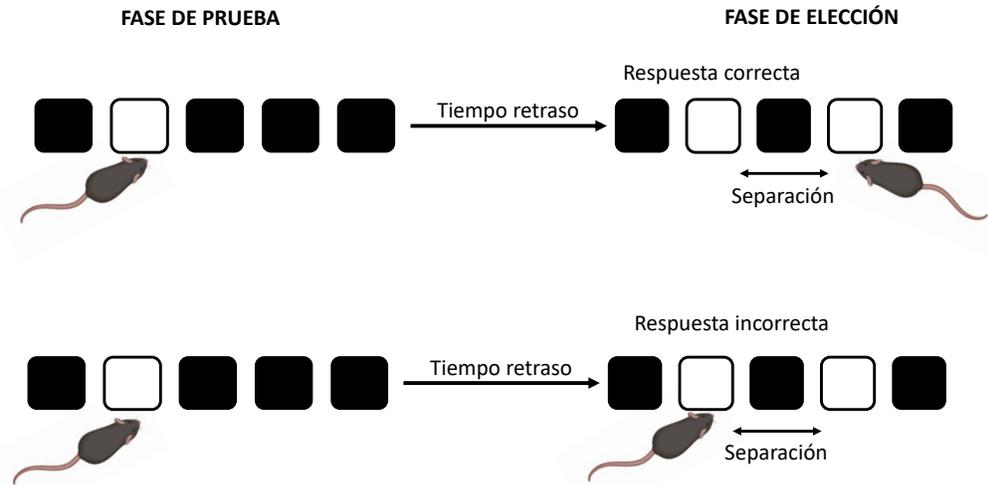
Al igual que en las otras pruebas, el protocolo para TUNL consta de 4 fases principales: preparación, pre-entrenamiento, entrenamiento y prueba, cada una de las cuales contiene diferentes etapas. *La fase de preparación* es igual a la descrita anteriormente para 5-CSRTT, y consiste en restricción de alimentos, monitoreo de peso y habituación a la recompensa. Luego la *fase de pre-entrenamiento* está formada por las mismas 6 etapas descritas en la Tabla 1 para 5-CSRTT y *una etapa final* en la cual se le presenta la tarea al animal y se le castiga cuando realiza

un trial incorrecto. El castigo consta de un trial de refuerzo el cual se repite hasta que el animal realice correctamente la prueba.

Más concretamente, esta tarea consiste en dos fases (Figura 11). En la base de prueba, se presenta un estímulo (cuadrado blanco) al animal en una de las posibles locaciones en la pantalla, una vez que el ratón toque el estímulo, este desaparece de la pantalla; después de un tiempo variable de retraso, comienza la fase de prueba en la cual se presenta el estímulo antiguo o estímulo de prueba junto a un nuevo estímulo en una nueva locación. El animal debe tocar el estímulo nuevo para realizar una respuesta correcta (Figura 11).

Luego, la fase de entrenamiento consiste de 2 etapas, cada una de las cuales está compuesta por 3 subetapas que duran entre 10-14 días cada una y que se describen en la tabla 3. A grandes rasgos, la etapa 1 requiere que los estímulos de muestra y de prueba sean presentados en cualquier ubicación menos en el centro (cuadrado 3) y con distintos niveles de separación espacial (S1, S2 y S3) mientras que la etapa 2 requiere que uno de los dos estímulos sea presentado al centro y con distintos niveles de separación espacial (S1, S0 y S1&0).

A



B

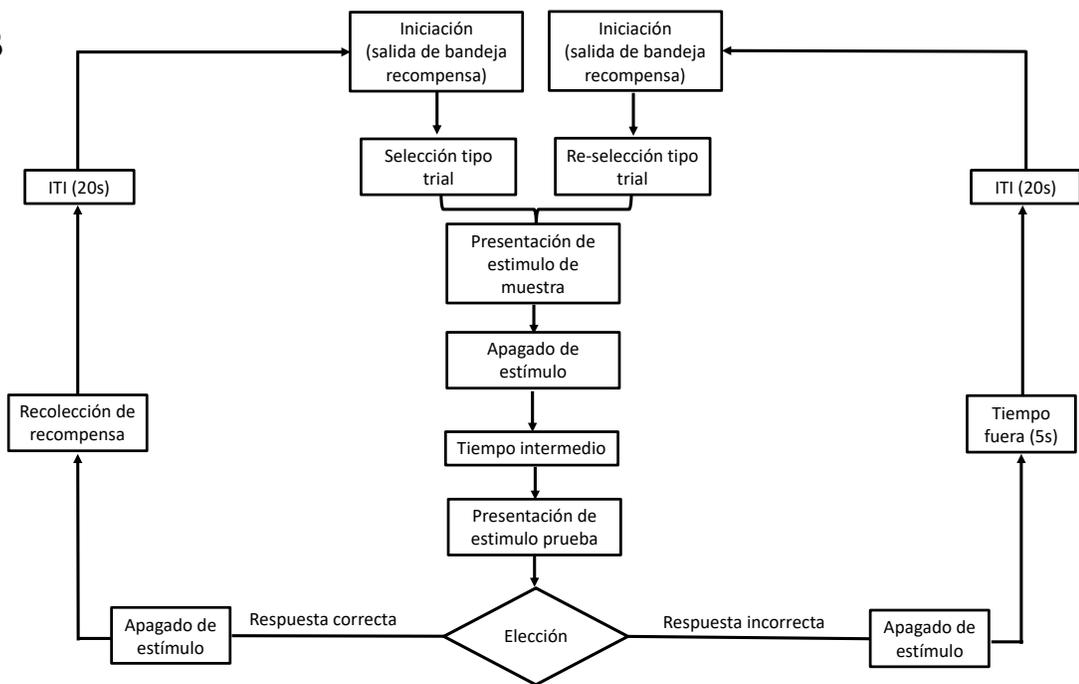
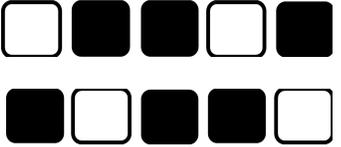
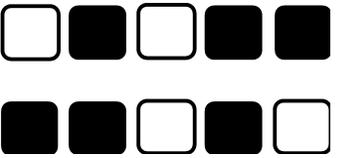
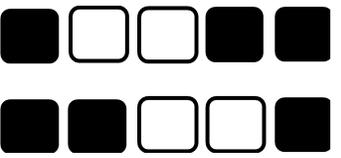


Figura 11. Prueba TUNL. Esquema de la presentación del estímulo en la máscara de 5 orificios y ejemplificación de los tipos de respuestas obtenidas durante la prueba (A). Diagrama de flujo de los ensayos para las fases de pre-entrenamiento, entrenamiento y prueba TUNL (B).

Tabla 3: Fases y sub-fases de la etapa de entrenamiento de la prueba TUNL.

Nivel de separación espacial	Fase 1 Ningún estímulo en el centro	Fase 2 (mitad ensayo estímulo de muestra en el centro; mitad estímulo de prueba en el centro)
S3		
S2		
S1		
S0		

Una vez pasada la fase de entrenamiento, comienza la fase de prueba que consta de diversos desafíos cognitivos, para evaluar alteraciones en separación de patrones, para lo cual se varía la separación entre estímulos y para evaluar de que forma el tiempo de demora entre un estímulo y otro afecta a la memoria de trabajo. Para esto se realizaron 4 tipos de experimentos, los cuales se describen en la tabla 4.

Tabla 4: Descripción de desafíos cognitivos realizados durante la etapa de prueba TUNL

Experimento	Descripción	Sesiones	duración
Experimento 1	<ul style="list-style-type: none"> - Presentación de estímulos: Fase 2 - Intervalo entre estímulos: Variable (0,3,6) - Separación espacial (0 y 1) 	2 sesiones consecutivas con cada uno de los intervalos entre estímulos.	6 días (2 días con intervalo 0, 2 días con intervalo 3 y 2 días con intervalo 6)
Experimento 2	<ul style="list-style-type: none"> - Presentación de estímulos: Fase 2 - Intervalo entre estímulos: Variable (0,2) - Separación espacial (0,2) 	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Línea base con separación espacial = 1 2.- sesión separación espacial 1 e intervalos 0 y 2. 3.- sesión separación espacial 0 y 1 e intervalo 0. 	7 días aprox (1-5 días línea base, 1 día sesión 2 y 1 días sesión 3).
Experimento 3	<ul style="list-style-type: none"> - Presentación de estímulo: en todas las locaciones. - Intervalo entre estímulos: Variable (0 y 4) - Separación espacial = 0 	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Línea base separación espacial 0 e intervalo 0 2.- Sesión con intervalo 4 	16 días aprox (10-15 días línea base, 1 día de sesión con intervalo 4)
Experimento 4	<ul style="list-style-type: none"> - Presentación de estímulos: Fase 2 - Intervalo entre estímulos: Variable (0,6,9,18) - Separación espacial (1,2,3) 	<ol style="list-style-type: none"> 1.- sesión con separación espacial 3 e intervalo 0 y 6 2.- sesión con separación espacial de 3 y 2 e intervalo 0 3.- sesión con separación espacial 3 y 2 e intervalo 0 4.- sesión con separación espacial 3 e intervalo 0,6 y 9 5.- sesión con separación espacial 3 e intervalo 0,9 y 18 	5 días (1 por cada sesión)

2.3.4 Evaluación de flexibilidad cognitiva mediante aprendizaje reverso usando Morris Water maze.

Los ratones fueron entrenados y analizados en una habitación iluminada indirectamente (20-50 lux) con señales destacadas ubicadas en las cuatro paredes. Se llenó una piscina circular (140 cm de diámetro, 38 cm de altura) con agua opacada con pintura blanca no tóxica y se mantuvo a 22–24 °C. Se dispuso una plataforma circular de plástico blanca (15 cm de diámetro, 27.5 cm de altura) que queda oculta 0.5 cm por debajo de la superficie del agua (28 cm) en el cuadrante NW, NE, SE o SW y a 20 cm del borde de la piscina. Durante los primeros 28 ensayos (4 ensayos/día, 7 días, fase de adquisición), la plataforma oculta se mantuvo en la misma posición; luego se movió al cuadrante opuesto en los 20 ensayos restantes (5 días, fase de reversión). La primera prueba de fase inversa (24 h después de la última prueba de la fase de adquisición) sirvió como prueba de ensayo sin la plataforma objetivo, para probar la retención espacial. Al día siguiente de la fase de inversión, los ratones se sometieron a una segunda prueba de ensayo (prueba de ensayo de inversión) (Figura 12).

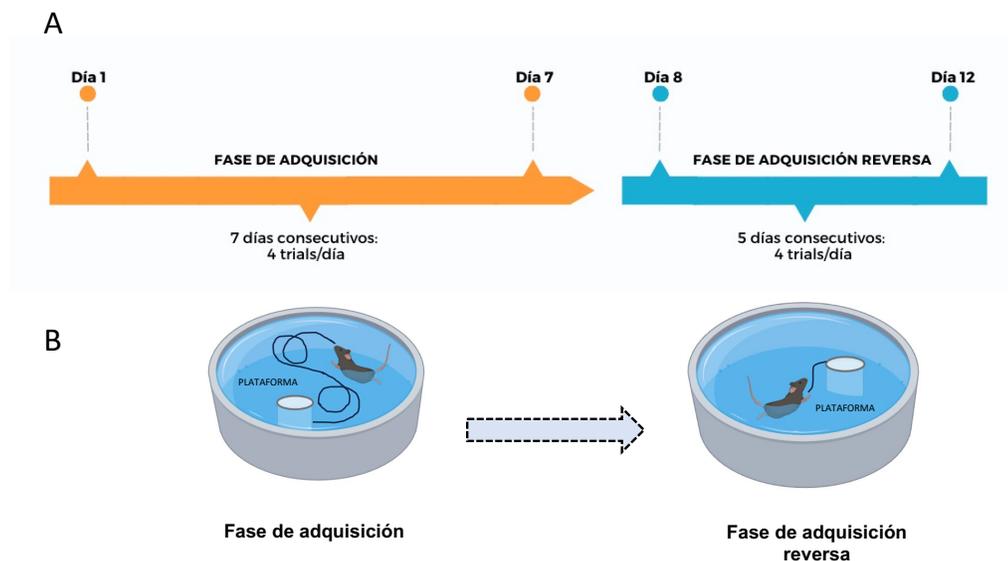


Figura 12. Prueba de aprendizaje reverso visuoespacial en Morris Water Maze. Línea temporal del protocolo utilizado para las pruebas de adquisición y aprendizaje reverso visuoespacial **(A)** Esquema de las pruebas de adquisición y aprendizaje reverso visuoespacial. Durante la fase de adquisición el animal debe aprender a llegar rápidamente a la plataforma para ser sacado de la piscina, por otra parte, durante la fase de aprendizaje reverso, la plataforma es cambiada de lugar y el animal debe aprender a ir a la nueva locación de la plataforma para ser sacado de la piscina**(B)**

2.3.5 Evaluación de la memoria de trabajo usando la prueba de alternancia espontánea en T-maze.

La prueba de alternancia espontánea en T-maze es basada en la tendencia natural de los roedores a preferir explorar un sector novedoso a uno familiar, lo que los lleva a alternar entre un brazo objetivo y el otro. Para realizar esta prueba, se utilizó un laberinto en forma de T, el cual fue construido en nuestro laboratorio según las características descritas en d'Isa et al 2021 (Figura 13).

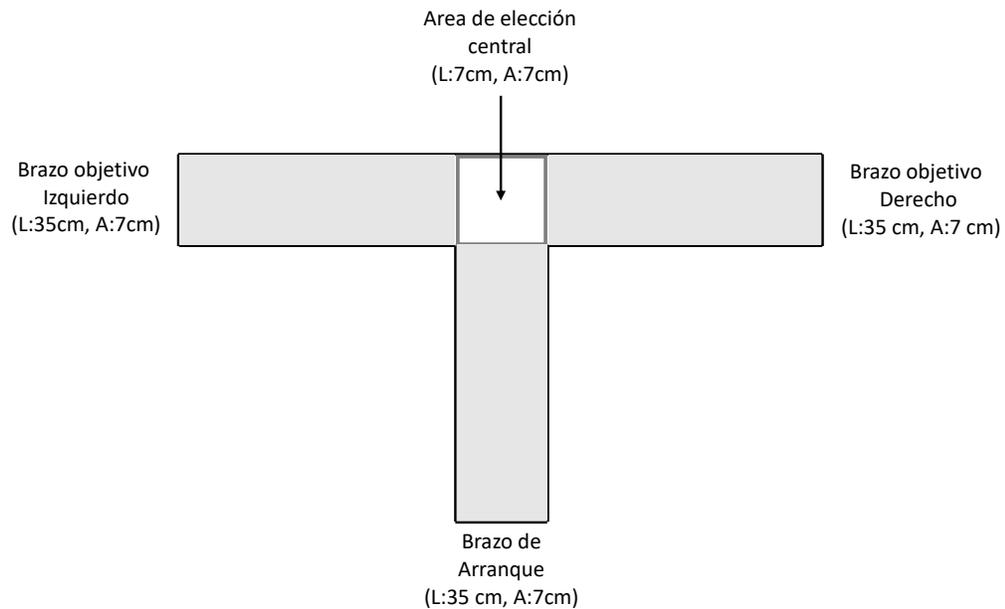


Figura 13. Esquema de laberinto en T utilizado para la prueba de alternancia espontánea.

Los animales se ambientaron durante 1h en la sala de conducta, luego se tomaron cuidadosamente y se posicionaron en el brazo de arranque, mirando hacia la pared trasera. Una vez que el animal quedó de cara mirando hacia el área de elección central, se midió el tiempo que demoraba en elegir uno de los dos brazos. Cuando el animal hizo su elección entrando completamente a uno de los dos brazos (criterio de cola) se le confinó mediante una puerta en el brazo elegido por 30 segundos (Figura 14). Este procedimiento se repitió durante 6 ensayos más, registrando el tiempo que demora el animal en elegir un brazo y el brazo elegido. Si el brazo elegido durante un trial es diferente al brazo anterior, se considera como alternancia.

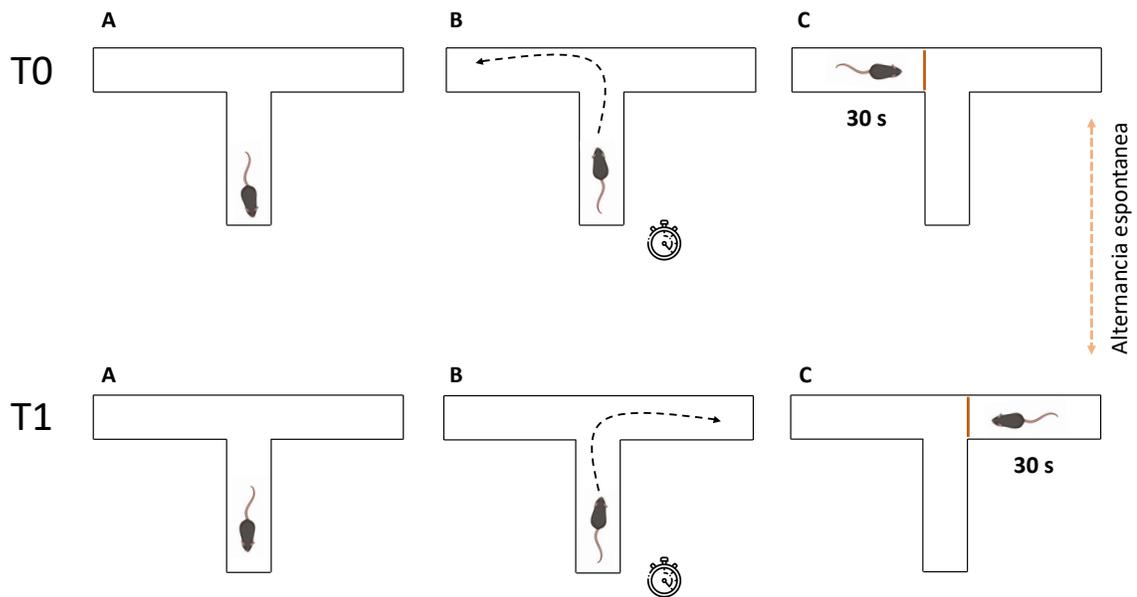


Figura 14. Diagrama representativo de la prueba de alternancia espontánea en T-maze. El diagrama representa la conducta de alternancia espontánea en la que durante una prueba de muestra arriba (T0) los ratones ingresan a uno de los dos brazos izquierdo o derecho y es mantenido en el brazo por 30 segundos mediante el cierre de una compuerta. Durante la prueba de elección T1 (abajo), los animales deben ir al brazo objetivo opuesto (anteriormente no visitado; alternancia espontánea) y es nuevamente mantenido ahí por 30 segundos. Se realizan 6 ensayos de elección durante un período de tiempo.

3. RESULTADOS

3.1 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de EAAT3 sobre la adquisición del condicionamiento operante básico en ratones EAAT3^{9lo}/CaMKII

3.1.1 Validación del protocolo para adquisición de conducta operante simple.

Con el propósito de validar el protocolo de condicionamiento operante simple, primero utilizamos animales controles o WT. Tal como se aprecia en la Figura 15, nuestros resultados demuestran que, en nuestras condiciones, los animales adquirieron exitosamente el condicionamiento operante cumpliendo con el criterio descrito de una proporción 3:1 de respuestas activas sobre inactivas (Deverakonda et al, 2016)., lo que se evidenció desde el segundo día del protocolo.

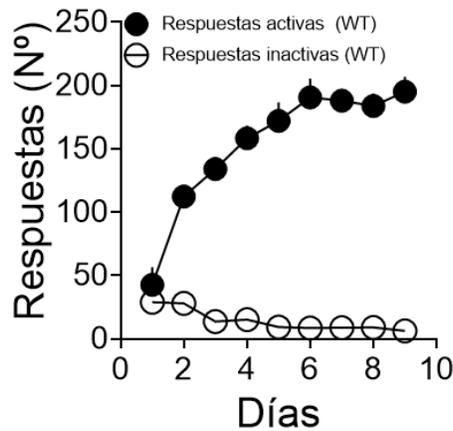


Figura15. Progresión temporal de la adquisición del condicionamiento operante en animales WT. En la figura se muestra que mientras las respuestas activas (CS+) aumentan casi 4 veces con el pasar de los días de protocolo de adquisición, las respuestas inactivas disminuyen hasta llegar casi a 0.

Así mismo, en la Figura 16A se muestra que las respuestas activas aumentaron significativamente entre el día 1 y el 9 (T-test, Mann-Whitney test $p < 0,0001$), mientras que las respuestas inactivas disminuyeron significativamente entre el día 1 y 9 (Figura 16B; T-test, Mann-Whitney test $p = 0,038$). Las respuestas en el agujero central, por otro lado, se mantienen estables a través de los días (Figura 16C; T-test, Mann-Whitney test $p = 0,73$). Estos resultados demuestran la correcta adquisición del condicionamiento operante en animales WT y son consistentes con las

respuestas esperadas según lo descrito por los autores de la caja ROBucket (Deverakonda et al, 2016).

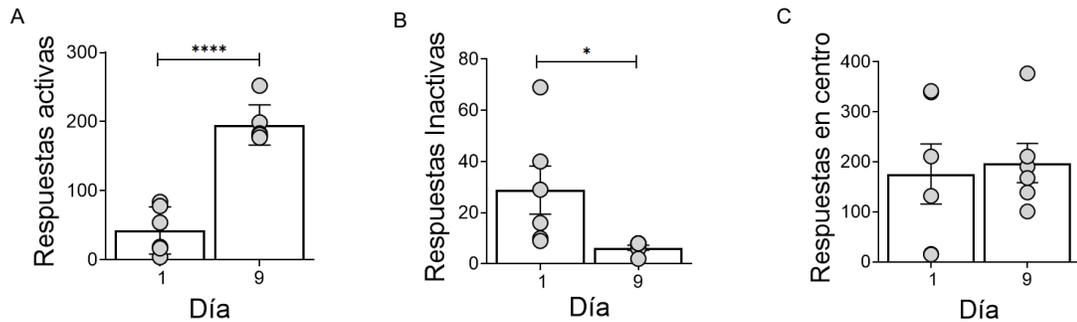


Figura 16. Animales controles (WT) presentan una correcta adquisición del condicionamiento operante. (A) Respuestas activas aumentan significativamente entre el día 1 y el 9 mientras que las respuestas inactivas disminuyen significativamente entre el día 1 y 9 **(B)**. Las respuestas al centro se mantienen estables durante los días de protocolo **(C)**. Estos datos demuestran la correcta adquisición del condicionamiento operante en animales WT (N= 6 animales; barras de error s.e.m.; *P < 0.05; ***P < 0.001,)

3.1.2. Evaluación de la adquisición de la conducta operante simple en animales EAAT3^{glo}/CaMKII.

Una vez validado el protocolo de condicionamiento operante con animales WT, realizamos los mismos ensayos en animales con sobreexpresión del transportador neuronal de glutamato EAAT3 (EAAT3^{glo}/CaMKII). Para esto, se utilizaron 22 animales controles (EAAT3^{glo}) y 25 animales con sobreexpresión (EAAT3^{glo}/CaMKII), los cuales fueron posteriormente separados en dos grupos para ser sometidos a la prueba de extinción del aprendizaje operante (11 animales por grupo) y a la prueba de aprendizaje reverso (11 animales EAAT3^{glo} y 13 EAAT3^{glo}/CaMKII). Como se puede ver, en la Figura 17, al igual que los animales WT (Figura 16), ambos grupos adquirieron correctamente la conducta operante, cumpliendo al segundo día del protocolo con el criterio de adquisición especificado anteriormente.

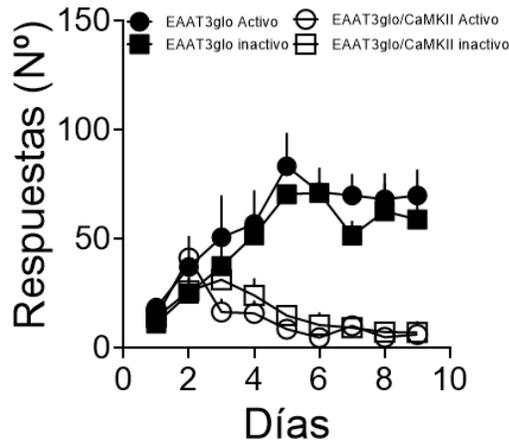


Figura 17. Comparación en la progresión de la adquisición del condicionamiento operante a través de los días de duración del protocolo entre animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII. En la figura se muestra que tanto en animales EAAT3^{glo} como en animales EAAT3^{glo}/CaMKII, mientras respuestas activas (CS+) aumentan casi 4 veces con el pasar de los días de protocolo de adquisición, mientras que las respuestas inactivas disminuyen hasta llegar casi a 0.

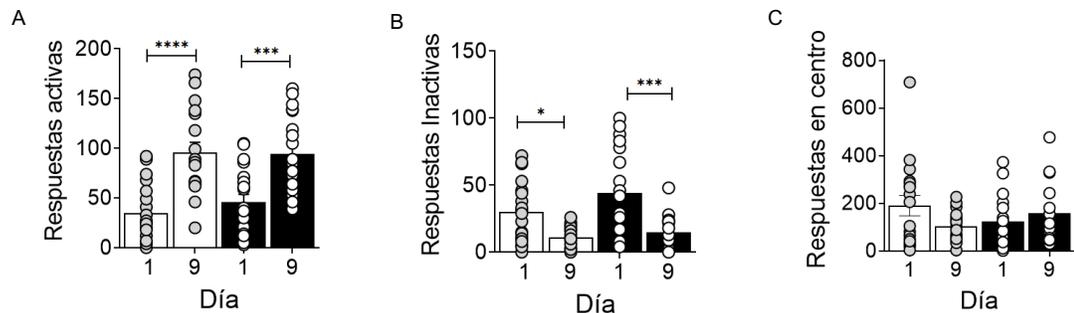


Figura 18. Animales controles EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CAMKII presentan una correcta adquisición del condicionamiento operante.

(A) Respuestas activas aumentan significativamente entre el día 1 y el 9 mientras que las respuestas inactivas (B) disminuyen significativamente entre el día 1 y 9 en ambos grupos (C) Las respuestas al centro no presentan cambios significativos en animales EAAT3^{glo}, ni EAAT3^{glo}/CAMKII durante los días de protocolo. Estos datos demuestran la correcta adquisición del condicionamiento operante en animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII (N= 22 EAAT3^{glo}, 25 EAAT3^{glo}/CaMKII; Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m); *P < 0.05; ***P < 0.001; ****P < 0.0001.)

Ambos grupos experimentales muestran un aumento significativo ($p < 0,005$) en el número de respuestas activas (Figura 18A) y una disminución significativa en respuestas inactivas (Figura 18B) al comparar el día 1 con el día 9, demostrando que ambos grupos adquirieron correctamente la conducta operante. En cuanto a las respuestas en el centro, no se observan diferencias significativas ni en animales EAAT3^{glo} ni EAAT3^{glo}/CAMKII durante los días de protocolo (Figura 18C). Estos resultados demuestran que no existen alteraciones en la adquisición de la conducta operante dadas por la sobreexpresión de EAAT3.

3.2 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de EAAT3 sobre la extinción del condicionamiento operante simple usando animales EAAT3^{glo}/CaMKII

3.2.1 Validación del protocolo para Extinción de conducta operante simple.

Con el fin de validar nuestro protocolo de extinción del condicionamiento operante simple (modificado desde Deverakonda et al, 2016), primero se realizó la prueba en animales WT. Como se observa en la figura 19 los animales extinguen exitosamente el condicionamiento operante, lo que se evidencia en la disminución del número de respuestas activas desde el día 2 del protocolo de extinción; lo mismo pasa con las respuestas inactivas.

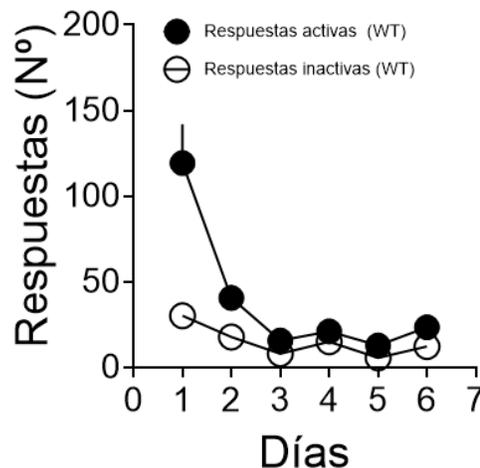


Figura 19. Progresión temporal de la extinción del condicionamiento operante en animales WT. En la figura se muestra que tanto las respuestas activas (CS+) como las respuestas inactivas (CS-) disminuyen con el pasar de los días del protocolo de extinción hasta llegar casi a 0.

Al realizar la comparación entre el primer y último día de protocolo las respuestas disminuyen con el correr de los días, llegando a una diferencia significativa ($p < 0,005$) entre el día 1 y el 9 en animales WT (Figura 20A), mientras que las respuestas inactivas disminuyen significativamente ($p < 0,05$) a través de los días (Figura 20B). Por su parte, las respuestas al centro no muestran cambios significativos entre el día 1 y 9 ($p = 0,0672$). Estos resultados dan cuenta de que, con el protocolo utilizado, los animales WT extinguen efectivamente la conducta operante.

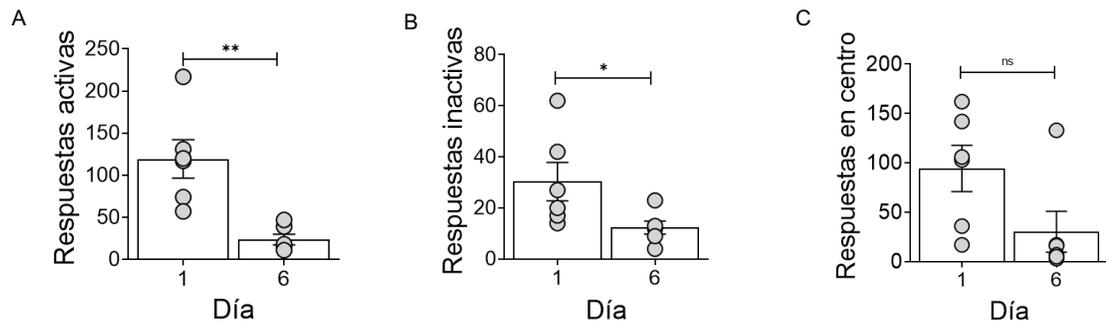


Figura 20. Animales control (WT) presentan una correcta extinción del condicionamiento operante. (A) Respuestas activas disminuyen significativamente entre el día 1 y el 9 al igual que las respuestas inactivas (B). Las respuestas al centro se mantienen estables durante los días de protocolo (C). Estos datos demuestran la correcta adquisición del condicionamiento operante en animales WT (N= 6 animales; (Cada circulo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m)) *P < 0.05; **P < 0.01, ns: no significativo)

3.2.2. Evaluación de la extinción de la conducta operante simple en animales EAAT3^{glo}/CaMKII.

Con el fin de determinar si la sobreexpresión de EAAT3 produce algún efecto sobre el proceso de extinción de la conducta operante, animales control EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII fueron sometidos a la prueba de extinción de conducta operante simple.

Los resultados obtenidos muestran que, mientras los animales EAAT3^{glo} disminuyeron el número de respuestas activas e inactivas, los animales EAAT3^{glo}/CaMKII no muestran una disminución de estas respuestas (Figura 21). Sugiriendo un posible deterioro del proceso de extinción del condicionamiento operante simple en animales EAAT3^{glo}/CaMKII.

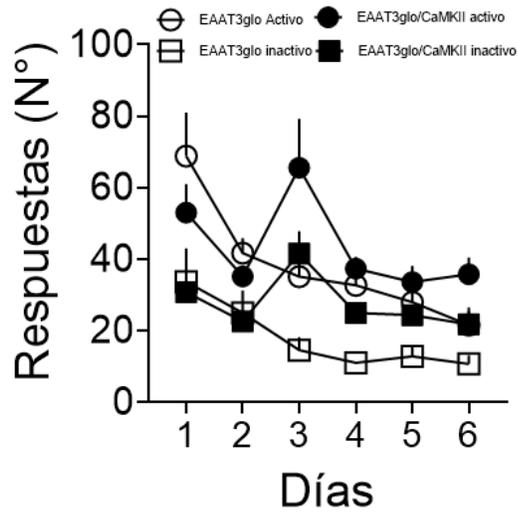


Figura 21. Progresión temporal de la extinción del condicionamiento operante, comparada entre animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII. En la figura se muestra que mientras animales EAAT3^{glo} disminuyen tanto las respuestas activas como inactivas a través de los días del protocolo de extinción, los animales EAAT3^{glo}/CaMKII mantienen el número de respuestas activas e inactivas prácticamente estables. Cada círculo o cuadrado representa el promedio de respuestas de los animales de un grupo en un día y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m)

Al comparar el número de respuestas activas entre el día 1 y el día 6 del protocolo de extinción, podemos comprobar que estas disminuyen significativamente en animales control EAAT3^{glo} (ANOVA de dos vías con medidas repetidas $p < 0,0001$), mientras que en animales EAAT3glo/CaMKII no hubo disminución significativa ($p = 0,32$; Figura 22A). Lo mismo se puede observar para el número de respuestas inactivas (ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples $p_{EAAT3glo} = 0,051$, $p_{EAAT3glo/CaMKII} = 0,247$; Figura 22C) y el número de respuestas al centro (ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples $p_{EAAT3glo} = 0,013$, $p_{EAAT3glo/CaMKII} = 0,15$; Figura 22B). Lo que da cuenta de que la sobre expresión de EAAT3 afecta la extinción del condicionamiento operante simple en ratones.

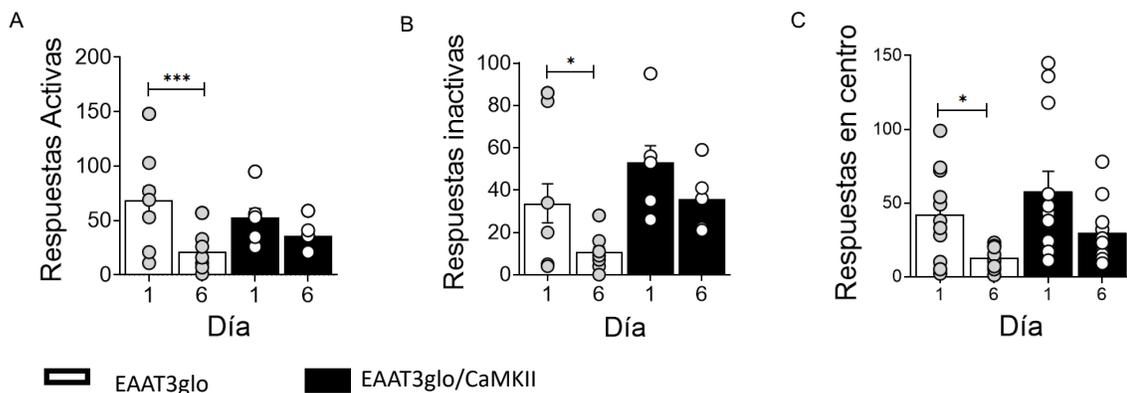


Figura 22. La sobreexpresión de EAAT3 altera la extinción del condicionamiento operante simple. Respuestas activas disminuyen significativamente entre el día 1 y el 9 en el grupo EAAT3^{glo} mientras que en animales EAAT3^{glo}/CaMKII no se observan diferencias (A), lo mismo sucede con respuestas al centro (B) e inactivas(C). Estos datos demuestran que animales EAAT3^{glo}/CaMKII muestran un deterioro en el proceso de extinción del condicionamiento operante (N= 11 animales por grupo; Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m); *P < 0.05; ***P < 0.001; ****P< 0.0001.)

3.3 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de EAAT3 sobre la flexibilidad cognitiva usando animales EAAT3^{glo}/CaMKII.

3.3.1 Prueba de aprendizaje reverso del condicionamiento operante simple

Para determinar si el modelo de sobre-expresión del transportador neuronal de glutamato EAAT3glo/CaMKII presenta alteraciones en flexibilidad cognitiva, se realizó inicialmente la prueba de aprendizaje reverso del condicionamiento operante simple adquirido en cajas ROBucket (Figura 6). Para esto, se usó un grupo de 11 animales EAAT3^{glo} y 14 EAAT3^{glo}/CaMKII que habían adquirido exitosamente la conducta operante (Sección 2.a).

La figura 23A muestra la progresión en la extinción de la respuesta previamente recompensada a través de los días que duró la prueba de aprendizaje reverso (ANOVA de dos vías con medidas repetidas y modelo mixto). Observamos que las respuestas hacia el agujero no recompensado (-Cs, previamente recompensado) disminuyeron significativamente en animales EAAT3^{glo} (ANOVA de dos vías con comparación múltiple; P= 0,0146) mientras que esta disminución no fue significativa en el grupo EAAT3^{glo}/CaMKII (ANOVA de dos vías con comparación múltiple; P= 0,16).

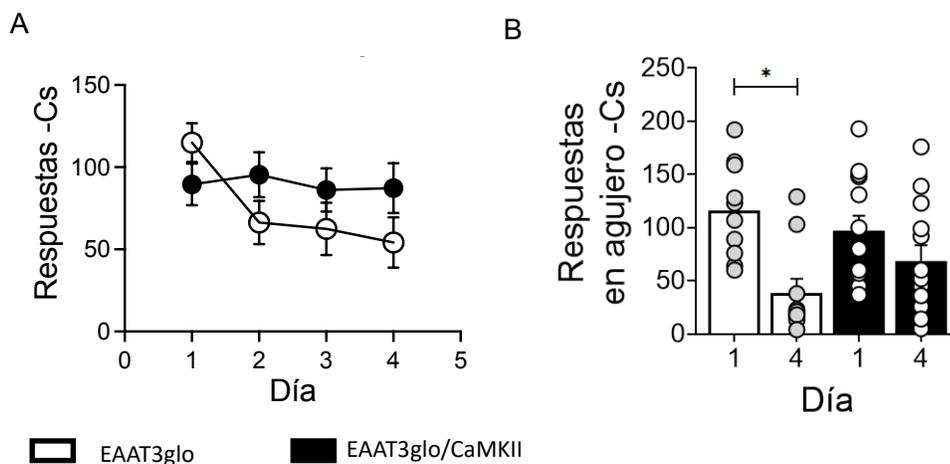


Figura 23. La sobre expresión de EAAT3 altera el proceso de aprendizaje reverso del condicionamiento operante simple. Progresión de respuestas -CS en animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII a través del protocolo de aprendizaje reverso **(A)** Respuestas -CS disminuyen significativamente entre el día 1 y el 4 en el grupo EAAT3^{glo} mientras que en animales EAAT3^{glo}/CaMKII no se observan diferencias **(B)**, (N= 11 animales por grupo; En A, cada círculo representa el promedio de respuestas de los animales de un grupo por día y En B Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m); **P < 0.01)

Por otra parte, en la Figura 24 muestra cómo los animales adquirieron el nuevo conocimiento a través de los 4 días que duró la prueba (Figura 24A) y demostrando que los animales control adquirieron este nuevo conocimiento más rápidamente que los animales EAAT3^{glo}/CaMKII. Esto se demuestra en el gráfico 24B donde se evidencia que el grupo control aumenta significativamente el número de respuestas al nuevo estímulo condicionante (ANOVA de dos vías con comparación múltiple; P= 0,0347), mientras que, en el grupo experimental, no hubo diferencias significativas (ANOVA de dos vías con comparación múltiple; P= 0,91).

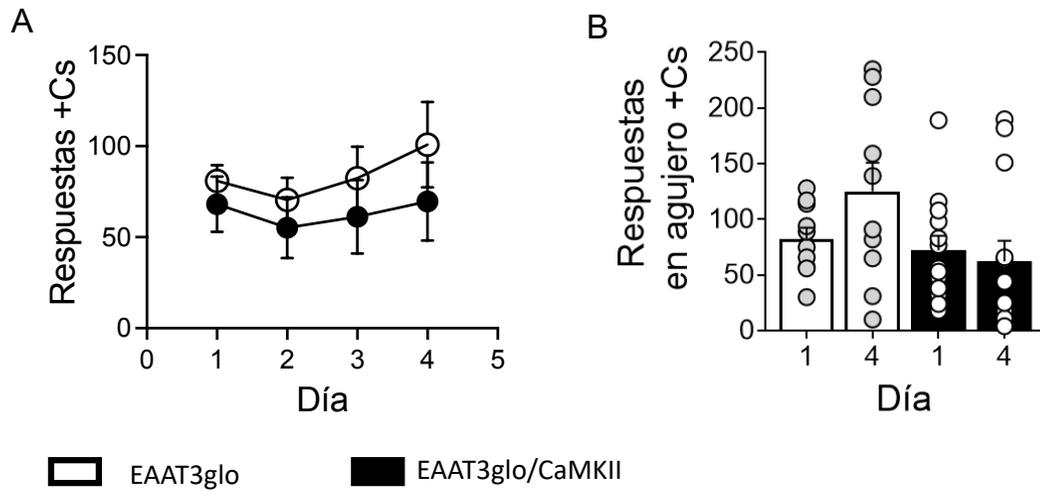


Figura 24. Sobre expresión de EAAT3 altera el proceso de aprendizaje reverso del condicionamiento operante simple. Progresión de respuestas +CS en animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII a través del protocolo de aprendizaje reverso. (A) Respuestas +CS no aumentan significativamente entre el día 1 y el 4 en el grupo EAAT3^{glo} mientras que en animales EAAT3^{glo}/CaMKII tampoco se observan diferencias (B), (N= 11 animales por grupo; En A, cada círculo representa el promedio de respuestas de los animales de un grupo por día y En B Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m)).

Por último, se analizó el número de respuestas en el centro durante los días de duración del protocolo (Figura 25A) observándose que no hubo diferencias significativas ni entre los distintos días del protocolo ni entre los genotipos. Esto se reafirma al comparar el número de respuestas en el centro al día 1 y al día 4 del aprendizaje reverso (Figura25B), sin encontrar cambios significativos en ninguno de los grupos experimentales (ANOVA de dos vías con comparación múltiple; $P_{EAAT3^{glo}}$: 0,35, $P_{EAAT3^{glo}/CaMKII}$: 0,55).

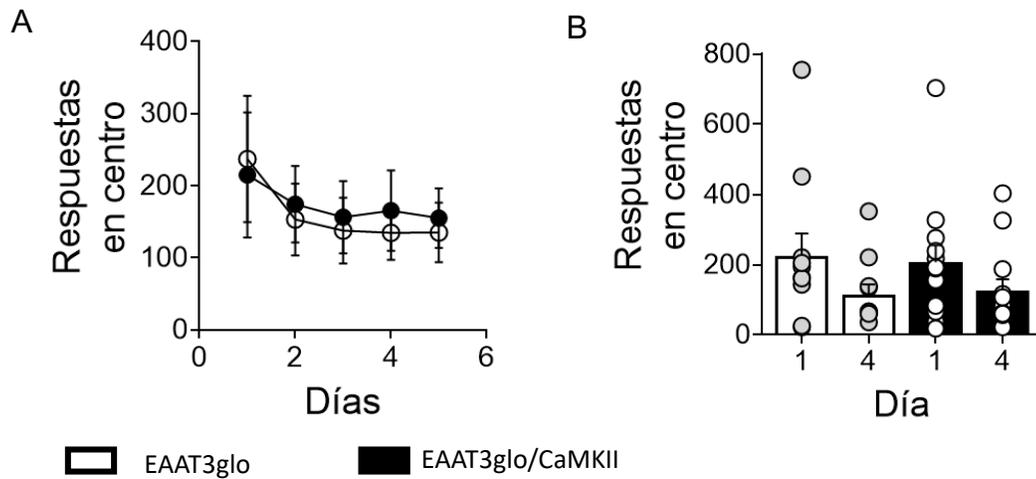


Figura 25. La sobreexpresión de EAAT3 no altera el número de respuestas en el centro durante el proceso de aprendizaje reverso del condicionamiento operante. (A) Progresión de respuestas al centro en animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII a través del protocolo de aprendizaje reverso. (B) Las respuestas al centro entre el día 1 y el 4 en el grupo EAAT3^{glo} ni EAAT3^{glo}/CaMKII no se presentan diferencias (N= 11 animales por grupo; En A, cada círculo representa el promedio de respuestas de los animales de un grupo por día y En B Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m))

Para comprobar de que los cambios en flexibilidad cognitiva observados en esta prueba no son producto de alteraciones en la motivación de los ratones EAAT3^{glo}/CaMKII durante el desarrollo de esta, se realizó un segundo aprendizaje reverso, en el cual se volvió a las condiciones iniciales (+CS adquisición = +CS 2° aprendizaje reverso) (Figura 26). Este procedimiento permite evaluar si la motivación de los animales para obtener la recompensa se ha visto alterada a través del protocolo de adquisición y primer aprendizaje reverso. Cuando se comparó el desempeño de los animales EAAT3^{glo}/CaMKII al día 1 y día 4 de ambas pruebas, no se observaron diferencias significativas ni en las respuestas al agujero condicionante (ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples $P_{EAAT3^{glo}/CaMKII\ ADQ}: 0,58$, $P_{EAAT3^{glo}/CaMKII\ 2^\circ\ AR}: 0,91$) ni en el agujero no condicionante (ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples $P_{EAAT3^{glo}/CaMKII\ ADQ}: 0,72$, $P_{EAAT3^{glo}/CaMKII\ 2^\circ\ AR}: 0,78$), demostrando de que no hubo cambios en la motivación de estos animales y que, por lo tanto, las diferencias observadas en el aprendizaje reverso se deben efectivamente a una alteración de la flexibilidad cognitiva de estos animales.

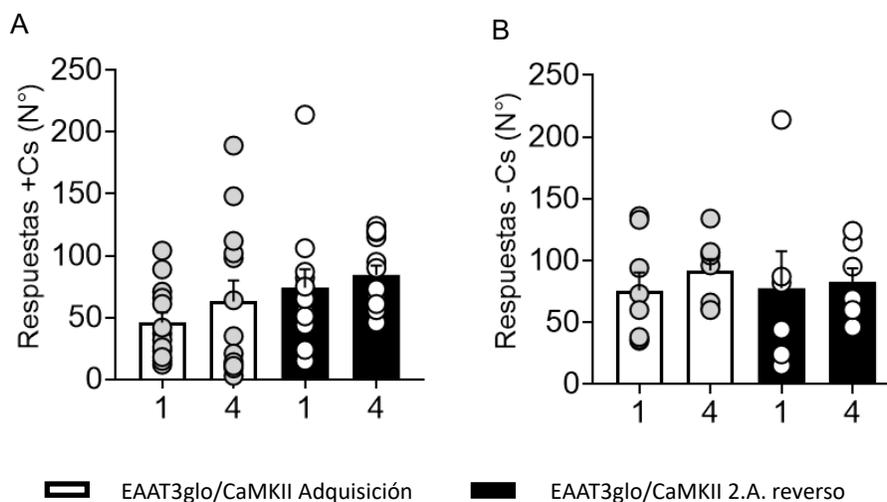


Figura 26. La sobreexpresión de EAAT3 no genera cambios en la motivación entre el protocolo de adquisición y aprendizaje reverso. Al ver la comparación entre las respuestas Activas (+CS) (A) e inactivas (-CS) (B) en animales EAAT3^{glo}/CaMKII durante la adquisición de la conducta operante y durante el segundo aprendizaje reverso a los días 1 y 4 de comenzados ambos protocolos se puede concluir que los animales EAAT3glo/CaMKII no presentan cambios en la motivación. (N= 11; Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m))

3.3.2 Prueba de aprendizaje reverso visuoespacial utilizando el laberinto acuático de Morris.

Durante esta prueba el animal debe aprender a utilizar claves visuales para guiarse y encontrar la plataforma dentro de una piscina (fase de adquisición, 7 días). Posterior a ello, en la fase de reversión, la plataforma es cambiada al cuadrante opuesto y el animal debe aprender la nueva estrategia de localización distinta a la previamente adquirida (5 días).

En la Figura 27, se muestra la progresión de los parámetros de la latencia (Figura 27A, B) y la distancia recorrida (Figura 27C,D) para alcanzar la plataforma por los animales, observándose una notoria disminución en ambos parámetros con el pasar de los días de protocolo en ambos genotipos (ANOVA de dos vías con medidas repetidas para latencia de llegada a la plataforma, $F(2,912, 32,03) = 47,60$; $P_{EAAT3glo} < 0,0001$, $P_{EAAT3glo/CaMKII} < 0,0001$; para distancia recorrida hacia la plataforma, $F(2,912, 32,03) = 47,60$, $P_{EAAT3glo} < 0,0001$, $P_{EAAT3glo/CaMKII} < 0,0001$).

Por otra parte, al comparar estos parámetros al comienzo (día 1) y al final (día 7) del protocolo de adquisición, podemos observar una disminución significativa en ambos genotipos (ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples, para latencia de llegada a la plataforma $P_{EAAT3glo} < 0,0001$, $P_{EAAT3glo/CaMKII} < 0,0001$; para distancia recorrida hacia la plataforma $P_{EAAT3glo} < 0,0001$, $P_{EAAT3glo/CaMKII} < 0,0001$) demostrando que los animales EAAT3^{glo}/CaMKII adquieren correctamente la memoria visuoespacial, de manera idéntica a los controles (Figura 27).

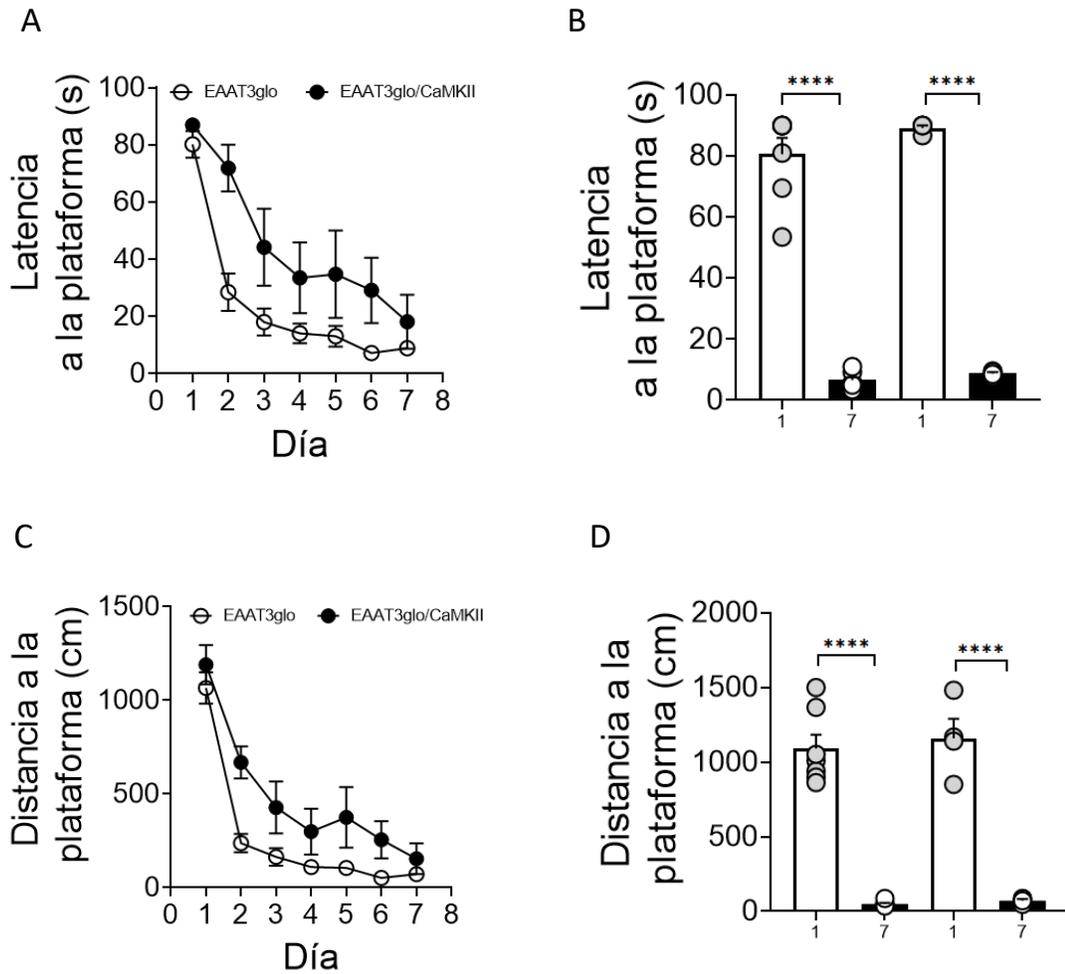


Figura 27. Animales EAAT3^{glo}/CaMKII y EAAT3^{glo} adquieren correctamente el aprendizaje visoespacial en Morris water maze. La figura muestra la latencia (A) y la distancia recorrida (C) al ir hacia la plataforma durante los 7 días de protocolo de adquisición, observándose una disminución significativa de la latencia (B) y la distancia recorrida (D) entre los días 1 y 7 en animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII. Ambos grupos adquieren correctamente la memoria visoespacial (N= 8 control; 5 EAAT3^{glo}/CaMKII; En A y C, cada círculo representa el promedio de respuestas de los animales de un grupo por día y En B y D Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m) ; ****P < 0.0001.)

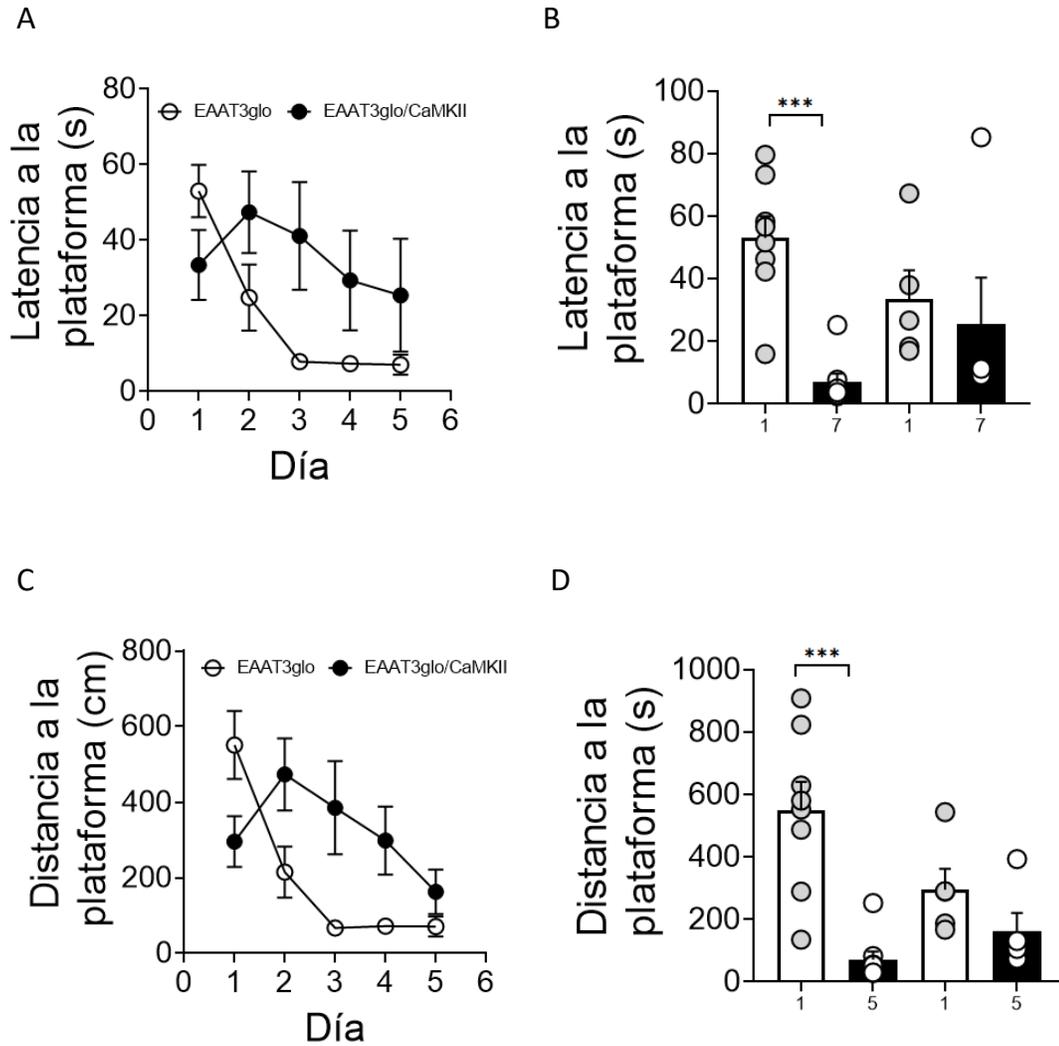


Figura 28. Animales EAAT3^{glo}/CaMKII no revierten aprendizaje visuoespacial durante Morris water maze. La figura muestra la latencia (A) y la distancia recorrida (C) al ir hacia la plataforma durante los 5 días de protocolo de aprendizaje reverso, observándose una disminución significativa de la latencia (B) y la distancia recorrida (D) entre los días 1 y 5 sólo en animales EAAT3^{glo} pero no en EAAT3^{glo}/CaMKII ($P_{Lat}=0,13$; $P_d=0,095$), lo que indica que no revierten correctamente la memoria visuoespacial (N= 8 control; 5 EAAT3^{glo}/CaMKII; En A y C, cada círculo representa el promedio de respuestas de los animales de un grupo por día y En B y D Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m) .; ***P < 0.001.)

Por otra parte, durante el protocolo de aprendizaje reverso (Figura 28), mientras los animales EAAT3^{glo} mostraron una disminución significativa en la latencia (ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples $P=0,0034$) y la distancia recorrida para alcanzar la plataforma (ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples $P=0,0008$), los animales EAAT3^{glo}/CaMKII no presentaron diferencias entre el día 1 y el día 5 (ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples $P_{latencia}=0,93$; $P_{distancia}= 0,69$), lo que sugiere que estos animales no revierten el aprendizaje previamente obtenido.

3.4 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de EAAT3 sobre el control inhibitorio en animales EAAT3^{glo}/CaMKII en el test 5-CSRT.

La prueba 5-CSRT (Five Choice Serial Reaction Time), consiste en entrenar a los ratones para que informen sobre la aparición y ubicación de breves estímulos visuales presentados de forma pseudoaleatoria en cinco ubicaciones espaciales en una matriz horizontal de aberturas. Esta tarea se puede utilizar para evaluar varios aspectos de la función ejecutiva, dependiendo del tipo de respuesta que se analice (Mar et al 2013).

3.4.1. Evaluación de atención y control inhibitorio mediante prueba 5-CSRT estándar en animales EAAT3^{glo}/CaMKII.

Con el fin de descartar que los animales EAAT3^{glo}/CaMKII presenten alteraciones de motivación, se analizó la latencia de recolección de la recompensa de animales con sobreexpresión de EAAT3 comparados a animales control, (N= 8 EAAT3^{glo} y 6 EAAT3^{glo}/CaMKII), lo que pudiera afectar observar diferencias significativas entre ambos grupos (T-test, Mann-Whitney test $P=0,54$) (Figura 29), lo que sugiere que los animales EAAT3^{glo}/CaMKII no presentan diferencias en motivación a desarrollar la tarea conductual.

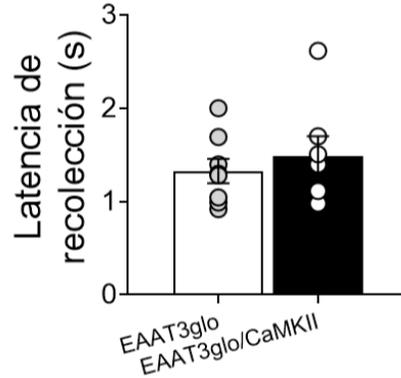


Figura 29. Animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII no muestran diferencias en motivación durante la prueba 5-CSRT estándar. El grafico muestra que no se observan cambios en la latencia de recolección de recompensa en animales EAAT3^{glo}/CaMKII en comparación con animales EAAT3^{glo}, lo que demuestra que no hay diferencia en motivación entre ambos grupos. (N= 8 EAAT3^{glo} y 6 EAAT3^{glo}/CaMKII animales; Cada circulo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m).

Luego, se determinaron los parámetros relacionados a la atención global y dirigida. Tal como se observa en la Figura 30, no se observaron diferencias en la precisión de las respuestas ejecutadas (T-test, Mann-Whitney test P=0,77) (Figura 30A), lo que sugiere que no existen alteraciones en la atención global de los animales EAAT3^{glo}/CaMKII, ni tampoco en la atención dividida/sostenida, la que está relacionada a la tasa (%) de omisión de respuestas en donde no hubo diferencias (T-test, Mann-Whitney test P=0,93) (30B).

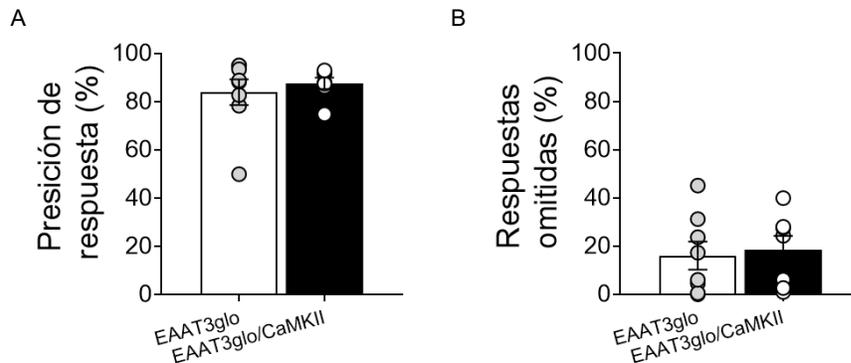


Figura 30. Animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII no muestran alteraciones en atención durante la prueba 5-CSRT standard. No se observan diferencias en porcentaje de precisión de respuesta (A) ni de respuestas omitidas (B) entre animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII sugiriendo que el proceso de atención no se ve afectado. (N= 8 EAAT3^{glo} y 6 EAAT3^{glo}/CaMKII animales; Cada circulo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m))

Por otra parte, las respuestas que dan cuenta del control inhibitorio (Número de respuestas prematuras y perseverativas) se presentan en la Figura 31. Podemos ver que tanto las respuestas prematuras (Figura 31A) como las perseverativas (Figura 31B) no mostraron cambios significativos en animales EAAT3^{glo}/CaMKII con relación a animales controles (T-test, Mann-Whitney test $P_{\text{perseverativas}}=0,91$; $P_{\text{prematuras}}= 0,098$).

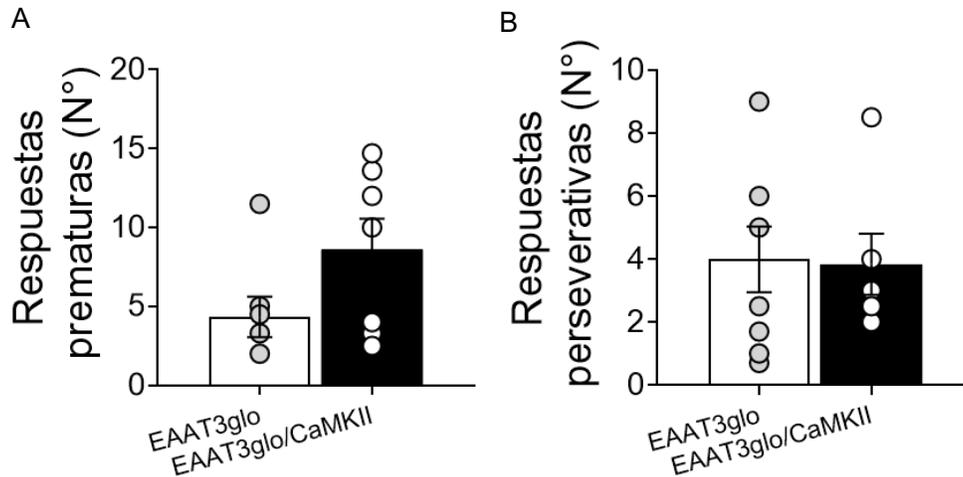


Figura 31. Animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII no muestran cambios significativos en control inhibitorio durante la prueba 5-CSRT standard. No se observan diferencias significativas en el número de respuestas prematuras (A) ni de respuestas perseverativas (B) entre animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII sugiriendo que el proceso de atención no se ve afectado. (N= 8 EAAT3^{glo} y 6 EAAT3^{glo}/CaMKII animales; Cada circulo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m))

Con el fin de evaluar si la variación de ITI y de la duración del estímulo podrían permitir detectar posibles alteraciones en los procesos de atención y/o control inhibitorio, y para evitar que las respuestas automáticas a la prueba estén interfiriendo en los resultados obtenidos, es que después de someter a los animales a la prueba estándar (duración de estímulo: 0,8 s ; ITI: 5s), se sometieron a 3 pruebas de un día, en las cuales se modificó la duración de estímulo y el ITI de forma variable y semi aleatoria durante la prueba, para así darle menos predictibilidad a la misma.

3.4.2 Evaluación del efecto de la duración de estímulo en la prueba 5-CSRT sobre la atención global y sostenida en animales EAAT3^{glo}/CaMKII.

Con el objetivo de comprobar que nuestros animales no tengan alteraciones en los distintos procesos de atención (atención global o atención dividida y sostenida) se los sometió a la prueba de variación de estímulos, en la cual se le presentan 5 trenes de 20 ensayos con

variación de estímulo semi aleatoria y cuya duración puede ser de 0.2, 0.4, 0.6 o 0.8 segundos. La interpretación de esta prueba se realizó mediante el número de repuestas omitidas y precisión de respuesta.

Para evaluar si los procesos de atención sostenida y dividida se encuentran alterados durante esta prueba, se analizó el porcentaje de precisión de respuesta (Figura 32) a distintos valores de duración de estímulo (Figura 32A) y de forma total (Figura 32B)

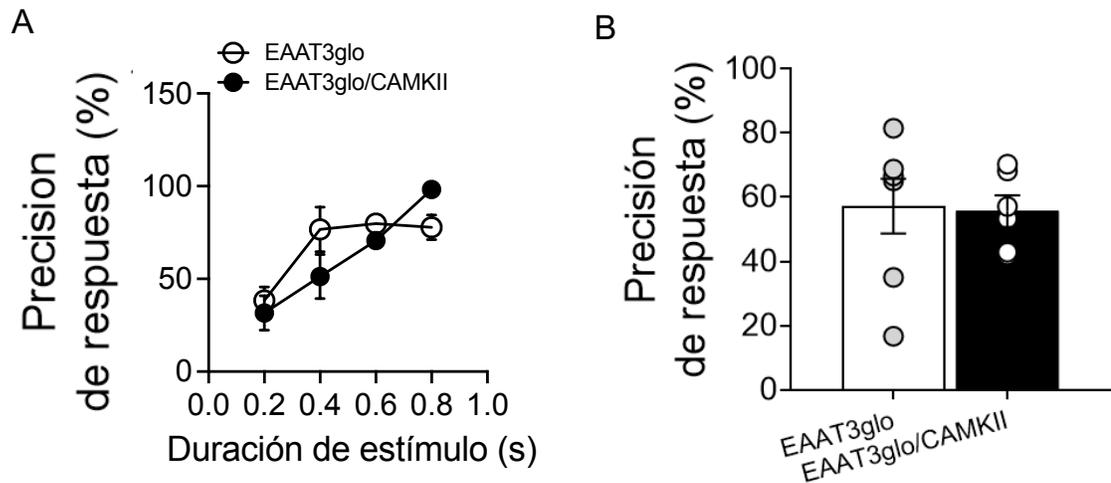


Figura 32. Animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII no muestran diferencias significativas en porcentaje de precisión de respuesta durante la prueba 5-CSRT de un día con duración de estímulo variable. (A) Porcentaje de precisión de respuestas en dependencia de la duración del estímulo en segundos. (B) Porcentajes totales en animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII (N= 8 EAAT3^{glo} y 6 EAAT3^{glo}/CaMKII animales, Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m))

Cuando analizamos el porcentaje de precisión de respuesta a diferentes valores de duración de estímulo (Figura 32 A), vemos que en ambos grupos se produce una disminución de la precisión de respuesta junto con la duración del estímulo, debido a que entre menos tiempo dure el estímulo, la tarea necesita una mayor atención y por lo tanto es más desafiante (ANOVA de dos vías con medidas repetidas, modelo mixto. $F(1, 138, 6.068) = 16.72, P = 0,0056$) Ahora, cuando comparamos entre ambos genotipos, podemos observar que los animales EAAT3^{glo}/CaMKII no muestran diferencias en la precisión de respuesta a las distintas duraciones de estímulo en relación a los animales EAAT3^{glo} (ANOVA de dos vías con medidas repetidas, modelo mixto. $F(1, 16) = 0.8777, P = 0,36$).

Por otra parte, tampoco se observaron diferencias significativas entre EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII en el porcentaje de precisión total de la prueba EAAT3^{glo} (T-test, Mann-Whitney test P=0,36). Por lo tanto, la sobreexpresión de EAAT3 en animales EAAT3^{glo}/CaMKII no tiene un efecto sobre los procesos de atención sostenida y atención dividida.

3.4.3 Evaluación del efecto de la duración del intervalo inter trial (ITI) en la prueba 5-CSRT sobre el control inhibitorio en animales EAAT3^{glo}/CaMKII.

3.4.3.1 Prueba ITI variable (ITI corto)

Al igual que la disminución de la duración de estímulo, la disminución del ITI hace que la prueba requiera una mayor atención para llevarse a cabo. Por lo que se analizaron la precisión de respuesta y el porcentaje de omisiones de forma total y a distintos valores de ITI (2, 3, 4 y 5 s).

Tal como se ve en la Figura 33, no se observaron cambios significativos en el porcentaje de precisión de respuesta total (T-test, Mann-Whitney test P=0,2) (Figura 33B) de animales EAAT3^{glo}/CaMKII en comparación con los animales EAAT3^{glo}. Mientras que a los distintos valores de ITI (Figura 33A) podemos observar que ambos grupos muestran una disminución de la precisión de la respuesta a medida que aumenta el valor del ITI (ANOVA de dos vías con medidas repetidas, modelo mixto. $F(1,618, 9,707) = 12,05$; $P = 0,0032$), sin presentarse diferencias entre ambos genotipos (ANOVA de dos vías con medidas repetidas, modelo mixto. $F(1, 6) = 0,07448$; $P = 0,794$).

Por otra parte, al analizar el porcentaje de omisiones obtenido durante toda la prueba (Figura 31D) no se observan diferencias significativas entre ambos grupos (T-test, Mann-Whitney test P=0,37), observándose también que la disminución del ITI no tiene una influencia significativa sobre el porcentaje de respuestas omitidas para ambos genotipos (Figura 33C) (ANOVA de dos vías con medidas repetidas, modelo mixto. $F(1,975, 11,85) = 0,6323$; $P=0,55$).

Estos resultados confirman que la sobreexpresión de EAAT3 no produce alteraciones en el proceso de atención de animales EAAT3^{glo}/CaMKII.

Además, debido a que se ha observado que la variación del ITI altera el número de respuestas prematuras y perseverativas (Figura 34), se analizaron estas respuestas con el fin de ver como la disminución del ITI afecta al control inhibitorio en animales EAAT3^{glo}/CaMKII.

Como se puede ver en la Figura 34B la disminución del ITI no afecta el porcentaje de respuestas prematuras en animales EAAT3^{glo}/CaMKII con respecto a animales EAAT3^{glo} (T-test, Mann-Whitney test P=0,91) (Figura 34A), así mismo, la disminución de este parámetro no afecta de forma significativa al porcentaje respuestas perseverativas (ANOVA de dos vías con medidas repetidas, modelo mixto. $F(2,241, 12,70) = 2,563$; $P=0,11$).

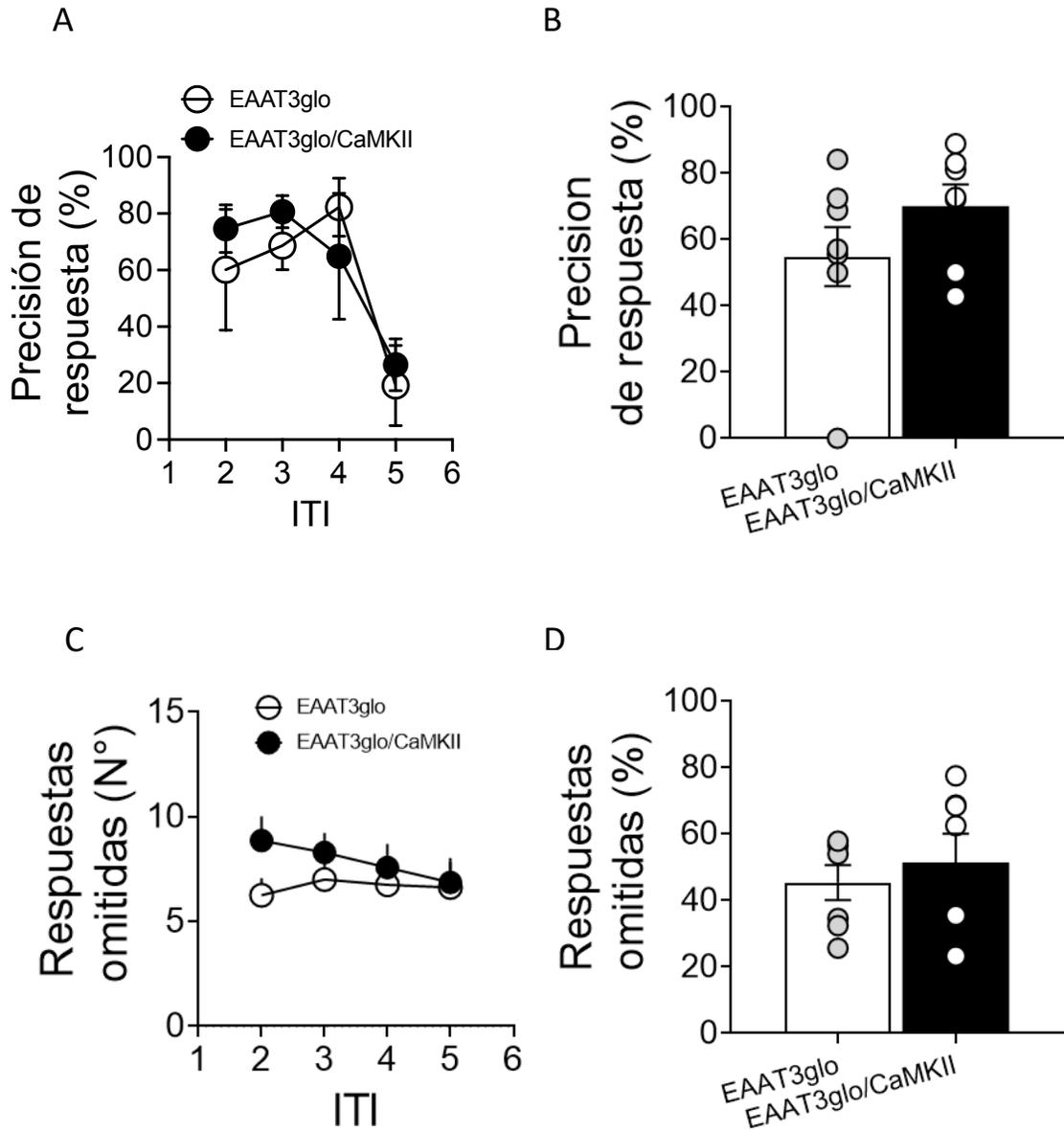


Figura 33. Animales EAAT3^{glo}/CaMKII no muestran alteraciones en atención durante prueba de un día de ITI variable (ITI corto) No se observaron cambios significativos en el porcentaje de precisión de respuesta a distintas duraciones de ITI (A) y totales (B). Tampoco hubo cambios significativos en el porcentaje de respuestas omitidas a distintos valores de ITI (C) y totales (D) entre animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII durante la prueba de un día de ITI variable (corto). Animales EAAT3^{glo}/CaMKII no presentan alteraciones en atención durante esta prueba (N= 8 EAAT3^{glo} y 6 EAAT3^{glo}/CaMKII animales; En A y C, cada círculo representa el promedio de respuestas de los animales de un grupo por día y En B y D Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m)).

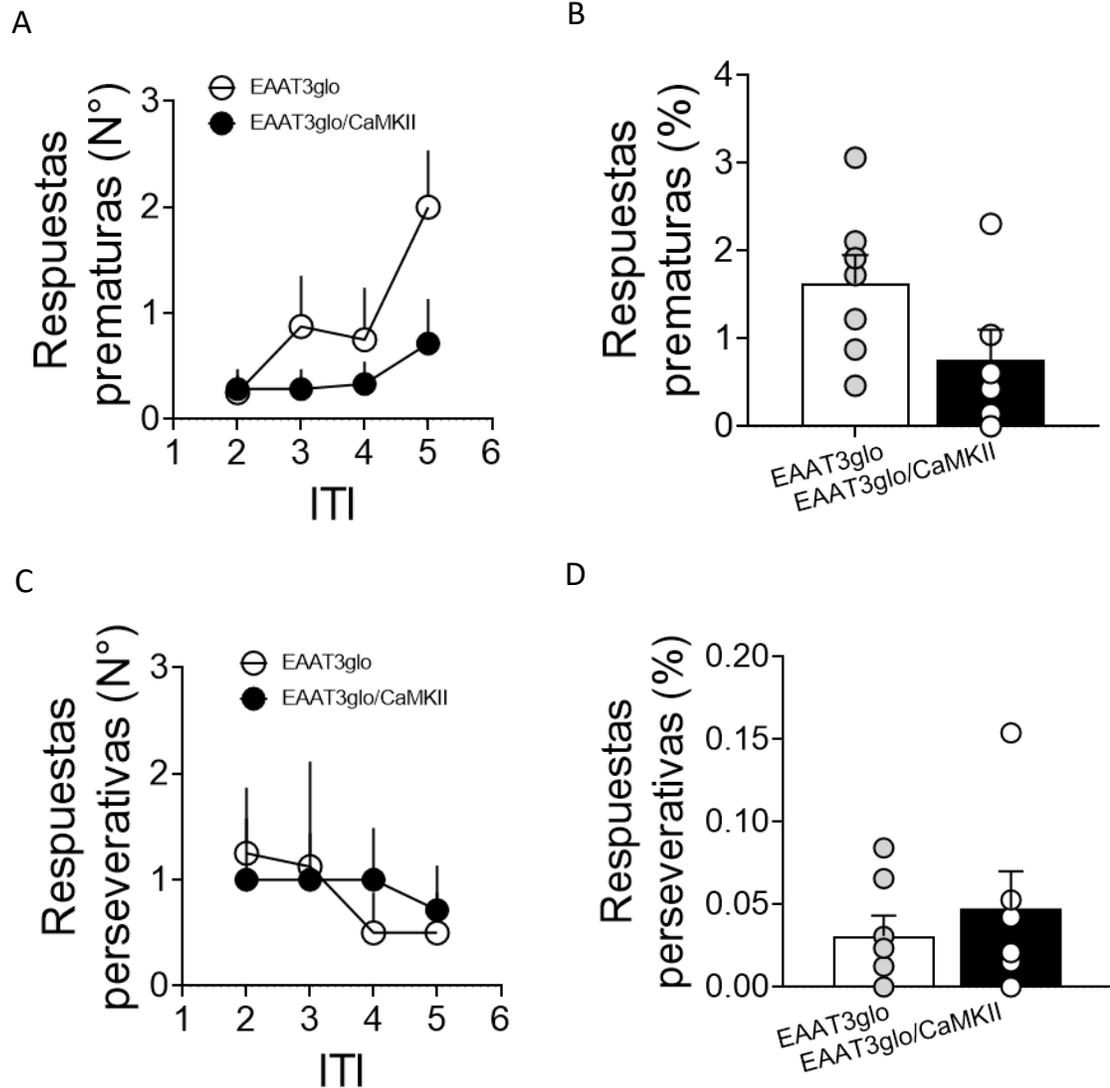


Figura 34. Animales EAAT3^{glo}/CaMKII no muestran cambios en control inhibitorio comparado a animales EAAT3^{glo} en prueba de un día de ITI variable (corto). No se observaron cambios significativos en el porcentaje de respuestas prematuras a distintas duraciones de ITI (A) y totales (B) ni en porcentaje de respuestas perseverativas a distintas duraciones de ITI (C) y totales (D) en animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII durante la prueba de un día de ITI variable (corto). Animales EAAT3^{glo}/CaMKII no presentan alteraciones en atención durante esta prueba (N= 8 EAAT3^{glo} y 6 EAAT3^{glo}/CaMKII animales; En A y C, cada círculo representa el promedio de respuestas de los animales de un grupo por día y En B y D Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m)

Ahora, cuando analizamos las respuestas perseverativas (Figura 34D) vemos que al igual que con las respuestas prematuras, no hay diferencia a nivel global EAAT3^{glo} (T-test, Mann-Whitney test $p=0,65$) entre animales EAAT3^{glo}/CaMKII y EAAT3^{glo} y tampoco se observan influencias de la disminución del valor de ITI (ANOVA de dos vías con medidas repetidas, modelo mixto. $F(1,448, 8,688) = 1,578$; $P=0,25$) o del genotipo (ANOVA de dos vías con medidas repetidas, modelo mixto. $F(1, 6) = 0,02186$; $P=0,88$).

3.4.3.2 Prueba de ITI variable (ITI Largo)

Se ha descrito que el aumento en la duración del ITI aumenta el número de respuestas prematuras en la prueba 5-CSRT (Asinof & Paine, 2014). Por ello, evaluamos la modificación de este parámetro para develar posibles alteraciones en el control inhibitorio de nuestro modelo animal. La FIGURA 35 muestra que, mientras en los animales EAAT3^{glo} el número de respuestas prematuras aumentó progresivamente, en los animales EAAT3^{glo}/CaMKII este valor no cambió durante los primeros 3 ITIs (5, 6 y 7 s) y aumentó bruscamente a 8 s (35A), sin embargo no se observan diferencias en el porcentaje de respuestas prematuras (T-test, Mann-Whitney test $p=0,092$; Figura 35B) ni perseverativas totales (T-test, Mann-Whitney test $p=0,51$; Figura 35C).

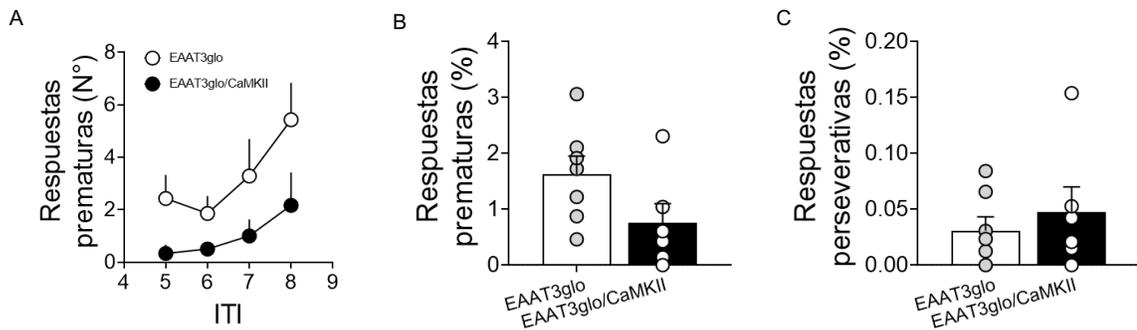


Figura 35. Animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII no muestran diferencias significativas en número de respuestas prematuras ni perseverativas durante la prueba de un día de duración de ITI variable (largo). (A) Porcentaje de respuestas prematuras a distintas duraciones de ITI, (B) prematuras totales y (C) perseverativas totales en animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII (N= 8 EAAT3^{glo} y 6 EAAT3^{glo}/CaMKII; En A, cada círculo representa el promedio de respuestas de los animales de un grupo por día y En B y C Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m)

3.5 Evaluación del efecto de la sobreexpresión de EAAT3 sobre la memoria de trabajo en animales EAAT3^{glo}/CaMKII.

3.5.1. Evaluación de la memoria de trabajo mediante el uso de la prueba TUNL (Trial Unique Nonmatching to Location).

Para evaluar la memoria de trabajo en animales EAAT3^{glo}/CaMKII, se utilizó la prueba TUNL. Tal como se explicó en la sección 2.3.3.2, esta prueba consta de 3 fases, una de pre-entrenamiento, en la cual se le enseña al animal el uso de las pantallas táctiles y a realizar la tarea, una fase de entrenamiento o adquisición en la cual se le enseña al animal a hacer la tarea completa y una fase de prueba en la cual se cambian ciertos parámetros para ver como influyen en la realización de la tarea.

Para esto, ocho animales controles y de sobreexpresión (EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII, respectivamente) fueron sometidos a este protocolo. En primera instancia, y dada la complejidad de la tarea a realizar, se evaluó el desempeño de ambos grupos de animales en la fase de preentrenamiento para la prueba TUNL. Esta fase consta de 6 etapas las cuales se encuentran descritas en la sección 2.3.3.2 y de las cuales se analizaron las últimas 3.

Para evaluar el desempeño de nuestros animales en estas etapas, se analizó, para cada etapa, el número de sesiones que demoraron en llegar al criterio requerido.

Nuestros resultados muestran que los animales EAAT3^{glo}/CaMKII requieren de una mayor cantidad de sesiones para completar las distintas etapas de preentrenamiento, siendo esta diferencia significativamente más alta (T-test, Mann-Whitney test $P=0,0577$; Figura 36C) en la etapa en la cual se castigan las respuestas incorrectas con uno o más ensayos de corrección (Punish incorrect training). Dado que, según el protocolo utilizado, para realizar la prueba los animales deberían demorarse aproximadamente 2-3 sesiones en superar esta etapa, los animales que demoraron más de 15 sesiones en alcanzar el criterio fueron descartados de la prueba, por lo que solo pasaron a la etapa de adquisición 8 animales EAAT3^{glo} y 3 animales EAAT3^{glo}/CaMKII, Es decir, el 75% de los animales que sobre expresan EAAT3 no lograron pasar a la etapa de adquisición.

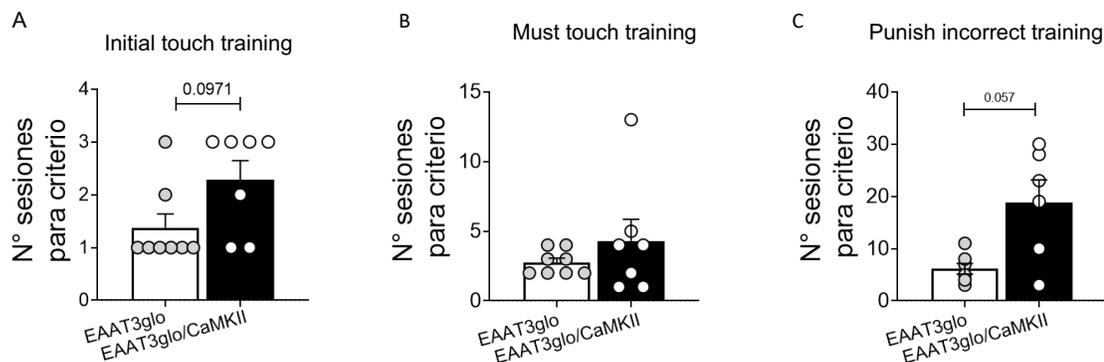


Figura 36 Animales EAAT3^{glo}/CaMKII requieren significativamente más sesiones que los animales EAAT3^{glo} para alcanzar el criterio de adquisición en las fases de pre entrenamiento para la prueba TUNL. (A), Número de sesiones necesarias para alcanzar el criterio en fase Initial Touch Training de animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII (B), Número de sesiones necesarias para alcanzar el criterio en fase Must Touch Training de animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII. (C), Número de sesiones necesarias para alcanzar el criterio en fase; Punish Incorrect Training de animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII (N= 8 animales EAAT3^{glo} y 7 animales EAAT3^{glo}/CaMKII; Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m)

Una vez que sometimos a los animales al protocolo de adquisición, pudimos ver que mientras todos los animales control lograron pasar exitosamente las 3 etapas de la fase 1 (Figura 37A), uno de los animales EAAT3^{glo}/CaMKII, requirió más de 80 sesiones para completar la etapa S1S1, por lo que solo 2 de los 3 animales EAAT3^{glo}/CaMKII lograron pasar a la fase 2.

Del mismo modo, todos los animales EAAT3^{glo} lograron terminar las 3 etapas de la fase 2 de adquisición (Figura 37B), mientras que los animales EAAT3^{glo}/CaMKII, no lograron pasar a la última etapa de la segunda fase de adquisición, requiriendo más de 30 sesiones para poder completar la etapa S2S0, cantidad de sesiones que es significativamente mayor (T-test, Mann-Whitney test p=0,0002; Figura 37B), que las que necesitaron los 8 animales control. Por lo que según estos resultados podemos concluir que los animales que sobre expresan EAAT3 en las neuronas principales del cerebro anterior no adquieren correctamente el aprendizaje necesario para realizar la prueba TUNL.

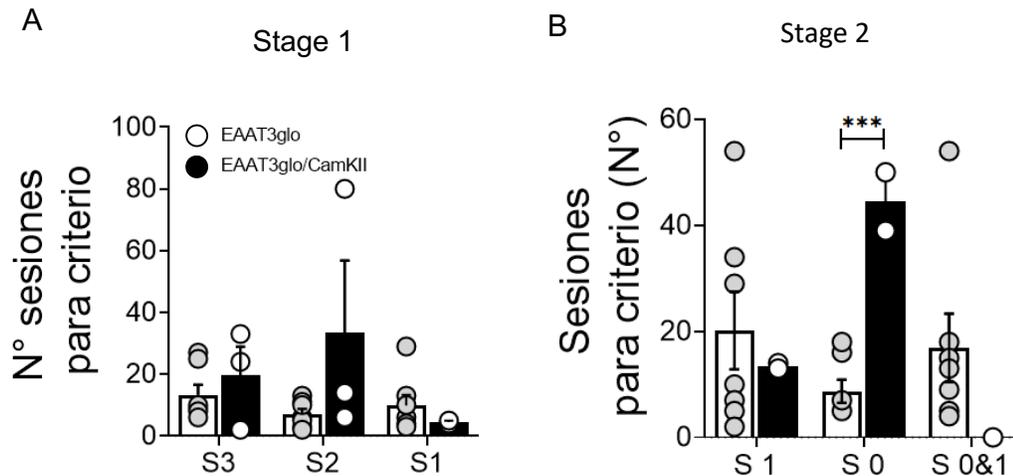


Figura 37. Animales EAAT3glo /CaMKII no adquieren correctamente el aprendizaje necesario para realizar la prueba TUNL. (A), Número de sesiones necesarias para alcanzar el criterio en 1 de la etapa de adquisición de la prueba TUNL en animales EAAT3glo y EAAT3glo/CaMKII **(B),** Número de sesiones necesarias para alcanzar el criterio en fase 2 de la etapa de adquisición de la prueba TUNL en animales EAAT3glo y EAAT3glo/CaMKII (*N*= 8 animales EAAT3glo y 2 animales EAAT3glo/CaMKII; Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m))

3.5.2 Evaluación de la memoria de trabajo en animales EAAT3^{glo}/CaMKII. Mediante el uso de la prueba de alternancia espontánea en T-maze.

Dados los resultados obtenidos en la prueba TUNL que sugieren un posible deterioro en la memoria de trabajo de los animales EAAT3^{glo}/CaMKII, lo cual les impide progresar en las etapas de esta prueba compleja, decidimos utilizar una aproximación más simple de esta función ejecutiva utilizando la prueba de alternancia espontánea en T-maze. La alternancia espontánea se refiere a la capacidad del animal para cambiar de manera efectiva su comportamiento en función de la información anterior y la experiencia previa. Esta prueba específicamente se aprovecha de la tendencia natural de los roedores a preferir explorar un sector novedoso a uno familiar, lo que los lleva a alternar entre un brazo objetivo y el otro (d’Isa et al, 2021). Según d’Isa et al, 2021 los animales con la memoria de trabajo intacta presentan un índice de alternancia significativamente mayor a 50% ($P \leq 0,05$ en One sample T-test).

De esta forma, cómo vemos en la Figura 39, mientras los animales EAAT3^{glo} cumplen con este criterio (One sample T-test and wilcoxon test $P=0,054$), mientras que los animales EAAT3glo/CaMKII no presentan un índice de alternancia superior al 50% (One sample T-test and wilcoxon test $P=0,84$). Estos resultados sugieren un deterioro de la memoria de trabajo debido a la sobre expresión de EAAT3 en las neuronas principales del cerebro anterior de este modelo.

Por otra parte, al analizar la latencia de elección a través de los distintos ensayos y de forma total, se puede ver que no hay diferencia entre los distintos genotipos (ANOVA de dos vías con medidas repetidas, modelo mixto. $F(6, 120) = 0,6448$; $P=0,69$), lo cual da cuenta de que nuestros animales no tienen alterado el proceso de toma de decisión y que nuestros resultados se deben a una alteración en la memoria de trabajo (Figura 38).

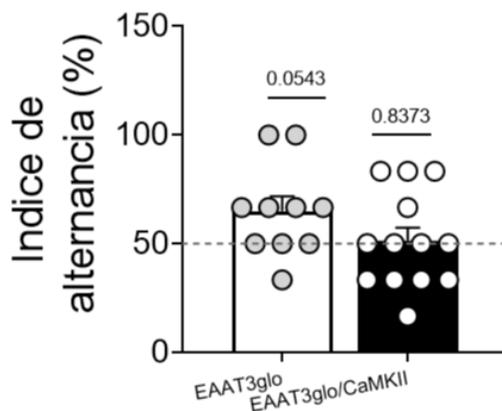


Figura 38. Sobre expresión de EAAT3 altera el proceso de memoria de trabajo en la prueba de alternancia espontánea en T maze. Índice de alternancia espontánea en animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII ($N_{EAAT3^{glo}} = 11$ $N_{EAAT3^{glo}/CaMKII} = 13$; One sample T-test and wilcoxon test $P_{EAAT3^{glo}} = 0,054$ $P_{EAAT3^{glo}/CaMKII} = 0,84$; Cada círculo representa un animal y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m).

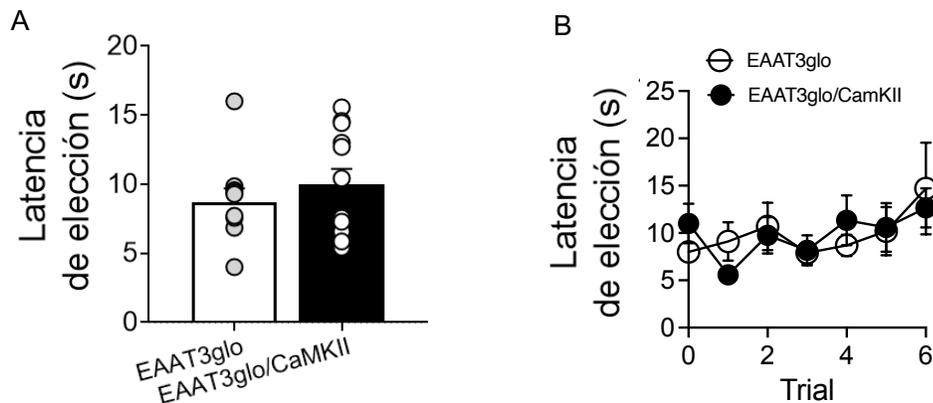


Figura 39. Sobre expresión de EAAT3 no altera el proceso de toma de decisiones en la prueba de alternancia espontánea en T-maze. Latencia de elección en animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII (A), Progresión de la latencia de elección en animales EAAT3^{glo} y EAAT3^{glo}/CaMKII a través de los ensayos realizados en la prueba de alternancia espontánea. ($N_{EAAT3^{glo}} = 11$ $N_{EAAT3^{glo}/CaMKII} = 13$; En A cada círculo representa un animal, en B cada círculo representa el promedio de respuestas de los animales de un grupo por día y las barras representan el promedio más el error estándar (Mean±s.e.m).

4. DISCUSIÓN

El propósito de esta tesis fue evaluar las consecuencias de la sobreexpresión del transportador neuronal de glutamato EAAT3 sobre el correcto funcionamiento de las funciones ejecutivas, específicamente sobre el control inhibitorio, la flexibilidad cognitiva y la memoria de trabajo mediante el uso de pruebas conductuales de condicionamiento operante y aprendizaje visoespacial en el ratón EAAT3^{glo}/CaMKII que sobre expresa EAAT3 en las neuronas principales del cerebro anterior (Delgado et al., 2019), como un modelo animal relevante para el estudio de la compulsividad y el TOC. Nuestros resultados demuestran que los animales EAAT3^{glo}/CaMKII presentan disfunciones ejecutivas; específicamente, la sobreexpresión de EAAT3 causa un mal desempeño de estos animales en pruebas relacionadas a flexibilidad cognitiva y memoria de trabajo, pero que no impacta los aspectos de atención ni control inhibitorio evaluados en este estudio.

Durante los últimos años, se ha puesto especial énfasis en el estudio de la disfunción ejecutiva como un endofenotipo de TOC, esto debido a una alta prevalencia de éstas disfunciones en parientes de personas afectadas con TOC pero que no poseen este diagnóstico (Zartaloudi et al 2019). Proponiendo entonces, a estos déficits en funciones ejecutivas como posibles biomarcadores de vulnerabilidad/resiliencia para este trastorno.

Nuestros hallazgos sugieren que la sobreexpresión de EAAT3 impacta de manera diferencial a las distintas funciones ejecutivas, y al mismo tiempo afecta a dominios comportamentales mucho más amplios que los originalmente descritos en este modelo, lo que confiere una mayor relevancia al rol que posee este transportador en el desarrollo de la sintomatología compulsiva y la vulnerabilidad a desarrollarla.

4.1 La sobreexpresión de EAAT3 produce un deterioro en el proceso de extinción de memorias.

La evidencia experimental en animales sugiere que alteraciones en la maquinaria glutamatérgica afectan el desempeño de ratones en distintas pruebas conductuales que evalúan funciones ejecutivas. Por ejemplo, la administración de fármacos antagonistas de los receptores de glutamato NMDA afectan el desempeño de ratones en tareas que evalúan memoria de trabajo (TUNL) (Davis et al 2017), flexibilidad cognitiva (Kumar et al 2015), y control inhibitorio (5CSRTT) (Benn et al 2014).

Por otra parte, el ratón SAPAP3 KO, que carece de la proteína de andamiaje de la sinapsis glutamatérgica SAPAP3, es capaz de adquirir un aprendizaje pavloviano, pero carece de flexibilidad para adaptar el comportamiento de enfoque condicionado asociado, lo que da

cuenta de la presencia de inflexibilidad cognitiva en estos animales (Van den boom et al 2019; Benzina et al 2021). Sin embargo este modelo no muestra déficits en la extinción de este aprendizaje. En específico, Pruebas de aprendizaje operante realizadas por el grupo de Denys en 2020, no arrojaron déficits en adquisición ni extinción de este aprendizaje (Ehmer et al, 2020).

Importantemente, nuestro modelo de ratón EAAT3^{glo}/CaMKII presenta, a nivel comportamental, aumentos en conductas compulsivas y ansiosas basales, mientras que a nivel cognitivo presenta, déficits la extinción a largo plazo de la memoria de condicionamiento del miedo (aprendizaje pavloviano) (Delgado-Acevedo et al, 2019). En esta tesis, encontramos que estos animales además adquieren correctamente el aprendizaje operante, aumentando significativamente las respuestas activas y disminuyendo significativamente las inactivas (Figura 18). Sin embargo, al momento de someterlos a un protocolo de extinción del condicionamiento operante, en el cual no se entrega recompensa alguna al tocar los agujeros, los animales con sobreexpresión del transportador no extinguen correctamente este comportamiento (Figura 22), dando cuenta de un deterioro en la extinción del condicionamiento operante en este modelo animal, lo cual se encuentra en concordancia con lo observado en otros modelos animales.

Algunos autores han sugerido previamente que la extinción del aprendizaje (ya sea de tipo operante u otro) no se trata solo de “desaprender” u “olvidar la memoria anterior”, si no que consiste en un nuevo procesamiento de información y por lo tanto un nuevo aprendizaje (Pavlov 1927; Gass & Chandler 2013). Dado que la formación de esta nueva memoria requiere dejar de lado una regla ya adquirida, para dar paso a la adquisición de una nueva regla y responder a ella (comportamiento objetivo dirigido), es que es un proceso que requiere del uso de las funciones ejecutivas, por lo cual, un deterioro de este proceso sugiere la presencia de una disfunción ejecutiva en este modelo animal.

Al respecto, se ha descrito el rol del sistema glutamatérgico en procesos de extinción de memorias. Por ejemplo, se ha visto que la administración del agonista glutamatérgico D-Cicloserina produce la facilitación de la extinción del aprendizaje operante en ratones (Shaw et al, 2009; Leslie et al, 2012). A su vez, el circuito neural principalmente asociado mayormente con el proceso de extinción se encuentra compuesto por mPFC, BLA e hipocampo las cuales se encuentran interconectadas por vías que son en su mayoría glutamatérgica (Myers et al 2011).

En este mismo sentido, algunos estudios involucran la administración sistémica de antagonistas del receptor NMDA antes del entrenamiento de extinción del miedo con alteraciones de la extinción tanto dentro de la sesión como de la retención de esta (Myers et al). Así mismo se vio alterado este proceso al administrar sistémicamente el antagonista de NMDA inmediatamente después del entrenamiento de extinción, lo que indica que los receptores NMDA

están involucrados en la consolidación y codificación de la memoria de extinción (Myers et al, 2011). Por ejemplo, trabajos realizados en ratones han demostrado que los agonistas de NMDA facilitan la extinción del miedo. Más específicamente, la activación de los receptores NMDA en la corteza infra límbica parece mediar el aumento de la neurotransmisión del glutamato durante la consolidación del aprendizaje de la extinción (Davis et al 2011).

Del mismo modo, se ha propuesto que tanto los procesos de extinción de memorias de miedo y su consolidación, los cuales requieren un control fino y adecuado de los niveles de glutamato, se encuentran alterados en el TOC, lo que resulta en un aumento de conductas compulsivas producto del intento de “deshacerse” del miedo (y sus gatillantes) que experimentan las personas afectadas con TOC (Karthik et al, 2020). En este sentido, nuestros resultados contribuyen al campo de estudio del TOC al realzar el impacto que tiene a nivel comportamental los cambios que ocurren al manipular los niveles de expresión y actividad de EAAT3, uno de los controladores de los niveles de glutamato en el cerebro.

Al respecto, análisis clínicos han demostrado que una disminución en los niveles de glutamato en vmPFC se correlacionan con un peor desempeño en pruebas de extinción de memorias de miedo en pacientes con TOC (Giménez et al 2019). Así mismo, se ha descrito que la efectividad de terapia de estimulación magnética transcraneal (TMS) se correlaciona directamente con aumentos en los niveles de glutamato en el estriado de pacientes (Wang et al, 2023). De esta forma, podríamos hipotetizar que una sobreexpresión de EAAT3 estaría disminuyendo los niveles locales de glutamato, lo cual afectaría los mecanismos de extinción de la memoria de miedo en pacientes, lo cual va en línea con los resultados presentados en este trabajo.

Sin embargo, no toda la evidencia apunta en la misma dirección; el trabajo de Biria et al, 2023 muestra que el aumento de los niveles de glutamato en el cíngulo anterior se asocia con un mayor índice de síntomas TOC. No obstante, este mismo estudio muestra que el balance E/I, inferido a través de niveles de la razón glutamato:GABA medidos por la técnica $^1\text{H-MRS}$, se encuentra alterado en pacientes con TOC comparado con sujetos controles, lo que reafirma la importancia del adecuado funcionamiento de los mecanismos de captura de glutamato en los procesos cerebrales y demuestra como su alteración puede impactar en el desarrollo de conductas compulsivas.

Debido a que existen evidencias dispares con respecto al aumento o disminución de los niveles de glutamato en distintas áreas cerebrales de pacientes con TOC, resulta relevante considerar a futuro estudios que determinen la expresión diferencial de EAAT3 en distintas áreas cerebrales, y particularmente en las diversas subáreas de corteza (*i.e.*, PFC vs AAC) y su implicancia en procesos cognitivos relacionados a ellas, en modelos animales relevantes para esta patología, como proponemos es el ratón EAAT3^{glo}/CaMKII.

4.2 El ratón EAAT3^{glo}/CaMKII como modelo de estudio de funciones ejecutivas.

Las funciones ejecutivas son una serie de procesos que se encuentran involucrados en funciones cognitivas complejas, por lo cual, cuando estos sistemas fallan, el comportamiento se vuelve mal controlado, desarticulado y desinhibido. Debido a esto, no es sorprendente que las alteraciones en dichas funciones estén ampliamente ligadas a diversos trastornos y enfermedades del sistema nervioso central entre los que se encuentra el TOC (Mar et al 2013; Elliot 2003).

Pruebas cognitivas realizadas en pacientes con TOC han reportado que en comparación con controles, el grupo con TOC poseen peores puntuaciones en pruebas relacionadas a flexibilidad cognitiva, alteraciones que no se ven disminuidas con el uso de medicamentos (Rosa-Alcazar et al 2019), de esta misma forma, Giuliani et al reportaron inflexibilidad cognitiva en pacientes con TOC de verificación excesiva y que esta se encuentra asociada con la carencia o disminución de la auto agencia o voluntad fenoménica en los pacientes (Giuliani et al 2021).

Nuestros resultados muestran que, en comparación con animales control, los animales EAAT3^{glo}/CaMKII presentan un deterioro en la reversión del aprendizaje operante adquirido previamente, no mostrando diferencias en su performance entre el día 1 y el día 4 del protocolo de aprendizaje reverso, lo que refleja un deterioro de la flexibilidad cognitiva en aprendizaje operante, y que concuerda con los datos clínicos anteriormente mencionados.

Por otra parte, es importante recordar que el modelo SAPAP3 KO, carente de una proteína crucial para el andamiaje de sinapsis glutamatérgicas, también presenta inflexibilidad cognitiva tanto a nivel pavloviano como a nivel instrumental (Benzina et al 2021; Van dem Boom et al 2019; Manning et al 2019). Lo mismo se observó en el modelo murino Deer, el cual es un modelo de comportamiento tipo compulsivo y que presenta alteraciones en la prueba de alternancia continua en T-maze, lo que sugiere alteraciones de la flexibilidad cognitiva en este modelo (de Brower et al 2021). Estos hallazgos refuerzan la idea de que una alteración del sistema glutamatérgico se encuentra asociado a una disfunción ejecutiva en modelos de compulsividad.

De manera interesante, se ha descrito la implicancia de el hipocampo en pruebas de aprendizaje reverso en ratas (Dong et al, 2013). Por otra parte, recientemente se reportó mediante estudios en humanos, que la vía PFC-tálamo-hipocampo juega un rol fundamental en las tareas de aprendizaje reverso (Vilá-Balló et al 2017). Es por esta razón que también se realizó la prueba de aprendizaje reverso en el Morris-Water Maze, la cual, al tratarse de aprendizaje visoespacial, posee una mayor influencia hipocampal. En esta prueba observamos que los animales EAAT3^{glo}/CamKII tampoco revierten el aprendizaje visoespacial adquirido anteriormente, no mostrando cambios ni en la distancia recorrida ni en la latencia de llegada a la plataforma durante

el protocolo de aprendizaje reverso. Esto nos da cuenta de que la sobre expresión de EAAT3 altera el proceso de flexibilidad cognitiva tanto en aprendizaje visoespacial, como en aprendizaje operante.

Recientemente, se ha descrito que EAAT3 modula la excitabilidad de las neuronas M1-MSN en el DLS, lo cual tendría implicancias en la flexibilidad conductual en ratones (Petroccione et al, 2023). Este hallazgo apoya la participación de este transportador en procesos de flexibilidad cognitiva. Esta función ejecutiva es la capacidad mental para cambiar perspectivas espacial o interpersonalmente. En modelos animales, este concepto se refiere generalmente a la habilidad de cambiar su respuesta comportamental de acuerdo con un contexto o situación (Scott et al 1962). Algunos autores postulan que esta función ejecutiva tiene diversos componentes y que requiere del correcto funcionamiento de los procesos de memoria de trabajo y control inhibitorio (Jurado & Rosselli 2007).

Es por esta razón que, si se quiere saber específicamente qué función ejecutiva se encuentra dañada, es necesario realizar tareas donde se pueda aislar lo más posible una función ejecutiva de las otras (Mar et al 2013) En este caso, las tareas que utilizamos para evaluar la flexibilidad cognitiva no poseen esta característica, por lo tanto, no podemos atribuir el déficit en estas tareas de aprendizaje reverso solamente a una alteración en la flexibilidad cognitiva. Es decir que, aunque es muy posible que estos resultados se deban a que los animales EAAT3^{glo}/CaMKII no son capaces de abandonar la regla previamente aprendida, también es posible que se deban a la existencia de conductas perseverativas en los animales o a que no son capaces de recordar la nueva regla.

Con el propósito de utilizar pruebas de comportamiento operante que sí permitan aislar los distintos componentes de las funciones ejecutivas, a diferencia de las anteriores, se utilizaron las pruebas 5CSRTT y TUNL para evaluar control inhibitorio y memoria de trabajo, respectivamente. Para la realización de estas pruebas se utilizaron las cámaras operantes con pantalla táctil Bussey-Saksida que entregan la facultad de poder analizar más finamente el comportamiento de los animales durante las distintas pruebas y así poder aislar más certeramente una función ejecutiva de la otra y tienen como ventaja su alto grado de traslación con las pruebas realizadas en humanos (Mar et al 2013)

Pruebas cognitivas realizadas a pacientes con TOC arrojaron que, en comparación con controles sanos, estos pacientes obtuvieron resultados significativamente peores en la inhibición selectiva de sus respuestas motoras (GO/NO-GO) y en la inhibición de la interferencia cognitiva (STROOP), y también mostraron un peor rendimiento en la supresión de respuestas motoras previamente desencadenadas (STOP) (Penades et al 2006). Junto con esto, Macini et al

reportaron que en un estudio realizado en niños/adolescentes con TOC, tanto la inhibición reactiva como la proactiva estaban alteradas, siendo el nivel de deterioro directamente proporcional con la gravedad de los síntomas del TOC (Macini et al 2018) dando cuenta de déficits en control inhibitorio (Penades et al 2006; Macini et al 2018; Mirabella 2020).

Nuestros resultados indican que los animales EAAT3^{glo}/CaMKII no muestran diferencia en su desempeño en la 5CSRTT, tanto en la prueba básica como en los desafíos de 1 día en los que se presentan de forma aleatoria diferentes duraciones de estímulo o diferentes intervalos inter ensayos (ITI); es decir que no tienen alteraciones de control inhibitorio (impulsividad y compulsividad) ni en atención (atención global y atención sostenida).

Estos resultados no se corresponden con los hallazgos clínicos en TOC. Sin embargo, evidencia pre clínicas utilizando el modelo SAPAP3KO también describieron que no se observaron alteraciones en el control inhibitorio en pruebas de aprendizaje operante. Esto sugiere que las diferentes manifestaciones de compulsividad podrían deberse a mecanismos independientes a nivel de circuitos cerebrales, que se afecten de manera por las manipulaciones genéticas que presenta cada modelo. En este sentido, considerando la alta heterogeneidad y complejidad genética de las patologías psiquiátricas, es muy improbable que un único modelos genético logre replicar la totalidad de las dimensiones comportamentales que se observan en individuos afectados con TOC u otra condición. Y al mismo tiempo, el hallazgo de los cambios en niveles de expresión de EAAT3 afecten a algunas, pero no todas las funciones ejecutivas, permite relacionar dichos cambios de manera más específica a ciertos componentes del funcionamiento cerebral, lo que resulta relevante a la hora de considerar conductas específicas como potenciales endofenotipos de compulsividad.

Así mismo, podríamos hipotetizar que las conductas repetitivas observadas anteriormente en nuestro modelo (Delgado-Acevedo et al 2019 , Escobar et al 2021) no poseen un componente cognitivo, si no, más bien podrían ser alteraciones en circuitos motores, tal como opera parte del circuito CSTC, que es modulado por proyecciones dopaminérgicas y que se encuentra ampliamente involucrado en TOC. Este supuesto que se ve reforzado mediante el trabajo de Muhammad, en el cual reportan que la sobre expresión del transportador neuronal de glutamato EAAT3 en neuronas dopaminérgicas se encuentra asociada al aumento de conductas estereotípicas (Muhammad et al, 2022).

Por otra parte, nuestros resultados señalan que los animales con sobreexpresión de EAAT3, en comparación con animales control, si muestran un desempeño significativamente deficiente en la fase de adquisición de la prueba TUNL para la evaluación de memoria de trabajo y separación de patrones, no cumpliendo con los criterios necesarios para terminar la fase de

adquisición de la prueba sin poder pasar a la fase de prueba, dando cuenta de una posible alteración en la memoria de trabajo. Este hallazgo fue confirmado mediante la prueba de alternancia espontánea en T-maze, en la cual los animales EAAT3^{9lo}/CaMKII no cumplen con el criterio de alternancia, dando cuenta de que la sobre expresión de EAAT3 en las neuronas principales del cerebro anterior, produce un daño a la memoria de trabajo.

En acuerdo con nuestros resultados, el modelo de compulsividad generado mediante la disminución de la transmisión histaminérgica central también presenta alteraciones en la prueba de alternancia espontánea en T-maze sugiriendo un déficit en la memoria de trabajo y/o flexibilidad cognitiva (Verma et al 2018). Sin perjuicio de esto, y según nuestro conocimiento, este es el primer estudio en el que se reportan alteraciones a nivel de memoria de trabajo tanto en aprendizaje operante como visoespacial en un modelo genético con alteraciones relevantes para TOC.

Estos hallazgos van en línea con la literatura clínica. En el año 2009 Nakao y colaboradores realizaron un estudio en pacientes con TOC mediante el uso de una batería de pruebas neurofisiológicas combinadas con métodos de imagen funcional (fMRI) demostrando la existencia de un déficit en memoria de trabajo asociado a una sobreactivación cortical de los pacientes comparados con un grupo control, siendo los pacientes con obsesiones y comprobación excesiva los que mostraban una mayor severidad en las alteraciones (Nakao et al 2009). Esto se ve reafirmado por un metaanálisis realizado por Abramovitch y colaboradores donde describen la presencia de alteraciones en memoria de trabajo visoespacial, no verbal y verbal en pacientes con TOC (Abramovitch et al 2013), mientras que un trabajo reciente del grupo de Kim, reporta que la alteración en la actividad oscilatoria beta en la corteza prefrontal de pacientes con TOC podría estar relacionada a el deterioro en la eliminación de información de la memoria de trabajo el cual podría ser un mecanismo clave que subyace a la incapacidad de los pacientes con TOC para deshacerse de sus obsesiones (Boo et al 2023).

Es importante aclarar que tanto las pruebas de condicionamiento operante simple como las que se realizaron en las cajas Bussey & Zaksida, poseen un fuerte componente motivacional debido al uso de recompensa para la adquisición del aprendizaje, es por esto por lo que se realizaron pruebas para comprobar que los resultados obtenidos no se debían a alteraciones motivacionales en nuestros animales (Figura 26 para condicionamiento operante simple y figura 29 para pruebas 5CSRTT y TUNL).

4.3 Uso del condicionamiento operante para el estudio de la disfunción ejecutiva.

Las funciones ejecutivas son parámetros altamente estudiados para comprender la neurofisiología de trastornos psiquiátricos y neurodegenerativos.

Usualmente, las técnicas utilizadas para el estudio de estas funciones cerebrales en modelos murinos son tareas basadas en el uso del aprendizaje pavloviano y/o visoespacial que aprovechan distintas conductas espontáneas, como por ejemplo la tendencia a explorar nuevos espacios en las pruebas de T-maze, o la necesidad de encontrar el escape ante una amenaza, como en el Morris Water Maze. Aunque estas pruebas son ampliamente utilizadas en el campo de la neurociencia poseen la gran limitación de que los animales deben ser sometidos a estímulos aversivos y estresantes para que aprendan a realizar una tarea, lo cual puede impactar el resultado experimental.

El comportamiento operante es el tipo de comportamiento controlado por sus consecuencias, mientras que el condicionamiento operante es el estudio del comportamiento reversible mantenido por programas de refuerzo (Staddon & Cerutti 2003). Dado que este tipo de condicionamiento se basa en la realización de tareas objetivo-dirigidas (obtención de recompensa) es que es una excelente herramienta para evaluar la condición de la memoria de trabajo, flexibilidad cognitiva y control inhibitorio, funciones cerebrales que se utilizan para poder cumplir metas y alcanzar objetivos.

Es por eso, que para poder evaluar el posible deterioro de funciones ejecutivas en nuestro modelo de ratones EAAT3^{gl}/CaMKII, en esta tesis se utilizaron pruebas que utilizan como principal herramienta el condicionamiento operante, el cual usa estímulos recompensantes para que el animal aprenda una tarea y que, importantemente, son pruebas que tienen un alto grado de translación con respecto a las pruebas realizadas en humanos lo que nos permite tener una mayor aproximación a lo que podría estar sucediendo en humanos.

5. CONCLUSIONES

Los animales EAAT3^{glo}/CaMKII adquieren correctamente el aprendizaje operante simple en comparación con animales control EAAT3^{glo} y WT. Junto con esto, pudimos observar que nuestro modelo presenta una alteración en la extinción del condicionamiento operante simple, dando cuenta de una posible disfunción ejecutiva.

Al analizar el desempeño del modelo EAAT3^{glo}/CaMKII en las pruebas de aprendizaje reverso se observó que en comparación con animales control EAAT3^{glo}, estos no revierten el aprendizaje anteriormente obtenido, tanto en pruebas de condicionamiento operante como en pruebas de aprendizaje visoespacial, lo que da cuenta de un déficit en el proceso de flexibilidad cognitiva.

Junto con esto, se analizó el desempeño de los animales con sobre expresión de EAAT3 en pruebas relacionadas a la memoria de trabajo, observándose que en la prueba de TUNL nuestro modelo no fue capaz de adquirir el aprendizaje necesario para la realización de la prueba, a diferencia de los animales control EAAT3^{glo} que adquirieron correctamente la prueba. Lo cual indica que nuestro modelo presenta una alteración en la memoria de trabajo, lo que fue confirmado con una prueba de memoria de trabajo más simple, la prueba de alternancia espontánea en T-maze, donde los ratones con sobreexpresión de EAAT3 no llegaron al criterio de alternancia, lo que nos confirma un deterioro de este modelo en el proceso de memoria de trabajo.

Por último, se analizó el desempeño de nuestro modelo en la prueba 5-CSRTT, la cual se encuentra relacionada al control inhibición y atención. En este caso no se encontraron diferencias significativas en el desempeño de los animales EAAT3^{glo}/CaMKII en comparación con animales control EAAT3^{glo}. De la misma forma, ambos grupos adquirieron correctamente la prueba sin presentar alteraciones en control inhibitorio y atención.

De esta forma, nuestros resultados dan cuenta de que la sobre expresión de EAAT3 en las neuronas principales del cerebro anterior generan una disfunción ejecutiva que estaría asociada a un deterioro de la flexibilidad cognitiva y memoria de trabajo, tanto en pruebas de condicionamiento operante como de aprendizaje visoespacial.

Hasta la fecha y según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en el que se analiza en profundidad las alteraciones en control inhibitorio, flexibilidad cognitiva y memoria de trabajo en pruebas de aprendizaje operante en un modelo genético que recapitula fenotipos de TOC.

6. REFERENCIAS

1. Abramowitz, J., Taylor, S., McKay, D., Obsessive-compulsive disorder, *The Lancet* 374:491-499,2009.
2. Adams, K. H., Hansen, E. S., Pinborg, L. H., Hasselbalch, S. G., Svarer, C., Holm, S., ... & Knudsen, G. M. (2005). Patients with obsessive–compulsive disorder have increased 5-HT_{2A} receptor binding in the caudate nuclei. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 8(3), 391-401.
3. Alvarez-Dieppa, A. C., Griffin, K., Cavalier, S., & McIntyre, C. K. (2016). Vagus nerve stimulation enhances extinction of conditioned fear in rats and modulates Arc protein, CaMKII, and GluN2B-containing NMDA receptors in the basolateral amygdala. *Neural plasticity*, 2016.
4. Amara, S. G., & Fontana, A. C. (2002). Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochemistry international*, 41(5), 313-318.
5. Amano, T., Unal, C. T., & Paré, D. (2010). Synaptic correlates of fear extinction in the amygdala. *Nature neuroscience*, 13(4), 489.
6. Ambrosini, E., Arbula, S., Rossato, C., Pacella, V., & Vallesi, A. (2019). Neuro-cognitive architecture of executive functions: A latent variable analysis. *Cortex*, 119, 441-456.
7. Anacker, C., & Hen, R. (2017). Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility—linking memory and mood. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(6), 335-346.
8. Arnold, P., Sicard, T., Burroughs, E., Richter, M., Kennedy, J., Glutamate transporter gene SLC1A1 associated with obsessive-compulsive disorder., *Archives of General Psychiatry* 63:769-776. 2006.
9. Aoyama K, Suh SW, Hamby AM, Liu J, Chan WY, Chen Y, et al. Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nat Neurosci*. 2006;9:119–26.

10. Asinof SK, Paine TA. The 5-choice serial reaction time task: a task of attention and impulse control for rodents. *J Vis Exp*. 2014 Aug 10;(90):e51574. doi: 10.3791/51574. PMID: 25146934; PMCID:PMC6592595.
11. Baddeley, A. (1992). Working memory. *Science*, 255(5044), 556-559.
12. Baioui, A., Pilgramm, J., Merz, C. J., Walter, B., Vaitl, D., & Stark, R. (2013). Neural response in obsessive-compulsive washers depends on individual fit of triggers. *Frontiers in human neuroscience*, 7, 143.
13. Baker, J. D., & Azorlosa, J. L. (1996). The NMDA antagonist MK-801 blocks the extinction of Pavlovian fear conditioning. *Behavioral neuroscience*, 110(3), 618.
14. Balleine, B. W., & O'doherty, J. P. (2010). Human and rodent homologies in action control: corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 48-69.
15. Bellone C & Nicoll RA (2007). Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors. *Neuron* 55, 779–785.
16. Bellini, S., Fleming, K. E., De, M., McCauley, J. P., Petroccione, M. A., D'Brant, L. Y., Scimemi, A. (2017). Neuronal glutamate transporters control dopaminergic signaling and compulsive behaviors. *The Journal of Neuroscience*, 1906–1917.
17. Benzina, N., N'diaye, K., Pelissolo, A., Mallet, L., & Burguière, E. (2021). A cross-species assessment of behavioral flexibility in compulsive disorders. *Communications Biology*, 4(1), 96.
18. Boo, Y. J., Kim, D. W., Park, J. Y., Kim, B. S., Chang, J. W., Kang, J. I., & Kim, S. J. (2023). Altered prefrontal beta oscillatory activity during removal of information from working memory in obsessive-compulsive disorder. *BMC psychiatry*, 23(1), 645.
19. Biria, M., Banca, P., Healy, M. P., Keser, E., Sawiak, S. J., Rodgers, C. T., ... & Robbins, T. W. (2023). Cortical glutamate and GABA are related to compulsive behaviour in individuals with obsessive compulsive disorder and healthy controls. *Nature communications*, 14(1), 3324.

20. Cai, W., Duberg, K., Padmanabhan, A., Rehert, R., Bradley, T., Carrion, V., & Menon, V. (2019). Hyperdirect insula-basal-ganglia pathway and adult-like maturity of global brain responses predict inhibitory control in children. *Nature communications*, *10*(1), 4798.
21. Clarke RJ, Glasgow NG & Johnson JW (2013). Mechanistic and structural determinants of NMDA receptor voltage-dependent gating and slow Mg²⁺ unblock. *J Neurosci* *33*, 4140–4150.
22. Conti, F., & Weinberg, R. J. (1999). Shaping excitation at glutamatergic synapses. *Trends in neurosciences*, *22*(10), 451-458.
23. de Brouwer, G., Engelbrecht, J., Mograbi, D. C., Legoabe, L., Steyn, S. F., & Wolmarans, D. W. (2021). Stereotypy and spontaneous alternation in deer mice and its response to anti-adenosinergic intervention. *Journal of Neuroscience Research*, *99*(10), 2706-2720.
24. d'Isa, R., Comi, G., & Leocani, L. (2021). Apparatus design and behavioural testing protocol for the evaluation of spatial working memory in mice through the spontaneous alternation T-maze. *Scientific Reports*, *11*(1), 21177.
25. Danbolt, N. C. (2001). Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, *65*(1), 1-105.
26. Davis, M. (2011). NMDA receptors and fear extinction: implications for cognitive behavioral therapy. *Dialogues in clinical neuroscience*.
27. Delgado-Acevedo, C., Estay, S. F., Radke, A. K., Sengupta, A., Escobar, A. P., Henríquez-Belmar, F., ... & Cho, A. (2019). Behavioral and synaptic alterations relevant to obsessive-compulsive disorder in mice with increased EAAT3 expression. *Neuropsychopharmacology*, *44*(6), 1163.
28. Devarakonda, K., Nguyen, K. P., & Kravitz, A. V. (2016). ROBucket: A low-cost operant chamber based on the Arduino microcontroller. *Behavior research methods*, *48*(2), 503-509.
29. Diamond, A. (2013). Executive functions. *Annual review of psychology*, *64*, 135-168.

30. Dickel, D., Veenstra-VanderWeele, J., Cox, N., Wu, X., Fischer, D., Van Etten-Lee, M., Himle, J., Leventhal, B., Cook, E., Hanna, G., Association testing of the positional and functional candidate gene SLC1A1/EAAC1 in early-onset obsessive-compulsive disorder., *Archives of General Psychiatry* 63:778-785, 2006.
31. Dong, Z., Bai, Y., Wu, X., Li, H., Gong, B., Howland, J. G., ... & Wang, Y. T. (2013). Hippocampal long-term depression mediates spatial reversal learning in the Morris water maze. *Neuropharmacology*, 64, 65-73
32. DSM-5. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5). 5th ed. Alrington, VA: American Psychiatric Association; 2013.
33. Eales, K. L., Palygin, O., O'Loughlin, T., Rasooli-Nejad, S., Gaestel, M., Müller, J., ... & Corrêa, S. A. (2014). The MK2/3 cascade regulates AMPAR trafficking and cognitive flexibility. *Nature communications*, 5(1), 4701.
34. Ehmer, I., Crown, L., van Leeuwen, W., Feenstra, M., Willuhn, I., & Denys, D. (2020). Evidence for distinct forms of compulsivity in the SAPAP3 mutant-mouse model for obsessive-compulsive disorder. *Eneuro*, 7(2).
35. Elliott, R. (2003). Executive functions and their disorders: Imaging in clinical neuroscience. *British medical bulletin*, 65(1), 49-59.
36. Escobar, A. P., Wendland, J. R., Chávez, A. E., & Moya, P. R. (2019). The neuronal glutamate transporter EAAT3 in obsessive-compulsive disorder. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1362.
37. Farber, N. B., Newcomer, J. W., & Olney, J. W. (1998). The glutamate synapse in neuropsychiatric disorders: focus on schizophrenia and Alzheimer's disease. *Progress in brain research*, 116, 421-437.
38. Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of neurochemistry*, 42(1), 1-11.
39. Friedman, N. P., & Robbins, T. W. (2022). The role of prefrontal cortex in cognitive control and executive function. *Neuropsychopharmacology*, 47(1), 72-89.

40. Funahashi, S. (2017). Working memory in the prefrontal cortex. *Brain sciences*, 7(5), 49.
41. Gillan CM, Pappmeyer M, Morein-Zamir S, Sahakian BJJ, Fineberg NA, Robbins TW, De Wit S, Wit S de (2011) Disruption in the balance between goal-directed behavior and habit learning in obsessive-compulsive disorder. 168
42. Giménez, M., Cano, M., Martínez-Zalacaín, I., Real, E., Alonso, P., Segalàs, C., ... & Fullana, M. A. (2020). Is glutamate associated with fear extinction and cognitive behavior therapy outcome in OCD? A pilot study. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*, 270(8), 1003-1014.
43. Giuliani, M., Martoni, R. M., Crespi, S. A., O'Neill, J., Erzegovesi, S., de'Sperati, C., & Grgic, R. G. (2021). Did i do that? Cognitive flexibility and self-agency in patients with obsessivecompulsive disorder. *Psychiatry Research*, 304, 114170.
44. Graybiel, A., The Basal Ganglia. *Current Biology*, 10, 509–511., 2004.
45. Griffin, A. L. (2021). The nucleus reuniens orchestrates prefrontal-hippocampal synchrony during spatial working memory. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 128, 415-420.
46. Gonzalez LF, Henriquez-Belmar F, Delgado-Acevedo C, Cisternas-Olmedo M, Arriagada G, Sotomayor-Zarate R, et al. Neurochemical and behavioral characterization of neuronal glutamate transporter EAAT3 heterozygous mice. *Biol Res*. 2017;50:29.
47. Guarino, A., Favieri, F., Boncompagni, I., Agostini, F., Cantone, M., & Casagrande, M. (2019). Executive functions in Alzheimer disease: A systematic review. *Frontiers in aging neuroscience*, 10, 437.
48. Hanna, G. L., Veenstra-vanderweele, J., Cox, N. J., Boehnke, M., Himle, J. A., Curtis, G. C., Cook, E. H., Genome-Wide Linkage Analysis of Families With Obsessive-Compulsive Disorder Ascertained Through Pediatric Proband, *American Journal of Medical Genetics* 552: 541–552, 2002.
49. He, Y., Janssen, W. G. M., Rothstein, J. D., & Morrison, J. H. (2000). Differential synaptic

localization of the glutamate transporter EAAC1 and glutamate receptor subunit GluR2 in the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*, 418(3), 255–269.

50. Heinzel, S., Kaufmann, C., Grützmann, R., Klawohn, J., Riesel, A., Bey, K., ... & Kathmann, N. (2021). Polygenic risk for obsessive-compulsive disorder (OCD) predicts brain response during working memory task in OCD, unaffected relatives, and healthy controls. *Scientific reports*, 11(1), 18914.
51. Herry, C., Ciocchi, S., Senn, V., Demmou, L., Müller, C., & Lüthi, A. (2008). Switching on and off fear by distinct neuronal circuits. *Nature*, 454(7204), 600.
52. Jurado, M. B., & Rosselli, M. (2007). The elusive nature of executive functions: a review of our current understanding. *Neuropsychology review*, 17(3), 213-233.
53. Karlsson, R. M., Tanaka, K., Saksida, L. M., Bussey, T. J., Heilig, M., & Holmes, A. (2009). Assessment of glutamate transporter GLAST (EAAT1)-deficient mice for phenotypes relevant to the negative and executive/cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 34(6), 1578-1589.
54. Karthik, S., Sharma, L. P., & Narayanaswamy, J. C. (2020). Investigating the role of glutamate in obsessive-compulsive disorder: current perspectives. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 1003-1013.
55. Koran LM, Hanna GL, Hollander E, Nestadt G, Simpson HB, American Psychiatric Association. Practice guideline for the treatment of patients with obsessivecompulsive disorder. *Am J Psychiatry*. 2007;164:5–53.
56. Kumar, G., Olley, J., Steckler, T. et al. Dissociable effects of NR2A and NR2B NMDA receptor antagonism on cognitive flexibility but not pattern separation. *Psychopharmacology* 232, 3991– 4003 (2015).
57. Kupferschmidt, D., Mikofsky, R., Gilchrist, K., Myroshnychenko, M., & Gordon, J. (2020). In Vivo Effective Connectivity of Mouse Ventral Hippocampus With Medial Prefrontal Cortex Microcircuits. *Biological Psychiatry*, 87(9), S404-S405.

58. Lei, H., Lai, J., Sun, X., Xu, Q., & Feng, G. (2019). Lateral orbitofrontal dysfunction in the Sapap3 knockout mouse model of obsessive-compulsive disorder. *Journal of Psychiatry and Neuroscience, 44*(2), 120-131.
59. Leonard AS, Lim IA, Hemsworth DE, Horne MC & Hell JW (1999). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II is associated with the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3239–3244.
60. Leslie, J. C., Norwood, K., Kennedy, P. J., Begley, M., & Shaw, D. (2012). Facilitation of extinction of operant behaviour in C57Bl/6 mice by chlordiazepoxide and D-cycloserine. *Psychopharmacology, 223*, 223-235.
61. Lohmann, C., & Kessels, H. W. (2014). The developmental stages of synaptic plasticity. *The Journal of physiology, 592*(1), 13-31.
62. Manarte, L., Andrade, A. R., do Rosário, L., Sampaio, D., Figueira, M. L., Morgado, P., & Sahakian, B. J. (2021). Executive functions and insight in OCD: a comparative study. *BMC psychiatry, 21*(1), 1-11.
63. Mancini, Christian, et al. "Inhibition is impaired in children with obsessive-compulsive symptoms but not in those with tics." *Movement Disorders* 33.6 (2018): 950-959.
64. Mannarelli, D., Pauletti, C., Petritis, A., Delle Chiaie, R., Currà, A., Trompetto, C., & Fattapposta, F. (2020). Effects of cerebellar tDCS on inhibitory control: evidence from a go/NoGo task. *The Cerebellum, 19*, 788-798.
65. Manning, E. E., Dombrowski, A. Y., Torregrossa, M. M., & Ahmari, S. E. (2019). Impaired instrumental reversal learning is associated with increased medial prefrontal cortex activity in Sapap3 knockout mouse model of compulsive behavior. *Neuropsychopharmacology, 44*(8), 1494-1504.
66. Mar, A. C., Horner, A. E., Nilsson, S. R., Alsiö, J., Kent, B. A., Kim, C. H., ... & Bussey, T. J. (2013). The touchscreen operant platform for assessing executive function in rats and mice. *Nature protocols, 8*(10), 1985-2005.

67. Mirabella, G. (2021). Inhibitory control and impulsive responses in neurodevelopmental disorders. *Developmental Medicine & Child Neurology*, 63(5), 520-526.
68. Monaco, S. A., Gulchina, Y., & Gao, W. J. (2015). NR2B subunit in the prefrontal cortex: A double-edged sword for working memory function and psychiatric disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 56, 127–138.
69. Monteiro, P., & Feng, G. (2016). Learning from animal models of obsessive-compulsive disorder. *Biological psychiatry*, 79(1), 7-16.
70. Murphy DL, Moya PR, Wendland JR, Timpano KR. Genetic contributions to obsessivecompulsive disorder (OCD) and OCD-related disorders. In: Berrettini JNW, (ed). Principles of psychiatric genetics. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2012. p. 121–33.
71. Myers, K. M., Carlezon, W. A., & Davis, M. (2011). Glutamate receptors in extinction and extinction-based therapies for psychiatric illness. *Neuropsychopharmacology*, 36(1), 274-293.
72. Nakao, T., Nakagawa, A., Nakatani, E., Nabeyama, M., Sanematsu, H., Yoshiura, T., ... & Kanba, S. (2009). Working memory dysfunction in obsessive–compulsive disorder: a neuropsychological and functional MRI study. *Journal of psychiatric research*, 43(8), 784-791.
73. Norman, L. J., Taylor, S. F., Liu, Y., Radua, J., Chye, Y., De Wit, S. J., ... & Fitzgerald, K. (2019). Error processing and inhibitory control in obsessive-compulsive disorder: A meta-analysis using statistical parametric maps. *Biological Psychiatry*, 85(9), 713-725.
74. O'Donovan, S. M., Sullivan, C. R., & McCullumsmith, R. E. (2017). The role of glutamate transporters in the pathophysiology of neuropsychiatric disorders. *NPJ schizophrenia*, 3(1), 32.
75. Oomen, C. A., Hvoslef-Eide, M., Heath, C. J., Mar, A. C., Horner, A. E., Bussey, T. J., & Saksida, L. M. (2013). The touchscreen operant platform for testing working memory and pattern separation in rats and mice. *Nature protocols*, 8(10), 2006-2021.

76. Paxinos & Franklin, The mousebrain in stereotaxic coordinates , Fourth edition, Elsevier (2013).
77. Peghini P, Janzen J, Stoffel W. Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. The EMBO Journal 1997;16:3822-32.
78. Penadés, R., Catalán, R., Rubia, K., Andrés, S., Salamero, M., & Gastó, C. (2007). Impaired response inhibition in obsessive compulsive disorder. *European Psychiatry*, 22(6), 404-410.
79. Petroccione, M. A., D'Brant, L. Y., Affinnih, N., Wehrle, P. H., Todd, G. C., Zahid, S., ... & Scimemi, A. (2023). Neuronal glutamate transporters control reciprocal inhibition and gain modulation in D1 medium spiny neurons. *Elife*, 12, e81830.
80. Pittenger, C., Bloch, M. H., Williams, K., Glutamate abnormalities in obsessive compulsivedisorder: Neurobiology, pathophysiology, and treatment. *Pharmacology and Therapeutics* 132: 14–332, 2011.
81. Privitera, L., Hogg, E. L., Gaestel, M., Wall, M. J., & Corrêa, S. A. (2019). The MK2 cascade regulates mGluR-dependent synaptic plasticity and reversal learning. *Neuropharmacology*, 155, 121-130.
82. Rabinovici, G. D., Stephens, M. L., & Possin, K. L. (2015). Executive dysfunction. *CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology*, 21(3 Behavioral Neurology and Neuropsychiatry), 646.
83. Rapanelli, M., Frick, L. R., & Zanutto, B. S. (2011). Learning an operant conditioning task differentially induces gliogenesis in the medial prefrontal cortex and neurogenesis in the hippocampus. *PloS one*, 6(2), e14713.
- 84.
85. Radke AK, Kocharian A, Covey DP, Lovinger DM, Cheer JF, Mateo Y, et al. Contributions of nucleus accumbens dopamine to cognitive flexibility. *Eur J Neurosci*. 2018.

86. Reimold, M., Smolka, M. N., Zimmer, A., Batra, A., Knobel, A., Solbach, C., ... & Heinz, A. (2007). Reduced availability of serotonin transporters in obsessive-compulsive disorder correlates with symptom severity—a [11 C] DASB PET study. *Journal of Neural Transmission*, 114, 1603-1609.
87. Rodenas-Ruano, A., Chávez, A. E., Cossio, M. J., Castillo, P. E., & Zukin, R. S. (2012). RESTdependent epigenetic remodeling promotes the developmental switch in synaptic NMDA receptors. *Nature neuroscience*, 15(10), 1382.
88. Rosa-Alcázar, A. I., Rosa-Alcázar, Á., Martínez-Esparza, I. C., Storch, E. A., & Olivares-Olivares, P. J. (2021). Response inhibition, cognitive flexibility and working memory in obsessive-compulsive disorder, generalized anxiety disorder and social anxiety disorder. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(7), 3642.
89. Rubin, R. D., Watson, P. D., Duff, M. C., & Cohen, N. J. (2014). The role of the hippocampus in flexible cognition and social behavior. *Frontiers in human neuroscience*, 8, 742.
90. Sans N, Petralia RS, Wang YX, Blahos J, Hell JW & Wenthold RJ (2000). A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci* 20, 1260–1271.
91. Scimemi, A., Tian, H., & Diamond, J. S. (2009). Neuronal transporters regulate glutamate clearance, NMDA receptor activation and synaptic plasticity in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 29(46), 14581-14595.
92. Scott, W. A. (1962). Cognitive complexity and cognitive flexibility. *Sociometry*, 405-414.
93. Segal, O., & Elkana, O. (2023). The ventrolateral prefrontal cortex is part of the modular working memory system: A functional neuroanatomical perspective. *Frontiers in Neuroanatomy*, 17, 1076095.
94. Shaw, D., Norwood, K., Sharp, K., Quigley, L., McGovern, S. F., & Leslie, J. C. (2009). Facilitation of extinction of operant behaviour in mice by D-cycloserine. *Psychopharmacology*, 202, 397-402.

95. Shmelkov, S. V, Hormigo, A., Jing, D., Proenca, C. C., Bath, G., Milde, T., George, D., Slitrk5 deficiency impairs corticostriatal circuitry and leads to obsessive-compulsive-like behaviors in mice., 16: 598–602, 2010.
96. Schmitz, T. W., Correia, M. M., Ferreira, C. S., Prescott, A. P., & Anderson, M. C. (2017). Hippocampal GABA enables inhibitory control over unwanted thoughts. *Nature communications*, 8(1), 1311.
97. Schneider, W., & Shiffrin, R. M. (1977). Controlled and automatic human information processing: I. Detection, search, and attention. *Psychological review*, 84(1), 1.
98. Snyder, H. R., Kaiser, R. H., Warren, S. L., & Heller, W. (2015). Obsessive-compulsive disorder is associated with broad impairments in executive function: A meta-analysis. *Clinical Psychological Science*, 3(2), 301-330.
99. Sommer B, Kohler M, Sprengel R & Seeburg PH (1991). RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels. *Cell* 67, 11–19.
100. Staddon, J. E., & Cerutti, D. T. (2003). Operant conditioning. *Annual review of psychology*, 54(1), 115-144.
101. Stein, D. J., Obsessive-compulsive disorder. *Lancet*, 360(9330):397–405, 2002.
102. Strack S & Colbran RJ (1998). Autophosphorylation-dependent targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II by the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 273, 20689–20692.
103. Tomiyama, H., Nakao, T., Murayama, K., Nemoto, K., Ikari, K., Yamada, S., ... & Kanba, S. (2019). Dysfunction between dorsal caudate and salience network associated with impaired cognitive flexibility in obsessive-compulsive disorder: A resting-state fMRI study. *NeuroImage: Clinical*, 24, 102004.
104. Tsien, J. Z., Chen, D. F., Gerber, D., Tom, C., Mercer, E. H., Anderson, D. J., ... & Tonegawa, S. (1996). Subregion-and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell*, 87(7), 1317-1326.

105. Tsvetkov, E., Carlezon Jr, W. A., Benes, F. M., Kandel, E. R., & Bolshakov, V. Y. (2002). Fear conditioning occludes LTP-induced presynaptic enhancement of synaptic transmission in the cortical pathway to the lateral amygdala. *Neuron*, 34(2), 289-300.
- Ting, J.T., Feng, G., Glutamatergic synaptic dysfunction and obsessive-compulsive disorder, *Current Chemical Genomics* 2: 62–75, 2008.
106. Vandenberg, R. J., & Ryan, R. M. (2013). Mechanisms of glutamate transport. *Physiological reviews*, 93(4), 1621-1657.
107. van den Boom, B. J., Mooij, A. H., Misevičiūtė, I., Denys, D., & Willuhn, I. (2019). Behavioral flexibility in a mouse model for obsessive-compulsive disorder: Impaired Pavlovian reversal learning in SAPAP3 mutants. *Genes, Brain and Behavior*, 18(4), e12557.
108. Verma, L., Agrawal, D., & Jain, N. S. (2018). Enhanced central histaminergic transmission attenuates compulsive-like behavior in mice. *Neuropharmacology*, 138, 106-117.
109. Wang, J., Hua, G., Wang, S., Guo, G., Quan, D., Yao, S., & Zheng, H. (2023). Glutamatergic neurotransmission is affected by low-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation over the supplemental motor cortex of patients with obsessive-compulsive disorder. *Journal of Affective Disorders*, 325, 762-769.
110. Wendland J. R., Moya P. R., Timpano K. R., Anavitarte A. P., Matthew, R., Kruse, B.A., Wheaton Michael G., Ren-Patterson Renee F., Murphy Dennis L., A haplotype containing quantitative trait loci for SLC1A1 gene expression and its association with obsessive-compulsive disorder, *Archives of General Psychiatry* 66(4); 408–416. 2009.
111. Welch, J., Lu, J., Rodriguiz, R., Trotta, N., Peca, J., Ding, J., Feliciano, C., Chen, M., Adams, J., Luo, J., Dudek, S., Weinberg, R., Calakos, N., Wetsel, W., Feng, G., Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature* 448: 894-900, 2007.
112. Yun, J. Y., Jang, J. H., Jung, W. H., Shin, N. Y., Kim, S. N., Hwang, J. Y., & Kwon, J. S. (2017). Executive Dysfunction in Obsessive-Compulsive Disorder and Anterior

Cingulate-Based Resting State Functional Connectivity. *Psychiatry investigation*, 14(3), 333–343.

113. Zartaloudi, E., Laws, K. R., & Bramon, E. (2019). Endophenotypes of executive functions in obsessive compulsive disorder? A meta-analysis in unaffected relatives. *Psychiatric genetics*, 29(6), 211-219.
114. Zhu JJ, Esteban JA, Hayashi Y & Malinow R (2000). Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci* 3,1098–1106.
115. Zike ID, Chohan MO, Kopelman JM, Krasnow EN, Flicker D, Nautiyal KM, et al. OCD candidate gene SLC1A1/EAAT3 impacts basal ganglia-mediated activity and stereotypic behavior. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114:5719–24.