



FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO DE NEUROGÉNETICA
LABORATORIO DE NEUROQUÍMICA Y NEUROFARMACOLOGÍA
CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA Y PLASTICIDAD CEREBRAL
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE NEUROCIENCIA VALPARAISO

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

**CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL Y NEUROQUÍMICA EN EL CIRCUITO
CORTICO-ESTRIADO-TÁLAMO-CORTICAL DE UN RATÓN EAAT₃
HETEROCIGOTO: POSIBLE ROL EN EL TRASTORNO OBSESIVO
COMPULSIVO.**

LUIS FELIPE GONZÁLEZ OLIVARES

ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

Director de Tesis: **Dr. Pablo Moya Vera**
Co-director de Tesis: **Dr. Ramón Sotomayor-Zárate**

2017

ÍNDICE.

ÍNDICE.....	2
ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS.....	4
RESUMEN.....	5
1) TRASTORNO OBSESIVO COMPULSIVO.....	7
2) ROL DEL GLUTAMATO EN TOC.....	8
3) GLUTAMATO Y CIRCUITO CORTICO-ESTRIADO-TÁLAMO-CORTICAL.....	9
4) MODELOS ANIMALES DE TOC.....	11
5) ROL DE EAAT ₃ EN TOC.....	12
6) APROXIMACIÓN CON UN RATÓN EAAT ₃ ^{+/-} AL TOC.....	13
HIPOTESIS.....	14
OBJETIVOS.....	15
1) OBJETIVO GENERAL.....	15
2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
1) OBTENCIÓN DE LOS ANIMALES.....	16
2) ANIMALES.....	16
3) REACTIVOS.....	16
4) GENOTIPIFICACIÓN DE LOS ANIMALES.....	17
5) HOMOGENIZACIÓN DE TEJIDOS CEREBRALES.....	19
6) DETERMINACIÓN DE MONOAMINAS POR HPLC-EC.....	19
7) DETERMINACIÓN DE GLUTAMATO Y GABA POR HPLC-FP.....	20
8) PARADIGMAS CONDUCTUALES.....	21
8.1) Prueba de Exploración de Campo Abierto.....	21
8.2) Prueba de Laberinto Elevado en Cruz.....	22
8.3) Prueba de Enterrado de Canicas.....	22
8.4) Actividad Locomotora.....	22
RESULTADOS.....	24
1) GENOTIPIFICACIÓN DE LOS ANIMALES USADOS EN ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS Y CONDUCTUALES.....	24
2) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO EN RATONES MACHOS MEDIANTE LA PRUEBA DE EXPLORACIÓN DE CAMPO ABIERTO.....	25
3) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO EN RATONES MACHOS MEDIANTE LA PRUEBA DE LABERINTO ELEVADO EN CRUZ.....	26

4) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO-COMPULSIVO EN RATONES MACHOS MEDIANTE LA PRUEBA DE ENTERRADO DE CANICAS (MARBLE BURYING).	27
5) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN RATONES MACHO EAAT3 ^{+/-} Y EAAT3 ^{+/+}	28
6) EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE NEUROTRANSMISORES MONOAMINÉRGICOS Y AMINOACIDÉRGICOS EN CORTEZA PREFRONTAL DE RATONES MACHOS EAAT3 ^{+/-} Y EAAT3 ^{+/+}	29
7) EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE NEUROTRANSMISORES MONOAMINÉRGICOS Y AMINOACIDÉRGICOS EN CUERPO ESTRIADO DE RATONES MACHOS EAAT3 ^{+/-} Y EAAT3 ^{+/+}	31
8) EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE NEUROTRANSMISORES MONOAMINÉRGICOS Y AMINOACIDÉRGICOS EN TÁLAMO DE RATONES MACHOS EAAT3 ^{+/-} Y EAAT3 ^{+/+}	33
9) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO EN RATONES HEMBRAS MEDIANTE LA PRUEBA DE EXPLORACIÓN DE CAMPO ABIERTO.	35
10) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO EN RATONES HEMBRAS MEDIANTE LA PRUEBA DE LABERINTO ELEVADO EN CRUZ.....	36
11) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO-COMPULSIVO EN RATONES HEMBRAS MEDIANTE LA PRUEBA DE ENTERRADO DE CANICAS (MARBLE BURYING). ..	37
12) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN RATONES HEMBRAS EAAT3 ^{+/-} Y EAAT3 ^{+/+}	38
13) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO EN RATONES EAAT3 ^{+/-} Y EAAT3 ^{+/+} MEDIANTE LA PRUEBA DE EXPLORACIÓN DE CAMPO ABIERTO.	39
14) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO EN RATONES EAAT3 ^{+/-} Y EAAT3 ^{+/+} MEDIANTE LA PRUEBA DE LABERINTO ELEVADO EN CRUZ.	41
15) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO-COMPULSIVO EN RATONES EAAT3 ^{+/-} Y EAAT3 ^{+/+} MEDIANTE LA PRUEBA DE ENTERRADO DE CANICAS.....	43
16) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN RATONES EAAT3 ^{+/-} Y EAAT3 ^{+/+} . ..	44
DISCUSIÓN.	46
1) EFECTO DE LA HETEROCIGOSIS DE EAAT3 EN RATONES MACHOS SOBRE LA REGULACIÓN NEUROQUÍMICA EN EL CIRCUITO CSTC Y SOBRE LA PRESENCIA DE UN FENOTIPO ANSIOSO.	46
2) EFECTO DE LA HETEROCIGOSIS DE EAAT3 EN RATONES HEMBRA SOBRE LA PRESENCIA DE UN POSIBLE FENOTIPO ANSIOSO.	47
3) COMPARACIÓN POR SEXO EN LOS PARADIGMAS CONDUCTUALES EN RATONES EAAT3 SILVESTRES Y HETEROCIGOTOS.....	48
CONCLUSIONES.	50
BIBLIOGRAFÍA.	51

ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICOS.

Figuras

Figura 1: Esquema circulo vicioso TOC.....	7
Figura 2: Circuito Cortico - Estriado -Tálamo - Cortical.....	10
Figura 3: Esquema del constructo génico del animal.....	19
Figura 4: Esquema de oxidación de catecolaminas.....	20
Figura 5: Reacción de aminoácidos con Orto-ftalaldehido.....	21
Figura 6: Gel representativo de la genotipificación de Animales.....	24
Figura 7: Exploración de Campo Abierto Machos.....	25
Figura 8: Laberinto Elevado en Cruz Machos.....	26
Figura 9: Prueba Enterrado de Canicas Machos.....	27
Figura 10: Actividad Locomotora Machos.....	28
Figura 11: Contenido de Neurotransmisores en CPF Machos.....	29
Figura 12: Contenido de Neurotransmisores en Cuerpo Estriado Machos.....	31
Figura 13: Contenido de Neurotransmisores en Tálamo Machos	33
Figura14: Exploración de Campo Abierto Hembras.....	35
Figura 15: Laberinto Elevado en Cruz Hembras.....	36
Figura 16: Enterrado de Canicas Hembras	37
Figura 17: Actividad Locomotora Hembras.....	38
Figura 18: Exploración de Campo Abierto Hembras v/s Machos.....	40
Figura 19: Laberinto Elevado en Cruz Hembras v/s Machos.....	42
Figura 20: Enterrado de Canicas Hembras v/s Machos.....	43
Figura 21: Actividad Locomotora Hembras v/s Machos.....	45

RESUMEN.

El trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) es uno de los trastornos neuropsiquiátricos más prevalentes, afectando entre el 1-3% de la población mundial. Aunque la causa exacta del TOC es desconocida, muchas líneas de evidencia sugieren que el TOC tiene una base genética. Recientemente, ha ganado fuerza la idea de una disfunción en la neurotransmisión glutamatérgica en el TOC, a través de evidencia relacionada con polimorfismos en el gen del receptor de NMDA, elevados niveles de glutamato en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con TOC y nuevas fármacos que modulan la transmisión glutamatérgica con efectividad en el tratamiento del TOC. Además, estudios de meta-análisis genético han encontrado una asociación entre el gen *SLC1A1* y TOC, el cual codifica para el Transportador de Aminoácidos Excitatorios 3 (EAAT3) responsable de regular la depuración de glutamato en la hendidura sináptica y el TOC. En este sentido, un objetivo principal en el desarrollo de esta tesis fue caracterizar neuroquímica y conductualmente a un ratón heterocigoto para EAAT3 (*EAAT3^{+/-}*) y compararlo con un ratón silvestre. A nivel neuroquímico se evaluó el contenido de neurotransmisores monoaminérgicos (dopamina, serotonina) y aminoacidérgicos (glutamato y GABA) en el circuito cortico-estriado-tálamo-cortical (CSTC) el cual tiene un rol clave en la comunicación entre corteza y estriado (regulando la vía directa e indirecta del movimiento), y estaría sobreactivado en pacientes con TOC. A nivel conductual usando los test de exploración de campo abierto, laberinto elevado en cruz y enterrado de canicas se evaluó el grado de ansiedad que tenían animales silvestres y heterocigotos. Los resultados demostraron que el ratón macho *Eaat3^{+/-}* no presenta cambios significativos en el contenido de neurotransmisores en áreas del CSTC y presenta un fenotipo conductual similar al ratón silvestre. Sin embargo, en ratones hembras *Eaat3^{+/-}* se encontraron cambios conductuales, mostrando ser más ansiosas que las hembras silvestres, por lo que será necesario evaluar más adelante la regulación neuroquímica en las hembras y contrastarla con el cambio fenotípico encontrado.

ABSTRACT.

Obsessive-compulsive disorder (OCD) is one of the most prevalent neuropsychiatric disorders and affect between 1-3 % of the world population. Although the exact causes of OCD are unknown, many lines of evidence suggest that OCD has a genetic basis. Recently, the idea of a glutamatergic transmission dysfunction in OCD has gained strength, this evidence includes certain polymorphisms in the NMDA receptor gene, elevated glutamate levels in the cerebrospinal fluid of drug naïve patients and even glutamatergic neurotransmission-modulating agents are currently being tested in the treatment of OCD. In addition, linkage, candidate gene as well as meta-analysis studies support an association of *SLC1A1* gene and OCD. *SLC1A1* encodes the Excitatory Amino-Acid Transporters 3 (EAAT3) that regulates the clearance of glutamate in the synaptic cleft.

In this way, a main objective in the development of this thesis was to characterize neurochemically and behaviorally a heterozygous mouse for EAAT3 (*Eaat3*^{+/-}) and to compare it with a wild type mouse. At the neurochemical level, the content of monoaminergic (dopamine, serotonin) and aminoacidergic neurotransmitters (glutamate and GABA) in the cortical-striatum-thalamic-cortical circuit (CSTC) was evaluated, which plays a key role in the communication between cortex and striatum (regulating the direct and indirect pathway of the movement), and would be overactivated in patients with OCD. At behavioral level, using the open field test, elevated plus maze and Marble Burying, was evaluated the degree of anxiety of the heterozuygotes and wild type animals. The results shows that the *Eaat3*^{+/-} male heterozygous mouse does not present significant changes in the neurotransmitter content in areas of the cortico-striatum-thalamus-cortical circuit and has a behavioral phenotype similar to wildtype mouse. However, in *Eaat3*^{+/-} female mice, behavioral changes are found , they show to be more anxious than wild type female mice, so it will be necessary to evaluate later the neurochemical regulation in females to compare it with the phenotypic change found.

INTRODUCCIÓN

1) TRASTORNO OBSESIVO COMPULSIVO

El trastorno obsesivo compulsivo (TOC) es un trastorno neuropsiquiátrico caracterizado por pensamientos intrusivos, recurrentes y persistentes (obsesiones) a los que se les acompaña de conductas repetitivas o ritualísticas (compulsiones) que son llevadas a cabo con el fin de aliviar la intensa ansiedad provocada por las obsesiones (Figura 1). Se estima que este trastorno afecta entre el 1 – 3 % de la población mundial, siendo uno de los desórdenes neuropsiquiátricos más prevalentes en el mundo [1].

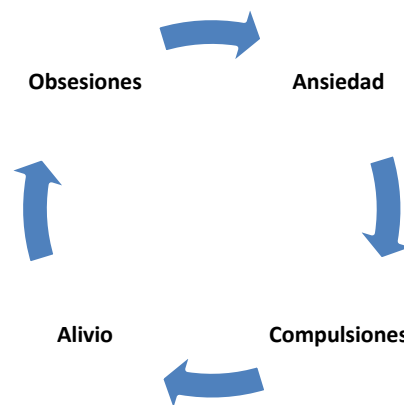


Figura 1: Esquema del círculo vicioso del TOC (elaboración propia).

Actualmente la causa exacta del TOC sigue siendo desconocida, sin embargo diversos estudios sugieren una base genética, por ejemplo la tasa de TOC para gemelos monocigóticos (80 – 87 %) es mayor que para gemelos dicigóticos (47 – 50 %) [2]. Por otro lado, estudios familiares de TOC han demostrado que el riesgo de TOC es de 3 – 12 veces mayor para aquellos individuos con primer grado de parentesco que para el resto de la población [3]. Sin embargo, hasta ahora ningún alelo en común ha sido directamente ligado a la patogénesis del TOC.

A pesar del poco entendimiento sobre los mecanismos neurobiológicos precisos que subyacen en el TOC, se han desarrollado algunos tratamientos que son al menos

parcialmente efectivos en aliviar los síntomas. En cuanto a los tratamientos farmacológicos las drogas de primera línea son la clomipramina y los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRSs) como fluoxetina, sertralina, paroxetina entre otros, los cuales provocan una disminución significativa de la sintomatología del TOC, sin embargo aproximadamente el 50% de los pacientes son no respondedores [4, 5]. El tratamiento con terapias conductuales, también ha sido útil y se basa en exponer al paciente constantemente al estímulo que le genera la ansiedad (por ejemplo, suciedad), seguido de la imposibilidad de llevar a cabo el ritual característico (por ejemplo, lavarse las manos). Esto genera una habituación al estímulo aversivo. Este tipo de terapias ha mostrado una efectividad similar a la terapia farmacológica. Sin embargo, no todos los tipos de obsesiones pueden ser tratados con esta terapia, siendo de esta manera mucho más limitada que la terapia farmacológica [6].

2) ROL DEL GLUTAMATO EN TOC

Diversos sistemas neuronales han sido implicados en la fisiopatología del TOC. Por ejemplo, se ha sugerido la existencia de una desregulación del sistema serotoninérgico sobre la base de la efectividad de los inhibidores de la recaptura de serotonina (ISRSs) e inhibidores selectivos de la recaptura de noradrenalina (ISRNs) en aliviar las obsesiones y compulsiones de los pacientes con TOC [7]. Por otro lado, anormalidades en el sistema dopaminérgico han sido implicadas en la patogénesis del TOC basado en los beneficios terapéuticos de la co-administración de ISRSs y fármacos bloqueadores de receptores de dopamina (antipsicóticos), así como observaciones de compulsiones en trastornos relacionados con los ganglios basales, como el síndrome de Tourette [8, 9].

Desde hace algunos años ha habido un incremento en la evidencia que asocia al sistema glutamatérgico con el TOC, incluyendo la asociación de ciertos polimorfismos en el gen que codifica para el receptor NMDA con susceptibilidad para el TOC [10], niveles elevados de

glutamato en el fluido cefalorraquídeo de pacientes sin tratamiento previo [11], la correlación entre la severidad de los síntomas y el nivel de varios metabolitos de glutamato [12], la mejora en los síntomas de aquellos pacientes refractarios al tratamiento de primera línea y que son tratados con agonistas parciales del receptor de NMDA (D- cicloserina) o antagonistas del receptor NMDA (memantina) [13, 14].

3) GLUTAMATO Y CIRCUITO CORTICO-ESTRIADO-TÁLAMO-CORTICAL

En 1983 Penney y Young describieron un modelo que muestra el rol del circuito Cortico-Estriado-Tálamo-Cortical (CSTC: Cortico-Striatum-Thalamus-Cortical, por sus siglas en inglés) en el control de los movimientos normales, demostrando el rol central de los ganglios basales dentro del circuito CSTC en la selección de las conductas que se quieren llevar a cabo y la exclusión de aquellas no deseadas [15]. En este modelo (ver figura 2) se puede apreciar cómo neuronas glutamatérgicas envían proyecciones al estriado para hacer sinapsis con neuronas espinosas medianas (NEMs) que son de origen GABAérgico, conectando las estructuras de salida de información más relevantes de los ganglios basales, el Globo Pálido interno (GPi) y la Sustancia Nigra *pars reticulata* (SNr) [15]. En el cuerpo estriado existen dos tipos de NEMs, aquellas que expresan el receptor de dopamina D₁ que componen la vía directa y aquellas NEMs que expresan el receptor de dopamina D₂ que componen la vía indirecta. La vía directa comprende neuronas NEMs que envían proyecciones directamente al GPi/SNr, mientras que la vía indirecta comprende relevos adicionales hacia el Globo Pálido *externalis* (GPe) y posteriormente al Núcleo Subtalámico (NST) [16]. De esta manera el GPi/SNr provee un tono inhibitorio al Tálamo, el cual envía proyecciones glutamatérgicas a la corteza nuevamente, completando el circuito [17] (ver figura 2). Este tono es modulado por un equilibrio dinámico en la actividad de ambas vías, así una sobreactivación de la vía directa o una hipofunción de la vía indirecta podría “desinhibir” al tálamo promoviendo una inapropiada expresión de comportamientos cognitivos (obsesiones) y estereotipados (compulsiones) [18]. Basado en el rol crítico del

glutamato en el circuito CSTC, una disfunción glutamatérgica ha sido implicada en la patogénesis del TOC [19].

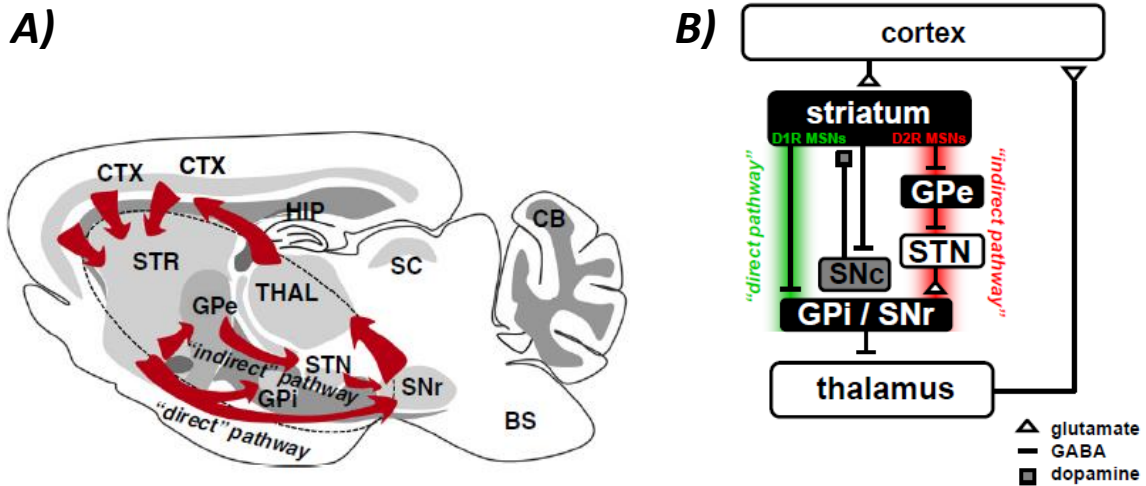


Figura 2: El circuito cortico-estriado-tálamo-cortical es el mayor sitio de disfunción sináptica en el trastorno obsesivo-compulsivo. (A) Diagrama de un cerebro de ratón (corte sagital) ilustrando el circuito CSTC en las correspondientes estructuras en un cerebro de roedor. (B) Diagrama simplificado del circuito CSTC en animales. MSN, neuronas espinosas mediales; GPe, globo pálido pars externalis; GPi, globo pálido pars internalis; SNc, sustancia nigra pars compacta; SNr, sustancia nigra pars reticulata, STN, núcleo subtalámico; D1R, receptor de dopamina tipo D₁; D2R, receptor de dopamina tipo D₂; CTX, corteza; STR, estriado; HIP, hipocampo; SC, colículo superior; CB, cerebelo; BS, tronco cerebral. Figura del trabajo de Jonathan T. Ting and Gouping Feng [17].

Por otro lado el uso de métodos de neuroimagen no invasivos como tomografía de emisión positrónica (PET), tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT) o espectroscopia de resonancia magnética (SRM) han permitido realizar estudios en pacientes con TOC en los cuales se han encontrado alteraciones dentro del circuito CSTC. Se ha visto un incremento en el metabolismo de la glucosa y flujo sanguíneo en Corteza orbitofrontal, Corteza cingulada anterior, Caudado y Tálamo, todas regiones que forman parte del circuito CSTC [20-22]. De esta misma forma se ha visto una reducción en el metabolismo de la glucosa y flujo sanguíneo después de la administración de clomipramina o ISRS [23, 24], también después de terapias conductuales [25] y lesiones neuroquirúrgicas [26].

4) **MODELOS ANIMALES DE TOC.**

Recientemente dos estudios en modelos genéticos de animales han indicado fuertemente la existencia de una desregulación glutamatérgica en el TOC. La proteína SAPAP 3, es una proteína de andamiaje post-sináptica que se encuentra ubicada en densidades post-sinápticas excitatorias y está altamente expresada en estriado [27]. SAPAP 3 puede regular el tráfico de receptores de glutamato hacia la superficie de la membrana celular [27]. Welch y colaboradores mostraron que el ratón con la delección genética de SAPAP 3, exhibe un incremento en la conducta de ansiedad y un “grooming” (acicalamiento) compulsivo que lleva a la pérdida de pelo facial y a lesiones en la piel [27]. Al realizar estudios bioquímicos, estructurales y electrofisiológicos en el cerebro del ratón, se apreciaron defectos en las sinapsis glutamatérgicas cortico-estriatales e interesadamente al restaurar la expresión de SAPAP 3 mediante lentivirus, los defectos sinápticos y conductuales desaparecieron [27]. Por otro lado, al administrar fluoxetina (ISRS) la excesiva ansiedad y exceso de “grooming” desaparecieron [27].

La proteína SLITRK5 regula el crecimiento de neuritas, la supervivencia neuronal y se encuentra predominantemente expresada en densidades post-sinápticas de neuronas corticales y estriatales. Shmelkov y colaboradores demostraron que un ratón *knockout* para *SLITRK5* muestra comportamientos tipo TOC, como aquellos observados en el ratón KO para *SAPAP 3*, que se manifiestan con un excesivo “grooming” y un incremento en la ansiedad, las cuales son revertidas tras la administración de fluoxetina. El ratón KO para *SLITRK5* muestra también una sobreactivación de la corteza orbitofrontal, alteraciones en la anatomía estriatal y en la composición del receptor de glutamato, lo que contribuye al déficit de la neurotransmisión glutamatérgica cortico-estriatal [28]. Los antecedentes mostrados anteriormente sugieren que una alteración en la neurotransmisión glutamatérgica del circuito CSTC estaría involucrada fuertemente en la fisiopatología del TOC.

5) ROL DE EAAT₃ EN TOC.

El glutamato es el neurotransmisor más abundante en el sistema nervioso central y en condiciones normales las concentraciones de glutamato en el espacio sináptico deben permanecer dentro 0,6 – 1µM, ya que a concentraciones superiores a 1 µM de glutamato es neurotóxico [29]. La homeostasis del glutamato en la hendidura sináptica depende de su recaptura por una familia de proteínas de membrana, denominadas transportadores de aminoácidos excitatorios (EAAT). Actualmente se han descrito 5 transportadores enumerados con las siglas EAAT1 hasta EAAT5 [30].

La proteína EAAT₃ es codificada por el gen *SLC1A1* localizado en la región cromosómica 9p24 [31]. El gen *SLC1A1* es considerado el candidato más fuerte para asociarse a TOC, basado en la relativa consistencia en varios estudios en la asociación genética con TOC [31, 32]. En 2006 Arnold y colaboradores, y Dickel y colaboradores publicaron simultáneamente estudios independientes demostrando que variantes en el gen *SLC1A1* estaban asociadas con TOC [33, 34]. Un tercer estudio reveló una asociación entre el gen *SLC1A1* y TOC, al encontrar en estos pacientes un haplotipo con polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, *Single nucleotide polymorphisms*, por sus siglas en inglés) en la tercera región del gen [35].

Hace unos pocos años atrás el Dr. Pablo Moya y colaboradores realizaron un estudio caso-control para un gen candidato, encontrándose una fuerte asociación de un haplotipo en *SLC1A1* y TOC [36]. Por otro lado EAAT₃ tiene una expresión prominente en corteza, estriado y tálamo, todas áreas involucradas en el circuito CSTC [20].

6) APROXIMACIÓN CON UN RATÓN EAAT3^{+/-} AL TOC.

Desde que existe el ratón *knockout* para EAAT3, se puede pensar que es el modelo ideal para estudiar todos los cambios conductuales y neuroquímicos que este animal puede tener y ser relacionados con el TOC. Sin embargo, es importante recordar que gran parte de los pacientes en los que se han encontrado polimorfismos para el gen SLC1A1 corresponden a pacientes heterocigotos [33, 35, 36], por lo que resulta muy interesante estudiar neuroquímicamente el circuito CSTC del ratón heterocigoto para EAAT3 y los cambios conductuales asociados a cambios en la neurotransmisión de estas estructuras que pudieran relacionarse con el TOC.

Por estos motivos, se ha realizado en esta tesis la evaluación neuroquímica y conductual de un ratón heterocigoto para *Eaat3*, que tiene una menor expresión de esta proteína que un ratón silvestre.

HIPOTESIS

La hipótesis de este proyecto de tesis fue “El ratón *Eaat3*^{+/-} presenta un fenotipo conductual ansioso que se relaciona con un contenido alterado de neurotransmisores monoaminérgicos y aminoacidérgicos en áreas del circuito cortico-estriado-tálamo-cortical (CSTC)”.

OBJETIVOS

1) OBJETIVO GENERAL

Estudiar el contenido de neurotransmisores aminoacidérgicos y monoaminérgicos en áreas del circuito cortico-estriado-tálamo-cortical (CSTC), así como la evaluación de un fenotipo ansioso-compulsivo en un ratón *Eaat3^{+/-}* a través de paradigmas conductuales establecidos.

2) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para dar cumplimiento al objetivo general de esta tesis se propuso desarrollar los siguientes objetivos específicos:

- Determinar el genotipo de los ratones (*Eaat3^{+/+}* y *Eaat3^{+/-}*) a utilizar mediante PCR convencional.
- Determinar el contenido tisular de neurotransmisores monoaminérgicos y sus metabolitos como Dopamina (DA), ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC), Serotonina (5-HT) y ácido 5 hidroxindolacético (5-HIAA) en áreas del circuito CSTC de ratones *Eaat3^{+/+}* y *Eaat3^{+/-}*, mediante la microdissección cerebral y posterior determinación en un cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a detector electroquímico (HPLC-EC).
- Determinar el contenido tisular de neurotransmisores aminoacidérgicos como Glutamato (Glu) y ácido γ -aminobutírico (GABA) en áreas del circuito CSTC de ratones *Eaat3^{+/+}* y *Eaat3^{+/-}*, mediante la microdissección cerebral y posterior determinación en un cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a detector fluorimétrico (HPLC-FP).
- Determinar el fenotipo conductual de ratones *Eaat3^{+/+}* y *Eaat3^{+/-}* a través de pruebas conductuales como la de Exploración de Campo Abierto, la de Laberinto Elevado en Cruz, la de Enterrado de Canicas y Actividad Locomotora.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1) OBTENCIÓN DE LOS ANIMALES.

El ratón *Eaat3^{+/−}* fue desarrollado por el Dr. Pablo Moya quien inyectó el vector en células madre embrionarias (ES). El vector utilizado fue generado por el proyecto trans-NIH-Knock-Out Mouse Project (KOMP) y obtenido del depositario KOMP (www.komp.org). Esto se realizó en el NIMH transgenic core, NIH, E.E.U.U.

2) ANIMALES.

Se utilizó ratones machos y hembras C57BL/6 *wild type* (*silvestres*) y transgénicos de entre 3 y 6 meses de edad, de un peso aproximado de 30 gramos. Todos los animales fueron alojados en una sala de temperatura controlada (22 ± 2 °C) bajo ciclos día-noche (12: 12 horas) con comida y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética y de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso, otorgados al Proyecto Fondecyt Regular N° 114-1272 del Dr. Pablo R. Moya. Se realizaron todos los esfuerzos para reducir al mínimo el número de animales utilizados en este proyecto y su sufrimiento. El número de animales para cada experimento se muestran en la leyenda de cada gráfico.

3) REACTIVOS.

El estándar de DA, DOPAC, 5-HT, 5-HIAA, Glu, GABA, EDTA y ácido 1-octanosulfónico fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, Missouri, EE.UU) y Financiados por el Proyecto FONDECYT Regular N° 116-0398 del Dr. Ramón Sotomayor-Zárate. La Anfetamina utilizada en esta tesis corresponde a la sal sulfato y fue donada por el Laboratorio Chile S.A. (Ñuñoa, Santiago, Chile) a la Dra. Georgina M. Renard de la Universidad de Valparaíso. Todos los otros reactivos utilizados en esta tesis fueron de grado analítico y molecular según corresponda.

4) GENOTIPIFICACIÓN DE LOS ANIMALES.

Para identificar los animales a utilizar, se procedió a obtener biopsias de las colas de cada camada obtenida. Estas biopsias de 0,5 cm de longitud fueron tomadas a los 21 días de edad. Después de sacar la muestra se procedió a usar un antihemorrágico de uso veterinario (Quick Blood Stopper, Stephens Pharmaceutical Company). Posterior a esto se procedió a extraer el ADN genómico de las colas según el siguiente protocolo: En tubos individuales de 1,5 mL se depositaron las biopsias de colas y se suplementaron con 400 μ L de buffer de lisis (0,1M de buffer tris, 0,2 M de NaCl, 5 mM EDTA Y 0,4% SDS) y proteinasa K (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU) 0,2 mg/mL. Luego se incubaron a 55°C por 2-3 horas o hasta la disgregación completa del tejido. Una vez disgregado el tejido se centrifugo a velocidad máxima (13000 rpm) por 3 min. a temperatura ambiente, y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Al sobrenadante se le agregaron 500 μ L de isopropanol puro (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU). Luego se procedió a centrifugar a velocidad máxima (13000 rpm) por 3 min. a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y sobre el pellet formado se agregó 1 mL de etanol al 70% (etanol de grado biología molecular, laboratorio Merck) y se agitó mediante un vórtex y se volvió a centrifugar a 13000 rpm por 3 minutos. A continuación se descartó el sobrenadante y se dejó secando el tubo eppendorf con el pellet en su interior a temperatura ambiente por alrededor de 10 – 15 min. Una vez seco el pellet, se le agregó a cada tubo 100 μ L de agua bidestilada y estéril precalentada a 55°C. Se procedió a incubar los tubos a 37°C por unos 10 minutos o hasta que el pellet de ADN se resuspendiera completamente mientras se agitaba en el vórtex esporádicamente. Por último se procedió a cuantificar el ADN en un espectrofotometro (nanodrop) obteniéndose la razón de purezas (razón de absorbancia 260 nm/280 nm y 260/230) que van desde 1,7 a 1,9 y de 2,0 a 2,2 respectivamente. Una vez obtenido el ADN genómico de cada animal, se procedió a realizar el PCR convencional. Para este propósito se usaron 2 juegos de partidores a una concentración final de 0,4 μ M, uno de

ellos denominado “newLoxP” constituido por el partidor newLoxP-Forward (5´ ACC CAA TTT CAC ACC CTC CTC AGC 3´) y por el partidor newLoxP-Reverse (5´ GAT TTC GTT TCT ACC TCG GGC CTA 3´) y el segundo juego de partidores denominado “1a1-En2”, constituido por el partidor 1a1En2-Forward (5´ TGG CTC GGG TTT CTC CTA GCT GGT 3´) y otro denominado 1a1-en2-Reverse (5´ CCA ACT GAC CTT GGG CAA GAA CAT 3´), ambos partidores fueron diseñados por el Dr. Pablo Moya a través del software Primer-Blast. El uso de ambos juegos de partidores permite diferenciar de manera certera el genotipo de los ratones (Ver figura 3). Los partidores newLoxP generan una banda de 210 pb que muestra la presencia de los sitios loxP en el ratón EAAT3^{+/-} y por tanto la presencia del constructo; la banda de 185 pb muestra la ausencia de los sitios loxP y por ende del constructo identificando así a un ratón *Eaat3*^{+/-}. Los partidores En2 (control positivo) permiten corroborar el genotipo evidenciado con los partidores newloxP, ya que la banda a 500 pb solo es posible observarla en ratones que poseen el constructo. Se utilizó el SapphireAmp Fast PCR master mix (Takara) el cual contiene la polimerasa, los deoxi-nucleótidos y los co-factores enzimáticos. Para realizar el PCR se cargaron 2µL de ADN + 8 µL del juego de partidores correspondiente + 10 µL del master mix SapphireAmp en tubos de reacción individuales. Los ciclos de PCR utilizados fueron los siguientes: denaturación inicial a 95°C por 10:00 min, [94°C 0:30, 57°C 0:30, 72°C 0:30] x 30 ciclos, 72°C 10:00, 4°C. Una vez terminado el PCR, se procedió a cargar las muestras en un gel de agarosa al 2%, el cual fue preparado con buffer TBE (Winkler, Ltda.), agarosa de grado analítico (LAFKEN, Fermelo Biotec) y al cual también se le agregó 6 µl de la tinción fluorescente para ácidos nucleicos GelRed (Biotium Inc.). El gel se sumergió en una cámara electroforética (modelo B2, clase II, owl separation systems, Inc., USA) y se procedió a cargar cada muestra en un bolsillo determinado del gel. Una vez cargadas las muestras, se realizó la electroforesis a 120 V durante aproximadamente 2 horas. Por último, el gel fue extraído de la cámara electroforética para su visualización en un transiluminador

(modelo ENDURO GDS, Labnet international, Inc, USA) a partir del cual se tomaron las fotos del gel para el posterior análisis de los genotipos.

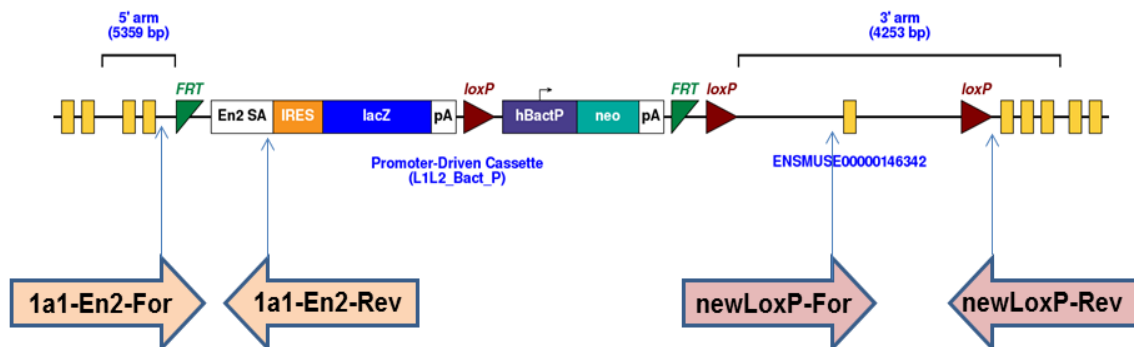


Figura 3. Esquema del constructo genético que impide la normal expresión del transportador Eaat3. Las flechas celestes delgadas indican las regiones en la que cada partidor se une al constructo genético. Figura adaptada del Knockout Mouse Project (KOMP).

5) HOMOGENIZACIÓN DE TEJIDOS CEREBRALES.

Los tejidos cerebrales microdisectados fueron corteza prefrontal, cuerpo estriado, tálamo e hipocampo. Una vez microdisectadas las áreas de interés se procedió a pesarlas en una balanza analítica (Modelo JK-180, Chyo, Japón) y a guardarlas en un tubo Eppendorf de 1.5 mL a -80°C hasta su posterior uso. Estos tejidos se homogenizaron según el protocolo adaptado de Chi y cols. [37]. Brevemente, a cada tubo con el respectivo tejido cerebral se le agregaron 400 μL de ácido perclórico (PCA) 0,2 N y con la ayuda de un sonicador (Microson XL, Heat System) los tejidos fueron homogenizados. El homogenizado obtenido fue centrifugado a 13.000 g por 10 min a 4°C y el sobrenadante obtenido se separó y filtró a través de una unidad de filtración de 0,2 μm de poro (Cole-Palmer, USA). La solución filtrada fue usada en la determinación de neurotransmisores por HPLC-EC y HPLC-FP.

6) DETERMINACIÓN DE MONOAMINAS POR HPLC-EC.

Diez μL de cada solución filtrada fueron inyectados en un HPLC-EC con la siguiente configuración: Inyector Rheodyne, una bomba isocrática (Modelo PU-2080 Plus, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón), una columna C18 (Modelo MF-8g12, BAS, West Lafayette, IN, USA) y un

detector electroquímico (Modelo LC-4C, BAS, West Lafayette, IN, USA) configurado a un potencial de oxidación de 650 mV y una sensibilidad de 0.5 nA (ver figura 4). La fase móvil que se utilizó para la determinación de monoaminas fue bombeada a un flujo de 0,1 mL/min y tuvo la siguiente composición: 100 mM de NaH_2PO_4 , 1.0 mM de ácido 1-octanosulfónico, 1.0 mM de EDTA y 3,5% v/v de acetonitrilo (ajustado a pH 2.3). Las áreas de los picos de monoaminas en las muestras fueron comparadas con estándares de referencia y se calcularon las concentraciones de DA, DOPAC, 5-HT Y 5-HIAA usando una curva de calibrado realizada en un programa cromatográfico (Program ChromPass, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón) [38].

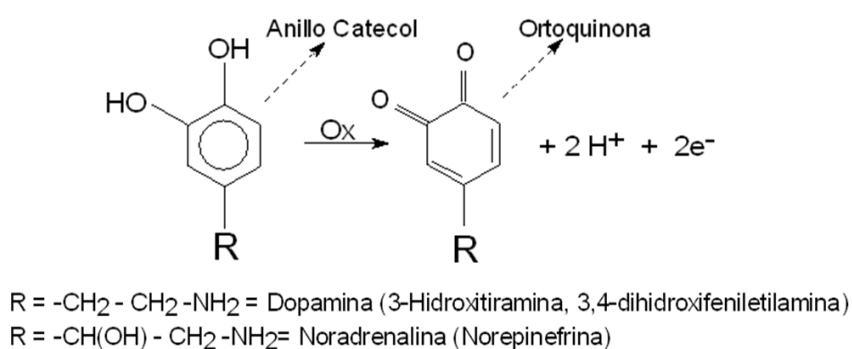


Figura 4. Esquema de la oxidación de catecolaminas que ocurre en el electrodo de trabajo del detector electroquímico. La oxidación de una molécula de catecolamina produce 2 electrones, esta corriente es directamente proporcional a la cantidad de moléculas de catecolaminas oxidadas. (Figura Laboratorio de neuroquímica y Neurofarmacología).

7) DETERMINACIÓN DE GLUTAMATO Y GABA POR HPLC-FP.

20 μL de cada muestra filtrada fue mezclada mediante un vórtex con 4 μL de orto-ftalaldehído (OPA) y 4 μL de borato. Luego se procedió a dejar la muestra a temperatura ambiente por 90 seg. y protegida de la luz (figura 5). Luego, las muestras fueron inyectadas en un HPLC-FP con la siguiente configuración: Inyector Rheodyne, una bomba isocrática (Modelo PU-4180, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón), una columna Kromasil 100-3.5-C18 (dim: 4.6 x 50 mm) y un detector de fluorescencia (Modelo FP-4025, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón). La fase móvil que se utilizó para la determinación de glutamato y GABA fue bombeada a un

flujo de 1 mL/min y tuvo la siguiente composición: 0.3 M de NaH_2PO_4 y 20% v/v de acetonitrilo (ajustado a pH 5,7). Las áreas de los picos de Glutamato y GABA en las muestras fueron comparadas con estándares de referencia y se calcularon las concentraciones de estos neurotransmisores usando una curva de calibrado realizada en el programa ChromNAV control center (ChromNAV, Jasco Co. Ltd., Tokio, Japón) [39].

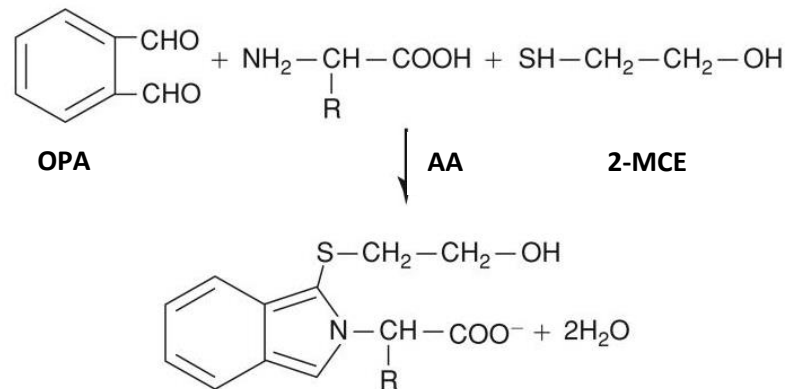


Figura 5. Reacción con Orto-ftalaldehído (OPA). OPA reacciona con una amina primaria de un aminoácido en presencia de 2-mercaptoetanol formando un derivado isoindol sustituido, que es susceptible a la detección fluorimétrica. Figura adaptada del trabajo de Zapata A. [40].

8) PARADIGMAS CONDUCTUALES

Todos los experimentos conductuales fueron llevados a cabo en una sala de conducta especializada, con amortiguación de sonido, temperatura (22 ± 2 °C) e iluminación regulada (luz roja ambiental). Entre cada experimento conductual, los objetos usados durante las pruebas conductuales se limpiaron con etanol al 5% para evitar imprevistos olfatorios.

8.1) Prueba de Exploración de Campo Abierto

Los ratones fueron llevados a la sala de conducta y colocados en sus cajas junto a sus compañeros de camada al menos durante 30 min antes de comenzar la prueba. Posterior al tiempo de habituación, cada animal fue puesto individualmente en el centro de una caja plástica blanca (40 x 35 x 40 cm) y se le permitió explorar por 5 minutos. Los parámetros como tiempo de permanencia en el centro (20 x 20 cm), tiempo en la periferia y frecuencia

con la que visita el centro de la caja fueron grabados y analizados usando el sistema de análisis de video Noldus Ethovision (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA) [41].

8.2) Prueba de Laberinto Elevado en Cruz

Los ratones fueron llevados a la sala de conducta y colocados en sus cajas junto a sus compañeros de camada al menos durante 30 min antes de comenzar la prueba. Posterior al tiempo de habituación, cada animal fue puesto individualmente en el centro del laberinto (Brazos abiertos 30 cm x brazos cerrados 30 x altura 46 cm.) y se les permitió explorar por 5 minutos. Los parámetros como tiempo de permanencia en los brazos cerrados, abiertos y tiempo en el centro del laberinto fue grabado y analizado usando el sistema de análisis de video Noldus Ethovision (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA) [41].

8.3) Prueba de Enterrado de Canicas.

Los animales fueron llevados a la sala de conducta y colocados individualmente en cajas plásticas transparentes (18 x 32 x 14 cm) las cuales tenían 5 cm de alto de viruta y en la superficie 15 canicas de vidrio oscuras (1,5 cm de diámetro), las cuales fueron distribuidas en 3 filas de 5 canicas cada una. Los ratones estuvieron en la caja por 30 min. Posterior a esto se procedió a retirar los animales de las cajas y a contar el número de canicas enterradas. Se consideraron como enterradas aquellas canicas que estaban completamente cubiertas y también aquellas que estaban cubiertas con al menos 2/3 de viruta[41].

8.4) Actividad Locomotora.

La actividad locomotora basal e inducida por anfetamina fue medida en ambos grupos. Cada animal fue colocado en una caja de plástico blanca (40 x 35 x 40 cm) y para los primeros 30 min se registró la actividad locomotora basal. Luego se procedió a inyectar suero fisiológico (5 mL/Kg i.p.) y se registró la actividad locomotora por otros 30 minutos. Finalmente se procedió a inyectar a los ratones con una dosis de anfetamina (5 mg/Kg i.p.

disuelto en solución salina fisiológica) y su actividad locomotora se registró durante 60 min. La actividad locomotora fue grabada y analizada usando el sistema de análisis de video Noldus Ethovision (Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA) [42].

9) **CÁLCULOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Los resultados fueron expresados como valor promedio \pm error estándar medio (SEM). Las diferencias entre el grupo de estudio y grupo control para los paradigmas que evaluaron ansiedad, actividad locomotora y contenido total de neurotransmisores fueron analizadas por t-test paramétrico no-pareado debido a que todos los datos pasaron la prueba de normalidad a través del test Shapiro-wilk y la diferencia estadísticamente significativa se estableció cuando el valor de p fuera menor que 0,05. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism v6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS

1) GENOTIPIFICACIÓN DE LOS ANIMALES USADOS EN ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS Y CONDUCTUALES.

En la figura 6 se observa la imagen de un gel de agarosa representativo en la que se aprecian las distintas bandas correspondientes al tipo de genotipo. En el primer y último bolsillo del gel se encuentran el estándar de tamaño molecular. En el segundo bolsillo se encuentra el control negativo, mientras que en antepenúltimo y penúltimo bolsillo se encuentran los controles positivos que corresponden a amplicones de un ratón *Eaat3*^{+/-} y *Eaat3*^{+/+}, respectivamente. Todos los demás bolsillos corresponden a muestras en las que se debía determinar el genotipo. Se puede determinar mediante el análisis de la imagen que aquellos ratones que presentan una banda en los 210 pb pertenecientes a las zonas *LoxP* corresponden ratones heterocigotos, lo cual es confirmado por la presencia de la banda a 500 pb que corresponde a la presencia de las zonas 1a1-en2.

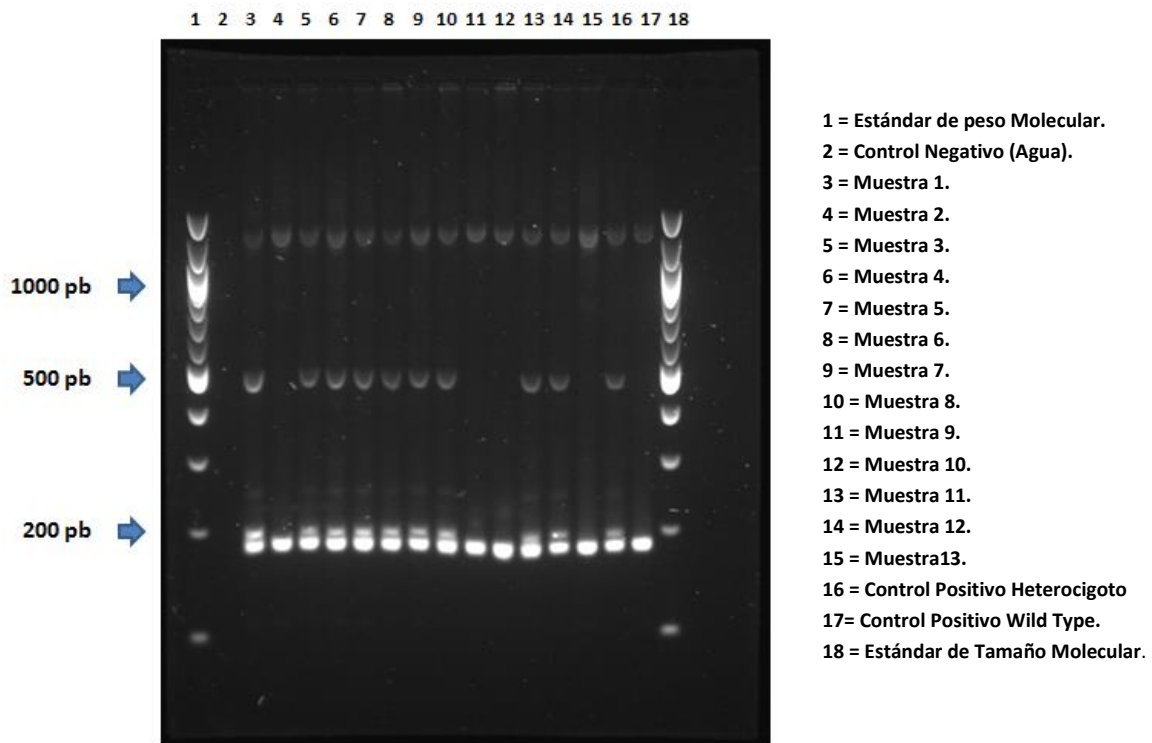


Figura 6. Fotografía de un gel de agarosa utilizado en la determinación del genotipo de los animales destinados a las pruebas conductuales y neuroquímicas.

2) **EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO EN RATONES MACHOS MEDIANTE LA PRUEBA DE EXPLORACIÓN DE CAMPO ABIERTO.**

Respecto a la prueba de exploración de campo abierto no hubo diferencias significativas al momento de medir la cantidad de tiempo que pasaron los ratones $Eaat3^{+/-}$ ($273,7 \pm 3,3$ s) y $EAAT3^{+/+}$ ($276,4 \pm 2,7$ s) en la periferia de la arena (Figura 7, Panel A). Tampoco se observaron diferencias significativas en el tiempo que pasaron en el centro los ratones los $Eaat3^{+/+}$ y $Eaat3^{+/-}$ ($26,33 \pm 3,3$ s versus $23,64 \pm 2,7$ s, respectivamente)(Figura 7, Panel B), ni en la frecuencia en entrar al centro de la caja entre los ratones los $Eaat3^{+/+}$ y $Eaat3^{+/-}$ ($18,67 \pm 3,1$ entradas versus $12,71 \pm 1,4$ entradas, respectivamente)(Figura 7, Panel C).

Figura 7:

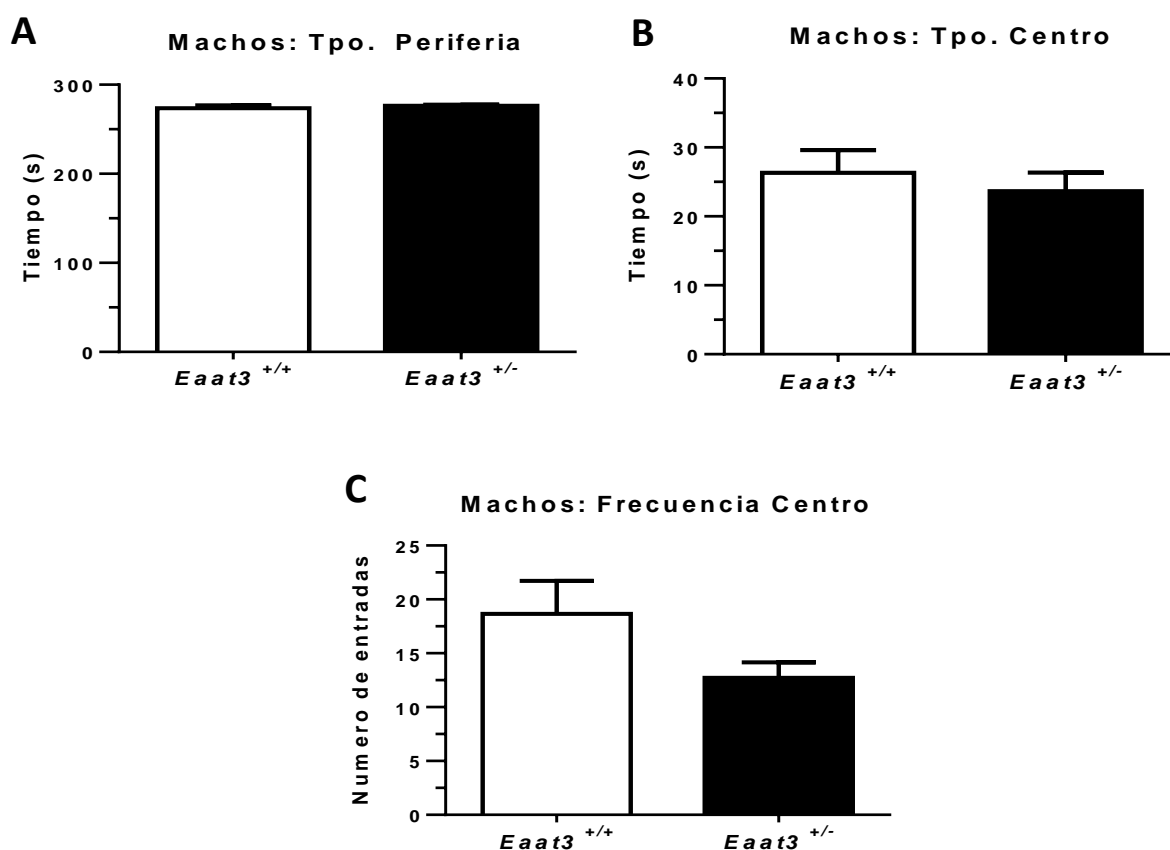


Figura 7. Resultados de la prueba de exploración de campo abierto en los ratones $Eaat3^{+/-}$ y $Eaat3^{+/+}$, en donde se puede observar el tiempo de permanencia en la periferia (A), centro (B) y la frecuencia en número de veces en la que el animal entraba al centro de la caja (C). Los resultados fueron expresados en segundos y número de entradas al centro de la caja que representan la media \pm SEM ($n=12$ $Eaat3^{+/+}$ y $n=13$ $Eaat3^{+/-}$).

3) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO EN RATONES MACHOS MEDIANTE LA PRUEBA DE LABERINTO ELEVADO EN CRUZ.

En esta prueba los ratones $Eaat3^{+/-}$ no mostraron diferencias significativas con respecto a los $Eaat3^{+/+}$ en la permanencia en los brazos abiertos ($113,4 \pm 23,4$ s versus $121,0 \pm 15,7$ s, respectivamente)(Figura 8, Panel A), en la permanencia en los brazos cerrados ($145,8 \pm 25,1$ s versus $126,1 \pm 13,4$ s, respectivamente)(Figura 8, Panel B), ni en el tiempo de permanencia en el centro del laberinto ($34,13 \pm 3,7$ s versus $39,74 \pm 7,0$ s)(Figura 8, Panel C).

Figura 8:

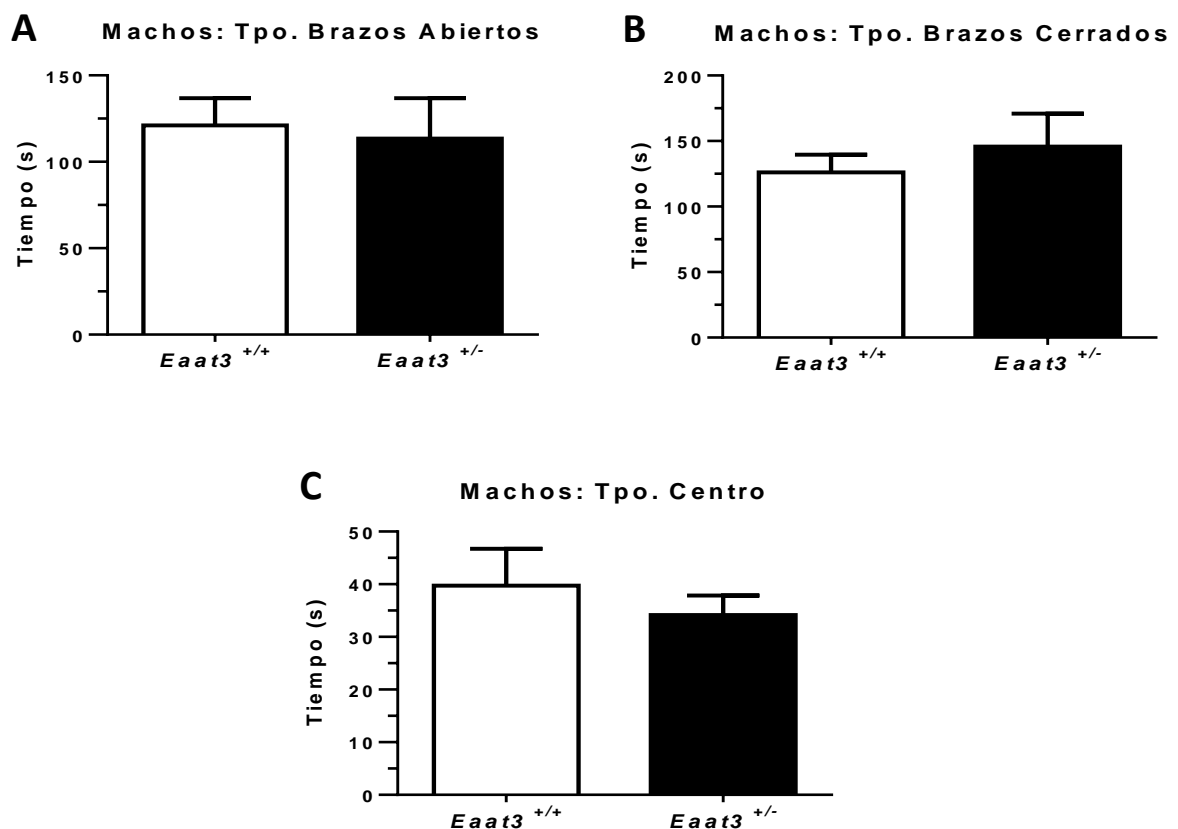


Figura 8. Resultados de la prueba laberinto elevado en cruz en los ratones $Eaat3^{+/-}$ y $Eaat3^{+/+}$, en donde se puede observar el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (A), brazos cerrados (B) y centro del laberinto (C). Los resultados fueron expresados en segundos que representan la media \pm SEM ($n=12$ $Eaat3^{+/+}$ y $n=10$ $Eaat3^{+/-}$).

4) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO-COMPULSIVO EN RATONES MACHOS MEDIANTE LA PRUEBA DE ENTERRADO DE CANICAS (MARBLE BURYING).

En esta prueba los ratones $Eaat3^{+/-}$ no mostraron diferencias significativas en el número de canicas enterradas en 30 minutos con respecto a los ratones $Eaat3^{+/+}$ ($7,7 \pm 0,8$ canicas versus $6,4 \pm 1,4$ canicas, respectivamente)(Figura 9).

Figura 9:

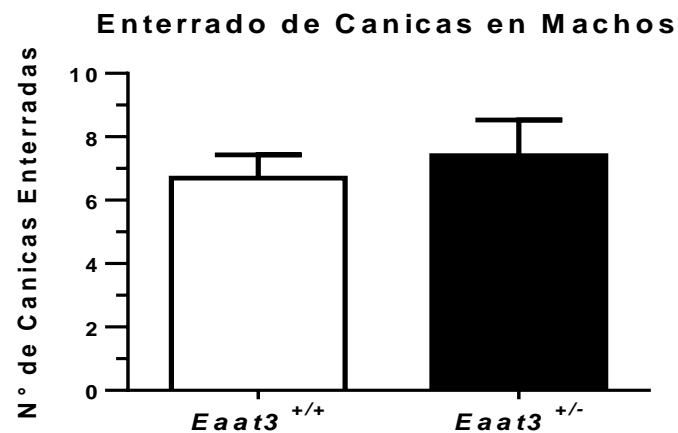


Figura 9. Resultados de la prueba de enterrado de canicas en ratones $Eaat3^{+/-}$ y $Eaat3^{+/+}$, donde se puede observar el número de canicas enterradas dentro de los 30 min de prueba. Los resultados fueron expresados en número de canicas enterradas que representan la media \pm SEM ($n=10 Eaat3^{+/+}$ y $n=10 Eaat3^{+/-}$).

5) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN RATONES MACHO EAAT3^{+/-} Y EAAT3^{+/+}.

Se observó que la actividad locomotora basal e inducida por anfetamina no presenta diferencias estadísticamente significativas en el curso temporal (Figura 10, panel A) y en la actividad locomotora acumulativa (Figura 10, panel B) entre los grupos de ratones machos *Eaat3*^{+/-} y *Eaat3*^{+/+}.

Figura 10:

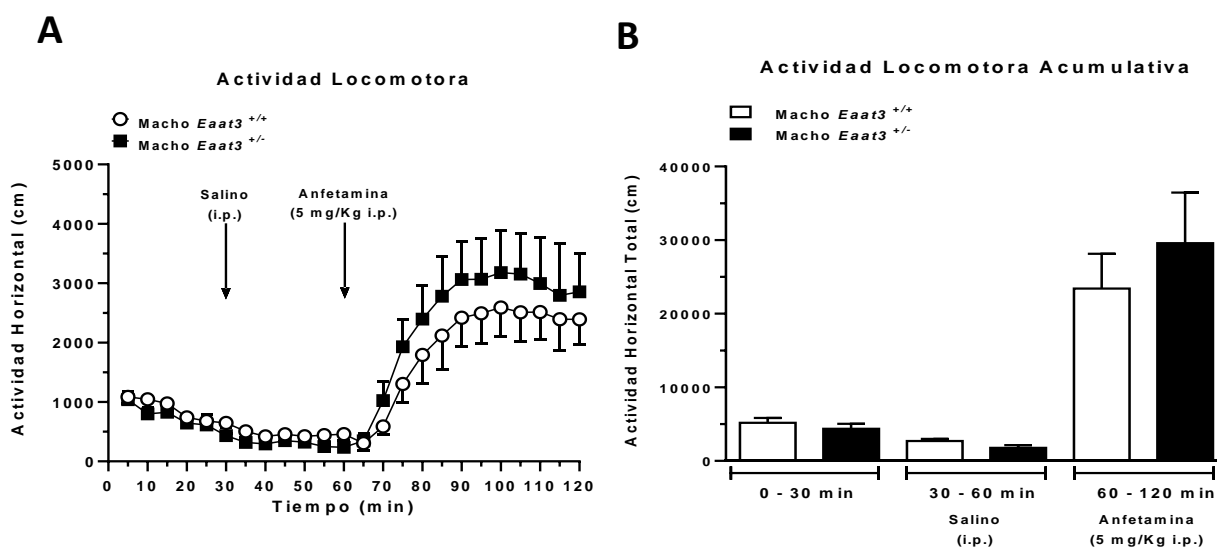
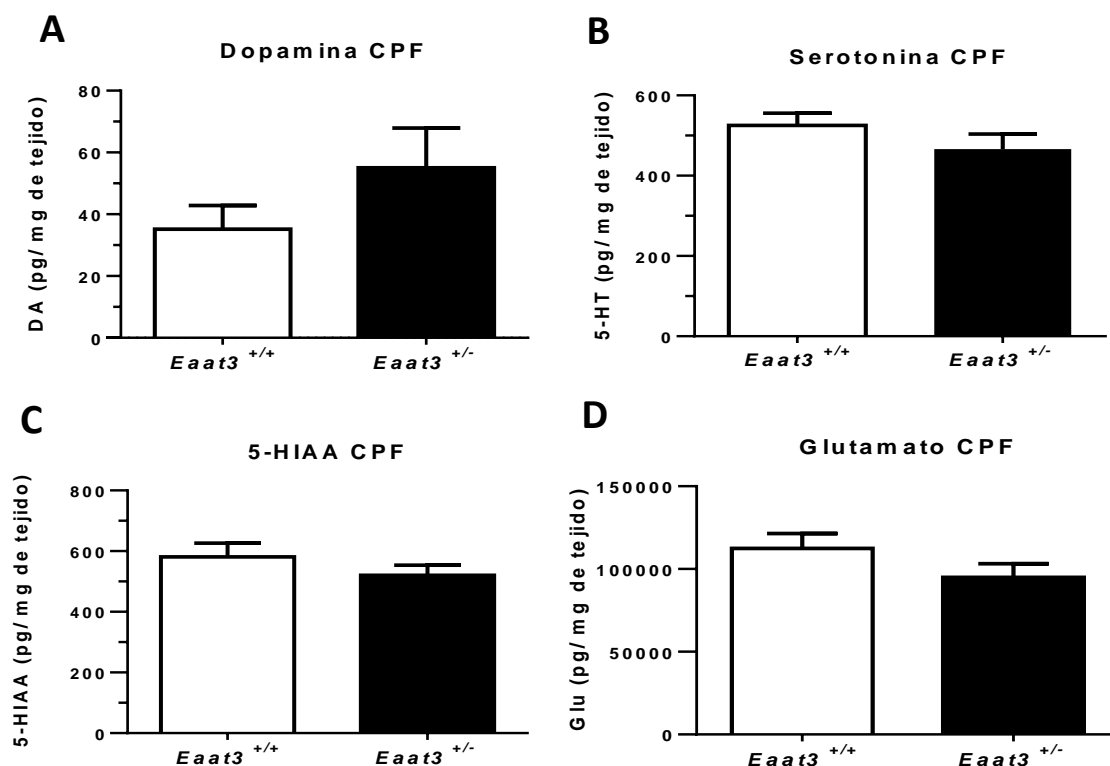


Figura 10. Efecto del genotipo sobre la actividad locomotora inducida por la administración de anfetamina (5 mg/Kg i.p.) en ratones macho *Eaat3*^{+/-} y *Eaat3*^{+/+}. Resultados expresados como media \pm SEM ($n=5$ machos *Eaat3*^{+/-} y $n=5$ machos *Eaat3*^{+/+}). Actividad locomotora basal e inducida por anfetamina (A) y Actividad Locomotora Acumulativa (B).

6) EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE NEUROTRANSMISORES MONOAMINÉRGICOS Y AMINOACIDÉRGICOS EN CORTEZA PREFRONTAL DE RATONES MACHOS $EaAT3^{+/-}$ Y $EaAT3^{+/+}$.

Respecto al contenido de DA, se puede observar que no existe diferencia significativa entre el ratón $Eaat3^{+/-}$ ($55,00 \pm 12,93$ pg/mg de tejido) versus $Eaat3^{+/+}$ ($35,17 \pm 7,66$ pg/mg de tejido) (Figura 11, Panel A). Respecto al contenido de 5-HT y 5-HIAA, tampoco existe diferencia significativas entre el ratón $Eaat3^{+/-}$ ($466,4 \pm 37,23$ pg/mg de tejido y $520,4 \pm 33,03$ pg/mg tejido, respectivamente) versus el grupo control $Eaat3^{+/+}$ ($525,4 \pm 30,52$ pg/mg de tejido y $581,3 \pm 45,33$ pg/mg de tejido, respectivamente)(Figura 11, Panel B y C). En cuanto a los neurotransmisores aminoacídicos, el contenido de Glu en el ratón $Eaat3^{+/-}$ (94899 ± 8347 pg/mg de tejido) no presenta cambios significativos respecto al ratón $Eaat3^{+/+}$ (112391 ± 9014 pg/mg de tejido)(Figura 11, Panel D), así como tampoco existen cambios significativos con respecto a GABA en el ratón $Eaat3^{+/-}$ ($64,33 \pm 10,04$ pg/mg de tejido) versus el $Eaat3^{+/+}$ ($69,00 \pm 4,761$ pg/mg de tejido)(Figura 11, panel E).

Figura 11:



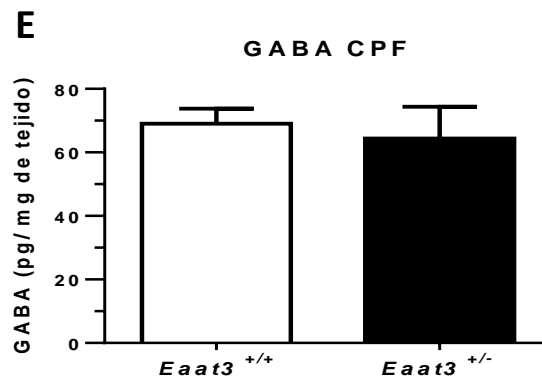
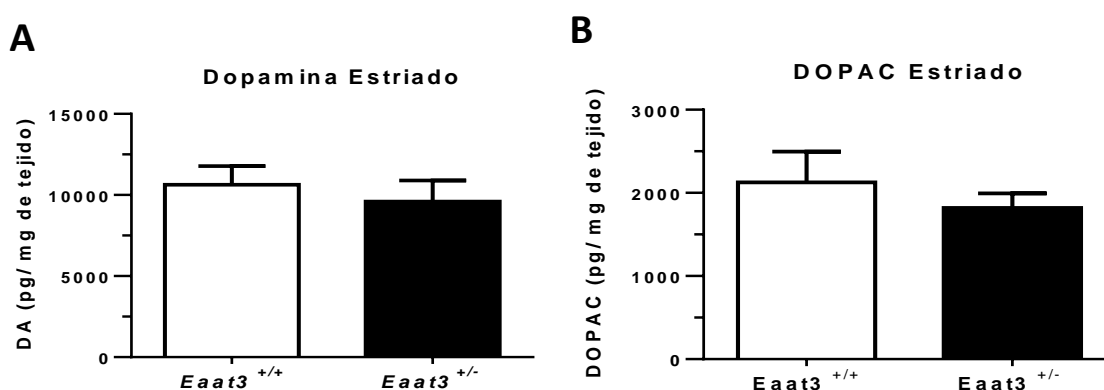


Figura 11. Contenido total de neurotransmisores en corteza prefrontal, area perteneciente al circuito CETC en ratones macho *Eaat3*^{+/-} y *Eaat3*^{+/+}. Contenido Dopamina (A), Serotonina (B), 5-HIAA (C), Glutamato (D) y GABA (E). Los resultados fueron expresados como pg/mg de tejido que representan la media \pm SEM (Dopamina n=5 *Eaat3*^{+/-} y n=6 *Eaat3*^{+/+}; 5-HT, 5-HIAA y Glutamato n=7 por grupo; GABA n= 6 por grupo).

7) EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE NEUROTRANSMISORES MONOAMINÉRGICOS Y AMINOACIDÉRGICOS EN CUERPO ESTRIADO DE RATONES MACHOS $Eaat3^{+/-}$ Y $Eaat3^{+/+}$.

Respecto al contenido de DA y DOPAC, se puede observar que no existe diferencia significativa entre el ratón $Eaat3^{+/-}$ (9593 ± 1296 pg/mg de tejido y $1818 \pm 174,8$ pg/mg de tejido, respectivamente) versus el $Eaat3^{+/+}$ (10631 ± 1147 pg/mg de tejido y $2126 \pm 370,6$ pg/mg de tejido) (Figura 12, Panel A y B). Respecto al contenido de 5-HT y 5-HIAA, tampoco existen diferencias significativas entre el ratón $Eaat3^{+/-}$ ($512,0 \pm 51,75$ pg/mg de tejido y $792,9 \pm 72,27$ pg/mg de tejido, respectivamente) versus el grupo control $Eaat3^{+/+}$ ($473,9 \pm 51,54$ pg/mg de tejido y $667,6 \pm 76,78$ pg/mg de tejido, respectivamente)(Figura 12, Panel C y D). En cuanto a los neurotransmisores aminoacidérgicos, el contenido de Glu en el ratón $Eaat3^{+/-}$ (140427 ± 8711 pg/mg de tejido) no presenta cambios significativos respecto al ratón $Eaat3^{+/+}$ (150440 ± 12434 pg/mg de tejido)(Figura 12, Panel E), así como tampoco existen cambios significativos con respecto a GABA en el ratón $Eaat3^{+/-}$ ($121,7 \pm 14,83$ pg/mg de tejido) versus el $Eaat3^{+/+}$ ($100,0 \pm 6,279$ pg/mg de tejido)(Figura 12, panel E).

Figura 12:



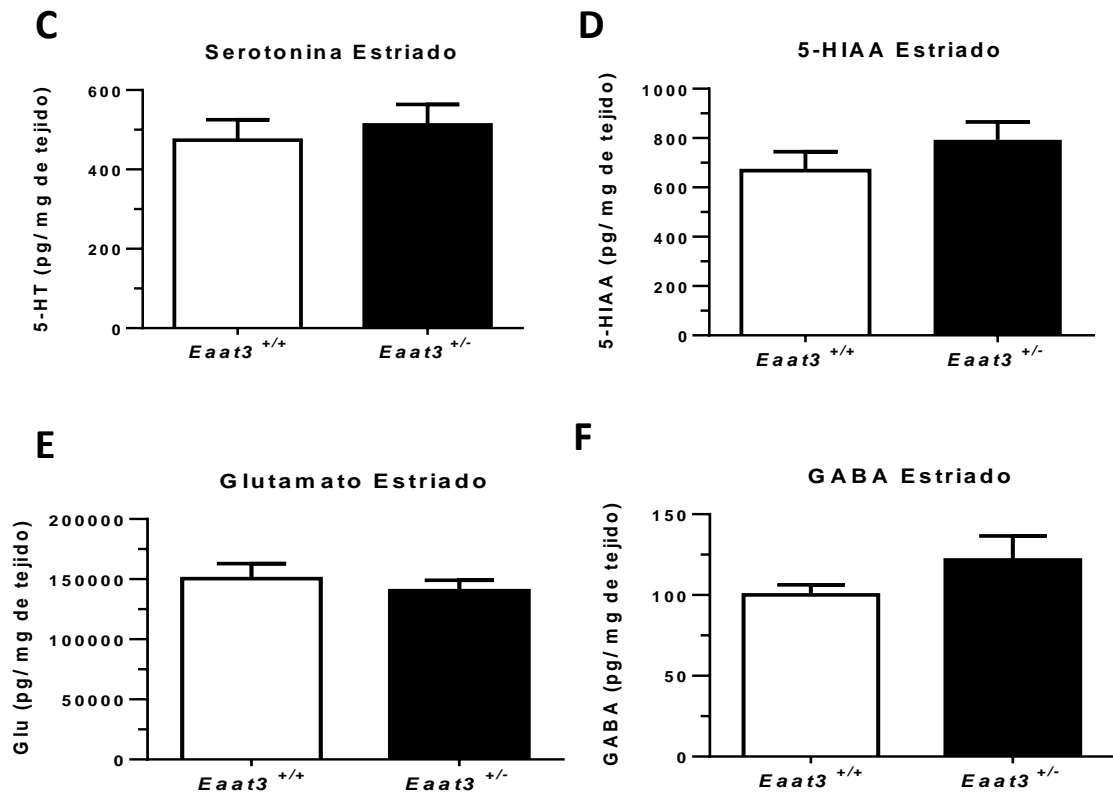
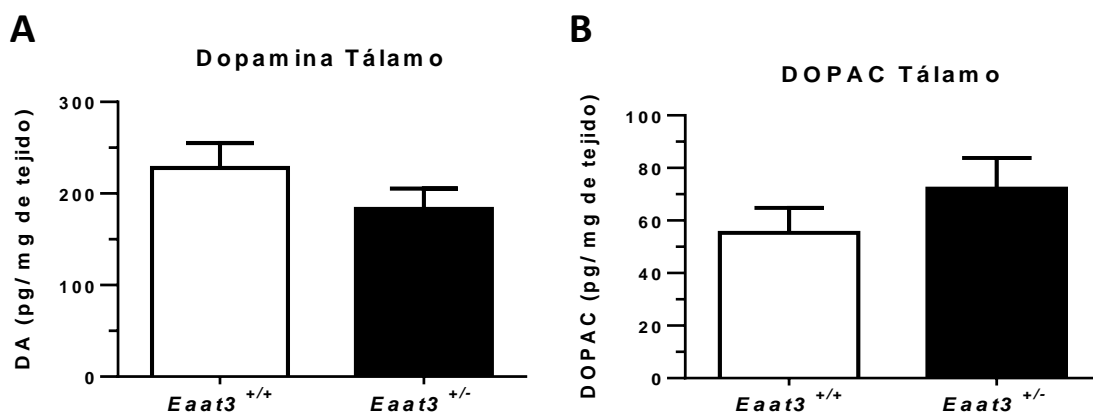


Figura 12. Contenido total de neurotransmisores en Cuerpo Estriado, area perteneciente al circuito CETC en ratones macho *Eaat3*^{+/-} y *Eaat3*^{+/+}. Contenido Dopamina (A), Dopac (B) Serotonina (C), 5-HIAA (D), Glutamato (E) y GABA (F). Los resultados fueron expresados como pg/mg de tejido que representan la media \pm SEM (Dopamina y Dopac n=7 *Eaat3*^{+/-} y n=6 *Eaat3*^{+/+}; 5-HT n=6 *Eaat3*^{+/-} y n=7 *Eaat3*^{+/+}; 5-HIAA n=7 por grupo; Glutamato n=7 por grupo; GABA n= 7 por grupo).

8) EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE NEUROTRANSMISORES MONOAMINÉRGICOS Y AMINOACIDÉRGICOS EN TÁLAMO DE RATONES MACHOS $EaAT3^{+/-}$ Y $EaAT3^{+/+}$.

Respecto al contenido de DA y DOPAC, se puede observar que no existe diferencia significativa entre el ratón $Eaat3^{+/-}$ ($183,1 \pm 22,16$ pg/mg de tejido y $72,17 \pm 11,65$ pg/mg de tejido, respectivamente) versus el $Eaat3^{+/+}$ ($227,9 \pm 27,16$ pg/mg de tejido y $55,33 \pm 9,42$ pg/mg de tejido) (Figura 13, Panel A y B). Respecto al contenido de 5-HT y 5-HIAA, tampoco existe diferencia significativas entre el ratón $Eaat3^{+/-}$ ($618,5 \pm 113,4$ pg/mg de tejido y $1821 \pm 210,3$ pg/mg tejido, respectivamente) versus el grupo control $Eaat3^{+/+}$ ($720,9 \pm 64,5$ pg/mg de tejido y $2078 \pm 117,8$ pg/mg de tejido, respectivamente)(Figura 13, Panel C y D). En cuanto a los neurotransmisores aminoacídicos, el contenido de Glu en el ratón $Eaat3^{+/-}$ (86641 ± 6167 pg/mg de tejido) no presenta cambios significativos respecto al ratón $Eaat3^{+/+}$ (94148 ± 10654 pg/mg de tejido)(Figura13, Panel E), así como tampoco existen cambios significativos con respecto a GABA en el ratón $Eaat3^{+/-}$ ($138,5 \pm 33,15$ pg/mg de tejido) versus el $Eaat3^{+/+}$ ($172,8 \pm 21,61$ pg/mg de tejido)(Figura 13, Panel F).

Figura 13:



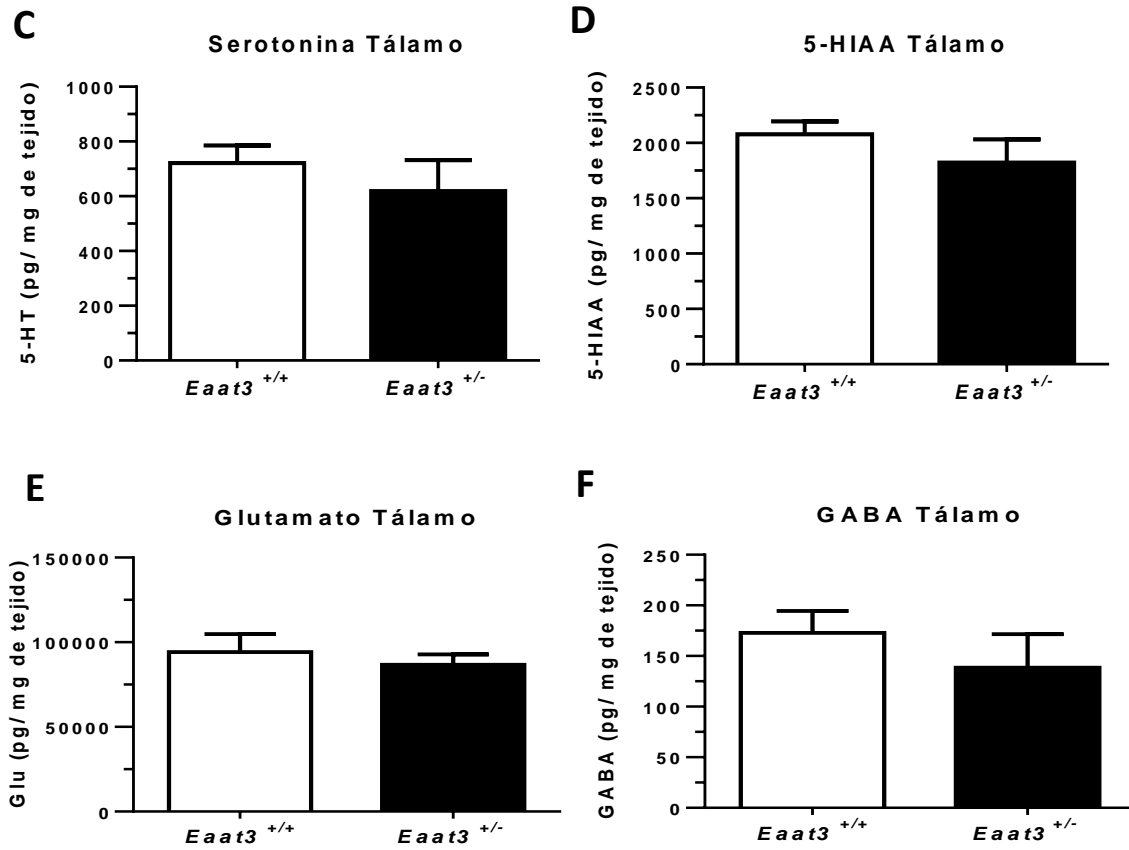


Figura 13. Contenido total de neurotransmisores en Tálamo, area perteneciente al circuito CETC en ratones macho *Eaat3*^{+/-} y *Eaat3*^{+/+}. Contenido Dopamina (A), Dopac (B) Serotonina (C), 5-HIAA (D), Glutamato (E) y GABA (F). Los resultados fueron expresados como pg/mg de tejido que representan la media \pm SEM (Dopamina y Dopac n=7 *Eaat3*^{+/-} y n=7 *Eaat3*^{+/+}; 5-HT n=6 *Eaat3*^{+/-} y n=7 *Eaat3*^{+/+}; 5-HIAA n=5 *Eaat3*^{+/-} y n=7 *Eaat3*^{+/+}; Glutamato n=7 por grupo; GABA n=5 *Eaat3*^{+/-} y n=7 *Eaat3*^{+/+}).

9) **EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO EN RATONES HEMBRAS MEDIANTE LA PRUEBA DE EXPLORACIÓN DE CAMPO ABIERTO.**

Respecto a esta prueba conductual, las hembras $Eaat3^{+/-}$ pasaron significativamente más tiempo en la periferia en comparación con las hembras $Eaat3^{+/+}$ ($276,5 \pm 5,1$ s versus $253,4 \pm 6,7$ s, respectivamente)(Figura 14, Panel A). Respecto al tiempo de permanencia en el centro de la caja se puede observar que las hembras $Eaat3^{+/-}$ pasan significativamente menos tiempo en el centro en comparación a las hembras $Eaat3^{+/+}$ ($23,54 \pm 5,10$ s versus $46,61 \pm 6,68$ s)(Figura 14, Panel B). Por último, también se observa que las hembras $Eaat3^{+/-}$ ingresan menos veces al centro de la caja en comparación a las hembras $Eaat3^{+/+}$ ($12,60 \pm 2,27$ entradas versus $22,90 \pm 3,41$ entradas, respectivamente)(Figura 14, Panel C).

Figura 14:

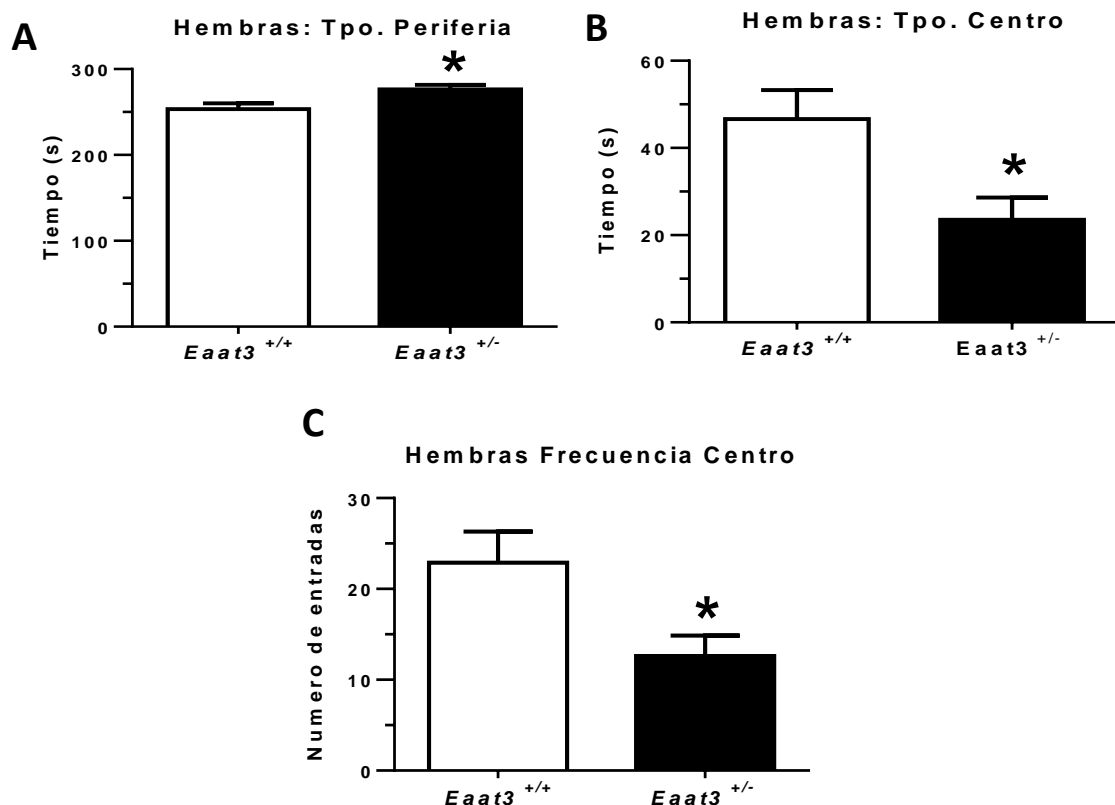


Figura 14. Resultados de la prueba de exploración de campo abierto en los ratones hembra $Eaat3^{+/-}$ y $Eaat3^{+/+}$, en donde se puede observar el tiempo de permanencia en la periferia (A), centro (B) y la frecuencia en número de veces en la que el animal entra al centro de la caja (C). Los resultados fueron expresados en segundos y número de entradas al centro de la caja que representan la media \pm SEM (n= 10 por grupo). * $P < 0.05$ comparados con el grupo control.

10) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO EN RATONES HEMBRAS MEDIANTE LA PRUEBA DE LABERINTO ELEVADO EN CRUZ.

En esta prueba las hembras *Eaat3*^{-/-} no mostraron diferencias significativas con respecto a las *Eaat3*^{+/+} en la permanencia en los brazos abiertos (186,4 ± 29,8 s versus 136,5 ± 26,9 s, respectivamente)(Figura 15, Panel A), tampoco en los brazos cerrados (96,7 ± 26,0 s versus 127,2 ± 22,6 s)(Figura 15, Panel B) y por último tampoco en la permanencia en el centro del laberinto (27,81 ± 6,05 s versus 26,99 ± 4,08 s)(Figura 15, Panel C).

Figura 15:

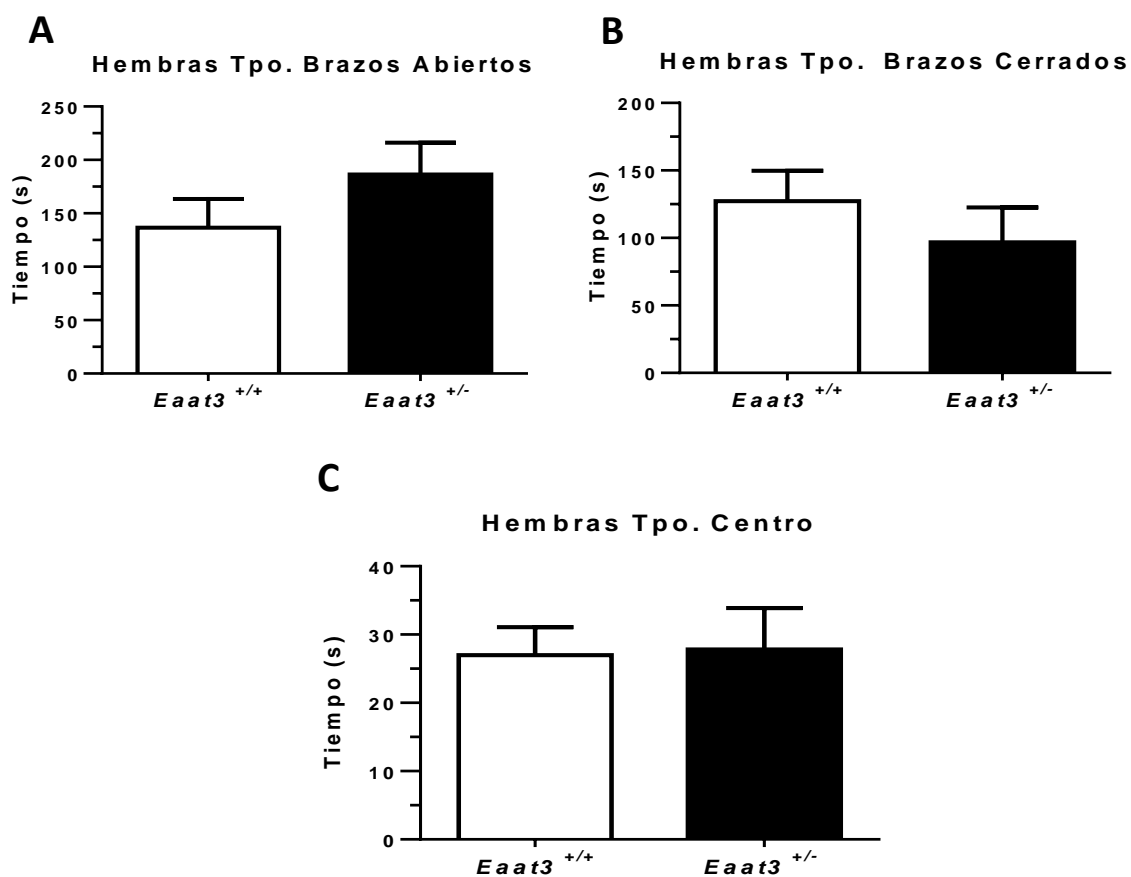


Figura 15. Resultados de la prueba laberinto elevado en cruz en los ratones *Eaat3*^{-/-} y *Eaat3*^{+/+}, en donde se puede observar el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (A), brazos cerrados (B) y centro del laberinto (C). Los resultados fueron expresados en segundos que representan la media ±SEM (n=8 *Eaat3*^{+/+} y n=10 *Eaat3*^{-/-}).

11) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO-COMPULSIVO EN RATONES HEMBRAS MEDIANTE LA PRUEBA DE ENTERRADO DE CANICAS (MARBLE BURYING).

En esta prueba las hembras $Eaat3^{+/-}$ no mostraron diferencias significativas con respecto a las hembras $Eaat3^{+/+}$ en el número de canicas enterradas ($7,7 \pm 0,8$ canicas versus $6,4 \pm 1,4$ canicas, respectivamente) después de 30 minutos (Figura 16). Solo es posible observar una leve tendencia por parte de las hembras $Eaat3^{+/-}$ a enterrar más canicas que las hembras $Eaat3^{+/+}$.

Figura 16:

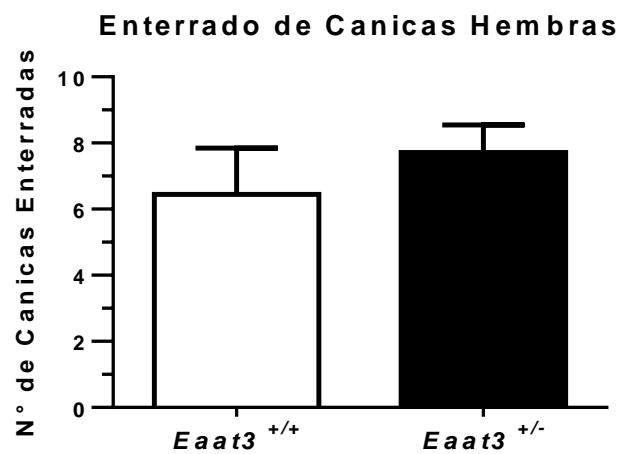


Figura 16. Resultados de la prueba de enterrado de canicas en ratones hembra $Eaat3^{+/-}$ y $Eaat3^{+/+}$, donde se puede observar el número de canicas enterradas dentro de los 30 min de prueba. Los resultados fueron expresados en número de canicas enterradas que representan la media \pm SEM ($n=9$ $Eaat3^{+/+}$ y $n=14$ $Eaat3^{+/-}$).

12) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN RATONES HEMBRAS $EAAT3^{+/-}$ Y $EAAT3^{+/+}$.

Se observó que la actividad locomotora basal e inducida por anfetamina no presenta diferencias estadísticamente significativas en el curso temporal (Figura 17, panel A) y en la actividad locomotora acumulativa (Figura 17, panel B) entre los grupos de ratones hembras $Eaat3^{+/-}$ y $Eaat3^{+/+}$.

Figura 17:

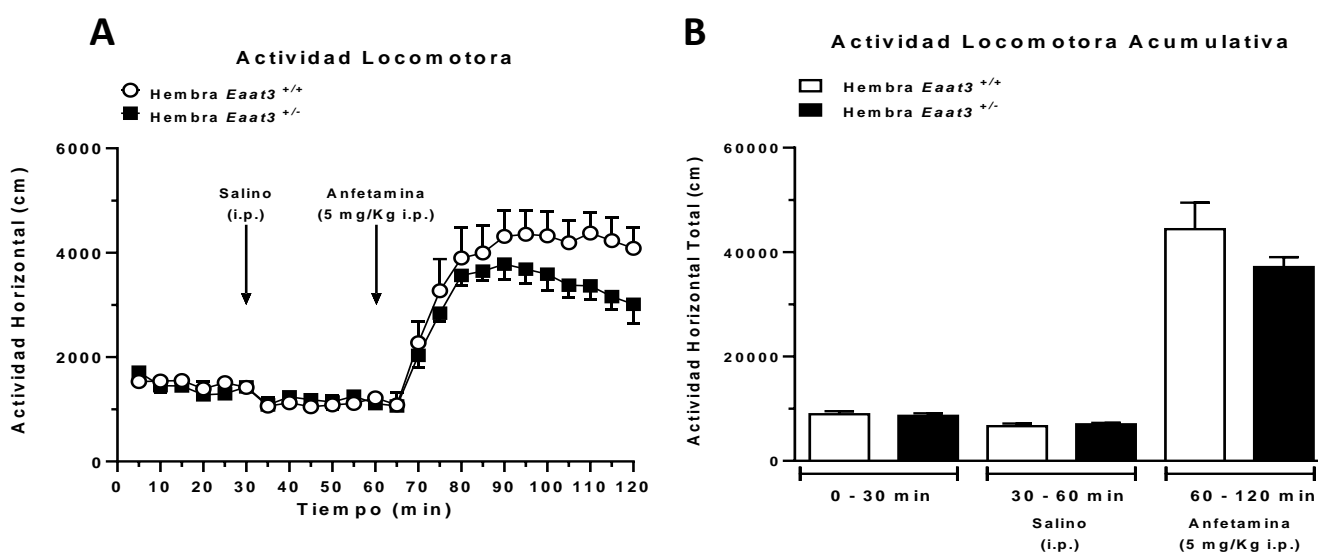


Figura 17. Efecto del genotipo sobre la actividad locomotora inducida por la administración de anfetamina (5 mg/Kg i.p.) en ratones hembra $Eaat3^{+/-}$ y $Eaat3^{+/+}$. Actividad locomotora basal e inducida por anfetamina (A) y Actividad Locomotora Acumulativa (B). Resultados expresados como media \pm SEM (n=4 hembras $Eaat3^{+/-}$ y n=4 hembras $Eaat3^{+/+}$).

13) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO EN RATONES EAAT3^{+/-} Y EAAT3^{+/+} MEDIANTE LA PRUEBA DE EXPLORACIÓN DE CAMPO ABIERTO.

Respecto a esta prueba conductual, podemos observar que las hembras *Eaat3^{+/-}* no presentan diferencia significativa con respecto a los machos *Eaat3^{+/-}* en el tiempo que pasan en el centro de la caja ($23,54 \pm 5,099$ s versus $23,64 \pm 2,717$ s)(Figura 18, panel B), tampoco en la periferia de la caja ($276,5 \pm 5,116$ s versus $276,4 \pm 2,717$ s)(Figura 18, panel D) ni las veces que ingresan al centro de la caja ($12,60 \pm 2,267$ s versus $12,71 \pm 1,435$ s respectivamente)(Figura 18, panel F). Por el otro lado y por el contrario, podemos observar que las hembras *Eaat3^{+/+}* pasaron significativamente más tiempo en el centro de la caja en comparación con los machos *Eaat3^{+/+}* ($46,61 \pm 6,684$ s versus $26,33 \pm 3,295$ s, respectivamente)(Figura 18, Panel A). Respecto al tiempo de permanencia en la periferia de la caja se puede observar que las hembras *Eaat3^{+/+}* pasan significativamente menos tiempo en la periferia en comparación con los machos *Eaat3^{+/+}* ($253,4 \pm 6,684$ s versus $273,7 \pm 3,295$ s)(Figura 18, Panel B). Por último, podemos observar que no hay diferencia significativa entre las hembras *Eaat3^{+/+}* y machos *Eaat3^{+/+}* con respecto al número de veces que ingresan al centro de la caja ($22,90 \pm 3,14$ entradas versus $18,67 \pm 30,51$ entradas, respectivamente)(Figura 18, Panel E), sin embargo se puede apreciar una mayor tendencia de las hembras *Eaat3^{+/+}* a entrar en el centro que se correlaciona con el mayor tiempo que estas pasan en el centro de la caja.

Figura 18:

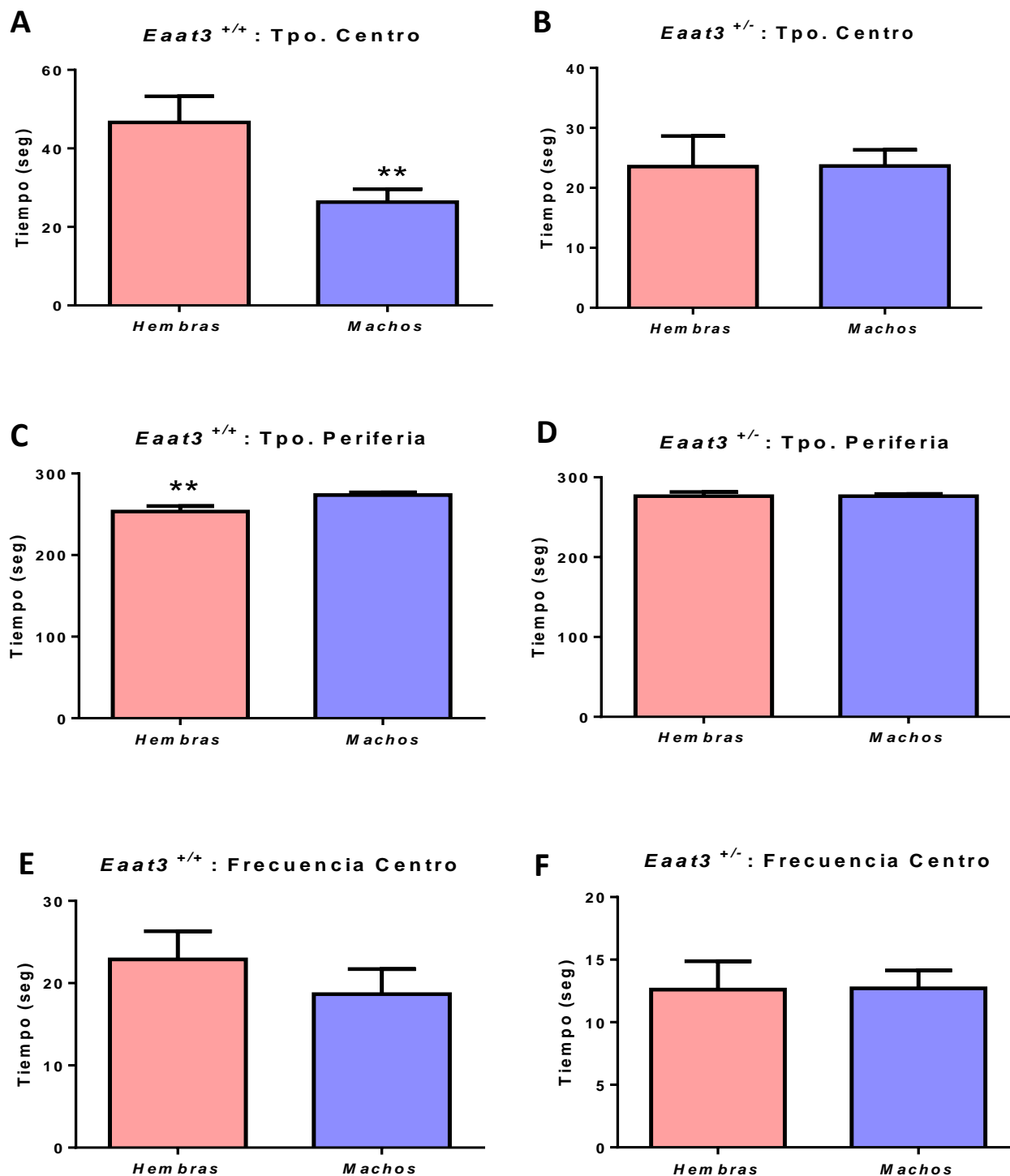


Figura 18. Resultados de la prueba de exploración de campo abierto, donde se puede observar el tiempo de permanencia en el centro (A y B), en la periferia (C y D) y la frecuencia en número de veces en la que el animal entraba al centro de la caja (E y F) en ratones *Eaat3*^{+/+} y *Eaat3*^{+/-} respectivamente. Los resultados fueron expresados en seg. y número de entradas al centro de la caja que representan la media \pm SEM (Hembras n =10 y Machos n =12-14).

14) EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO EN RATONES EAAT3^{+/-} Y EAAT3^{+/+} MEDIANTE LA PRUEBA DE LABERINTO ELEVADO EN CRUZ.

En esta prueba las hembras *Eaat3*^{+/+} no mostraron diferencias significativas con respecto a los machos *Eaat3*^{+/+} en la permanencia en los brazos abiertos (136,5 ± 26,88 s versus 121,0 ± 15,74 s, respectivamente)(Figura 19, Panel A), tampoco en los brazos cerrados (127,2 ± 22,63 s versus 126,1 ± 13,44 s)(Figura 19, Panel C) o en la permanencia en el centro del laberinto (26,99 ± 4,08 s versus 39,74 ± 6,97 s)(Figura 19, Panel E). Con respecto a las hembras *Eaat3*^{+/-} estas tampoco presentaron diferencias significativas con respecto a los machos *Eaat3*^{+/-} en la permanencia en los brazos abiertos (186,4 ± 29,8 s versus 113,4 ± 23,45 s, respectivamente)(Figura 19, Panel B), tampoco en los brazos cerrados (96,7 ± 26,0 s versus 145,8 ± 25,12 s)(Figura 19, Panel D) o en la permanencia en el centro del laberinto (27,81 ± 6,05 s versus 34,13 ± 3,72 s)(Figura 19, Panel F)

Figura 19:

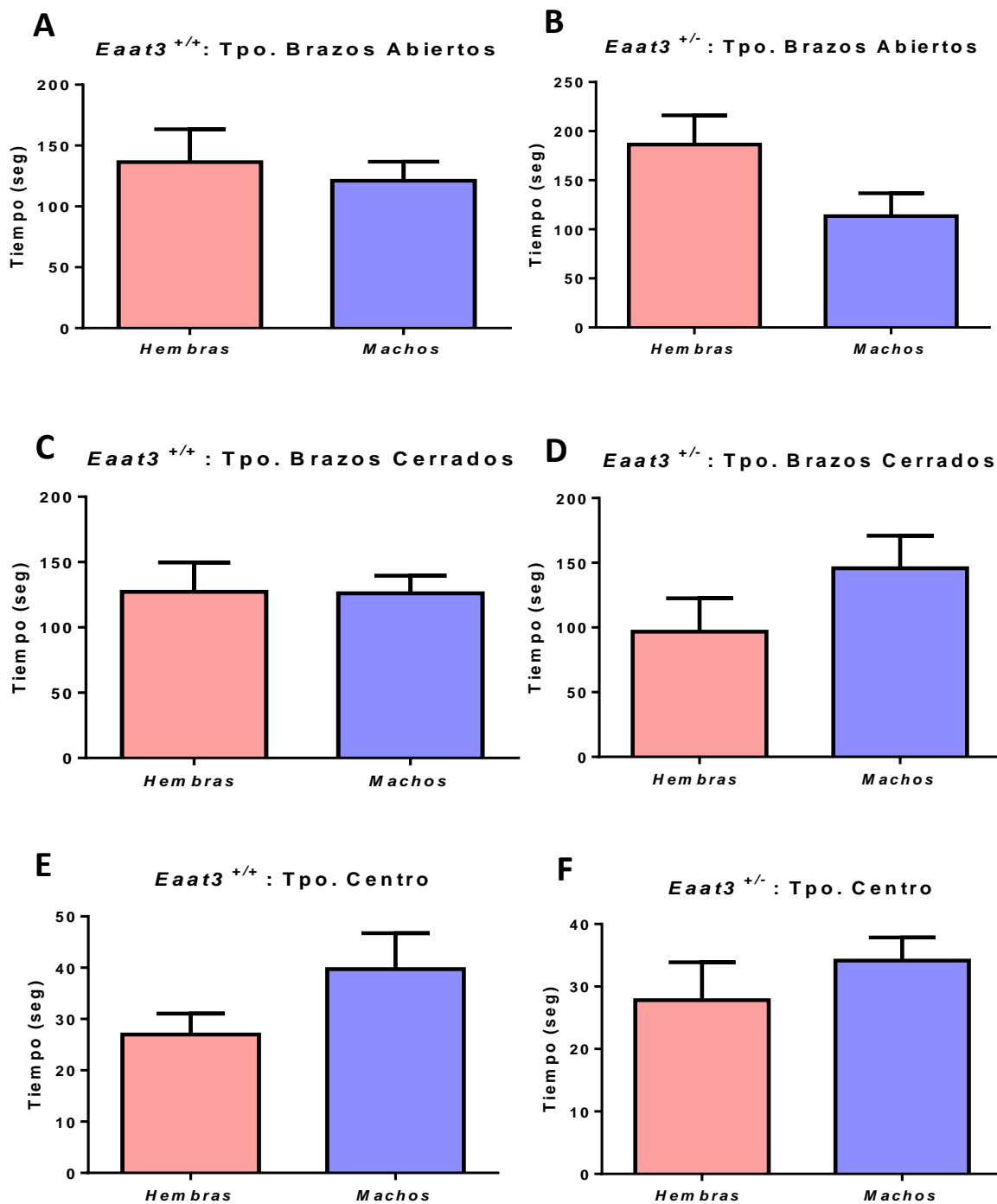


Figura 19. Resultados de la prueba laberinto elevado en cruz, donde se puede observar el tiempo de permanencia en los brazos abiertos (A y B), brazos cerrados (C y D) y centro del laberinto (E y F) en ratones *Eaat3*^{+/+} y *Eaat3*^{+/-} respectivamente. Los resultados fueron expresados en segundos que representan la media \pm SEM (Hembras *Eaat3*^{+/+} n=8, Hembras *Eaat3*^{+/-} n=10, Machos *Eaat3*^{+/+} n=12, Macho *Eaat3*^{+/-} n=10).

15) **EVALUACIÓN DEL FENOTIPO CONDUCTUAL ANSIOSO-COMPULSIVO EN RATONES EAAT3^{+/-} Y EAAT3^{+/+} MEDIANTE LA PRUEBA DE ENTERRADO DE CANICAS.**

En esta prueba las hembras *Eaat3*^{+/-} no mostraron diferencias significativas con respecto a los machos *Eaat3*^{+/-} en el número de canicas enterradas (6,444 ± 1,405 canicas versus 6,700 ± 0,731 canicas, respectivamente) después de 30 minutos (Figura 20; Panel A). Por otra parte, las hembras *Eaat3*^{+/-} tampoco muestran diferencias significativas con respecto a los machos *Eaat3*^{+/-} en el número de canicas enterradas (7,714 ± 0,8349 canicas versus 7,400 ± 1,127 canicas, respectivamente) (Figura 20; panel B).

Figura 20:

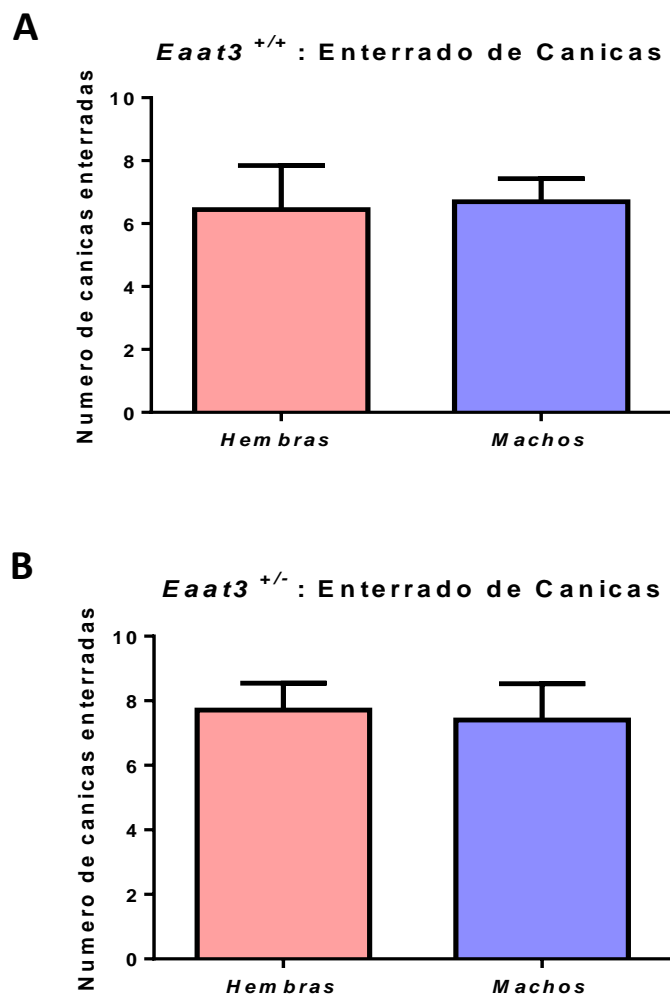


Figura 20. Resultados de la prueba de enterrado de canicas, donde se puede observar el número de canicas enterradas dentro de los 30 min de prueba en los ratones *Eaat3*^{+/+} (A) y *Eaat3*^{+/-} (B). Los resultados fueron expresados en número de canicas enterradas que representan la media ±SEM (Hembras *Eaat3*^{+/-} n=9, Hembras *Eaat3*^{+/+} n=14, Machos *Eaat3*^{+/-} n=10, Macho *Eaat3*^{+/+} n=11).

16) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA EN RATONES EAAT3^{+/-} Y EAAT3^{+/+}.

Se observó que la actividad locomotora basal o después de la inyección de salino no presenta cambios significativos entre las hembras *Eaat3^{+/-}* y machos *Eaat3^{+/-}* (8940,33 ± 583,28 cm y 6648,02 ± 508,65 cm versus 5168,36 ± 663,34 cm y 2704,90 ± 280,48 cm respectivamente). Sin embargo la actividad locomotora inducida por anfetamina en hembras *Eaat3^{+/-}* y machos *Eaat3^{+/+}* muestra diferencias estadísticamente significativas (44387,52 ± 5087,53 cm versus 23417,95 ± 4720,47 cm) tanto en el curso temporal (Figura 21, panel A) como en la actividad locomotora acumulativa (Figura 21, panel B). Por otro lado, las hembras *Eaat3^{+/-}* no mostraron diferencias significativas con respecto a los machos *Eaat3^{+/-}* en la actividad locomotora basal o después de la inyección de salino (8612,58 ± 502,71 cm y 6999,98 ± 290,05 cm versus 4355,14 ± 678,20 y 1766,79 ± 374,57 cm respectivamente), ni tampoco en la actividad locomotora inducida por anfetamina (37117,84 ± 1903,40 cm versus 29574,09 ± 6885,43 cm respectivamente)(Figura 21, Panel C y D). Por último, es posible observar que tanto en los ratones *Eaat3^{+/-}* como en los *Eaat3^{+/+}* las hembras presentan una mayor actividad locomotora en comparación a los machos, ya sea basalmente, después de la inyección de salino o de la inyección de anfetamina.

Figura 21:

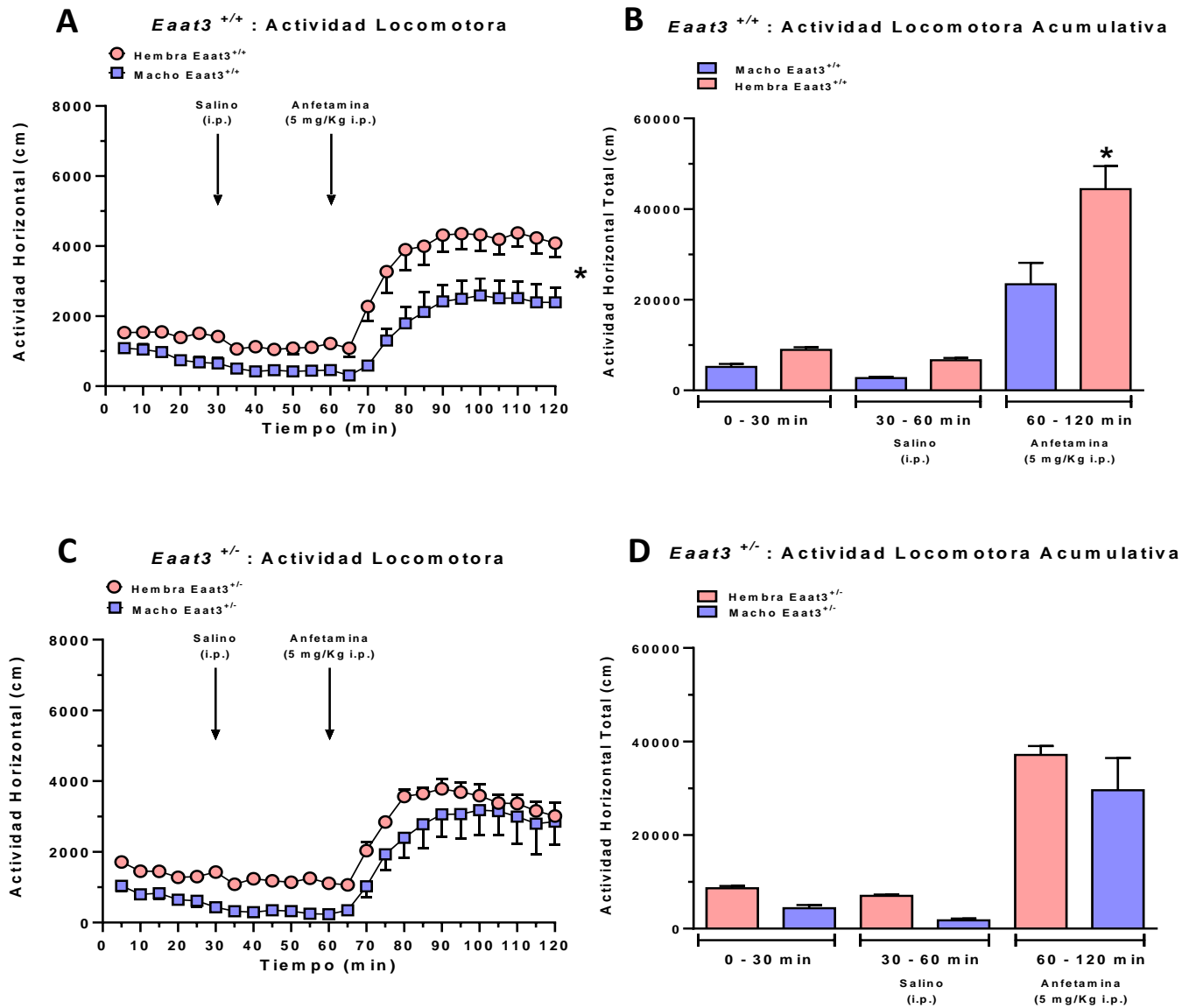


Figura 21. Efecto del género sobre la actividad locomotora inducida por la administración de amfetamina (5 mg/Kg i.p.) en ratones *Eaat3*^{+/+} y *Eaat3*^{+/-}. Actividad locomotora basal e inducida por amfetamina (A y C) y Actividad Locomotora Acumulativa (B y D). Resultados expresados en cm que representan la media \pm SEM (Hembras *Eaat3*^{+/+} n=4, Hembras *Eaat3*^{+/-} n=4, Machos *Eaat3*^{+/+} n=5 y Machos *Eaat3*^{+/-} n=5).

DISCUSIÓN.

Los resultados obtenidos en esta tesis muestran la influencia del genotipo heterocigoto para EAAT3 en ratones machos y hembras sobre la conducta tipo ansiosa, evaluada a través de tres diferentes paradigmas conductuales: Test de Campo Abierto (*Open Field*), Laberinto elevado en Cruz (*Elevated Plus Maze*) y Enterrado de canicas (*Marble Burying*) y sobre la regulación neuroquímica en las áreas cerebrales implicadas en TOC como lo es Corteza Prefrontal, Cuerpo Estriado y Tálamo.

Según los resultados obtenidos se puede señalar que en los ratones machos no se cumple la hipótesis planteada, mientras que en el caso de las hembras se cumple parcialmente. Esto se debe a que los ratones machos *Eaat3^{+/-}* no muestran un fenotipo ansioso en relación a su contraparte, lo que se correlaciona con los resultados del contenido de neurotransmisores en los cuales tampoco se presentaron cambios significativos. Sin embargo, las hembras *Eaat3^{+/-}* muestran ser significativamente más ansiosas que sus respectivos controles *Eaat3^{+/+}* en una de las pruebas conductuales realizadas. Estos resultados dan cuenta que la menor expresión de EAAT3 en los ratones heterocigotos machos puede ser revertido a través de algún mecanismo fisiológico compensatorio, mientras que en las hembras al parecer ese mecanismo podría estar disminuido.

1) EFECTO DE LA HETEROCIGOSIS DE EAAT3 EN RATONES MACHOS SOBRE LA REGULACIÓN NEUROQUÍMICA EN EL CIRCUITO CSTC Y SOBRE LA PRESENCIA DE UN FENOTIPO ANSIOSO.

A nivel del contenido de neurotransmisores en las áreas del circuito CSTC, no se encontraron cambios significativos en el contenido de neurotransmisores monoaminérgicos o aminoacidérgicos. En cuanto a las pruebas conductuales realizadas en este trabajo ninguna de los tres paradigmas conductuales, enfocados a determinar un fenotipo ansioso, mostraron cambios significativos entre los ratones *Eaat3^{+/-}* y *Eaat^{+/+}*, lo cual

es correlacionado con la ausencia de cambios observados en los resultados de contenido total de neurotransmisores. La razón de que no se hayan observado cambios en los experimentos realizados puede deberse a un mecanismo fisiológico compensatorio; en ocasiones animales que son *KO* para un gen constitutivo determinado desarrollan mecanismos compensatorios que evitan observar los posibles cambios y consecuencias que produciría el bloqueo de la expresión del gen de interés [43]. Así también, es posible observar que en ratones *KO* para el transportador de EAAT3 en los que se evaluaba problemas de memoria y aprendizaje (hipocampo), se demostró que existe un aumento considerable del transportador EAAT2 en la glía (transportador de glutamato que se encuentra principalmente en glía), el cual normalmente transporta alrededor del 90% del glutamato que se encuentra en el espacio sináptico [43, 44], es así como una disminución en la cantidad de EAAT3 en las membranas post-sinápticas neuronales puede ser tamponado con un aumento en la cantidad de EAAT2, evitando de esta forma el aumento de glutamato en el espacio sináptico y la desregulación de otros circuitos como el dopaminérgico o serotoninérgico.

2) EFECTO DE LA HETEROCIGOSIS DE EAAT3 EN RATONES HEMBRA SOBRE LA PRESENCIA DE UN POSIBLE FENOTIPO ANSIOSO.

A nivel de las pruebas conductuales en hembras se puede observar que no hubieron cambios significativos en la prueba de laberinto elevado en cruz, enterrado de canicas o actividad locomotora, sin embargo en la prueba de exploración de campo abierto podemos observar que las hembras *Eaat3*^{+/-} muestran ser significativamente más ansiosas que sus controles, debido a que pasan un menor tiempo en el centro de la caja y entran una menor cantidad de veces al cuadrante interno. Es difícil precisar la razón exacta de por qué podría ocurrir esto, por una parte es sabido que los estrógenos disminuyen la actividad de transportador EAAT3 [45] y por otro lado, se ha visto que al momento de evaluar ratones hembra en pruebas de ansiedad como la exploración de campo abierto, aquellas que se

encuentran en proestro presentan un comportamiento tipo ansiolítico, producto de los mayores niveles plasmáticos de progesterona [46]. De esta manera es posible pensar que debido a que no se realizó un frotis vaginal previo a cada prueba, y así determinar el ciclo estral, gran parte de las hembras *Eaat3^{+/+}* podrían haber estado en proestro (altos niveles de progesterona) y gran parte de las hembras *Eaat3^{+/-}* podrían haber estado en estro (altos niveles de estrógenos), acentuando el cambio conductual; lo que podría explicar por qué en las otras dos pruebas (enterrado de canicas y laberinto elevado en cruz) no se encontraron diferencias entre ambos grupos. Por otro lado sería posible pensar que los estrógenos, en particular el estradiol, sea capaz de disminuir la actividad del EAAT2 o pueda regular a la baja la expresión de este en membrana a través de alguna proteína en particular o través de una regulación transcripcional o post-transcripcional a modo de evitar el mecanismo compensatorio anteriormente mencionado para el caso de los machos; sin embargo hasta la fecha solo se sabe que el estradiol no disminuye la actividad del EAAT2 [47] y que los factores involucrados en su regulación a la baja son: citoquinas proinflamatorias, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), n-Myc, NF- $\kappa\beta$, entre otros, pero sin estar dentro de ellos el estradiol [44], más aún, estudios recientes han demostrado que los receptores de estrógenos ubicados en células gliales son capaces de incrementar la expresión del EAAT2 en sus membranas y aumentar la actividad de este [48, 49].

3) COMPARACIÓN POR SEXO EN LOS PARADIGMAS CONDUCTUALES EN RATONES EAAT3 SILVESTRES Y HETEROCIGOTOS.

A nivel de las pruebas conductuales podemos observar que al comparar machos *Eaat3^{+/-}* versus hembras *Eaat3^{+/-}* no existen cambios significativos entre ellos, en ninguno de los paradigmas conductuales. Con respecto a los ratones *Eaat3^{+/+}* podemos observar que en la prueba de exploración de campo abierto los machos presentan una menor cantidad de tiempo en el centro de la caja en comparación a las hembras, siendo significativa esta diferencia. Estos resultados van de la mano con diversos estudios en roedores que

muestran diferencias de género con respecto a la neurobiología de la ansiedad, mostrando que las hormonas sexuales femeninas, tanto estradiol como progesterona ejercen efectos tipo ansiolíticos y antidepresivos en roedores sometidos a paradigmas conductuales de ansiedad y depresión [50][51], sin embargo este efecto no es observado entre los machos y hembras *Eaat3^{+/-}*, lo que estaría reforzando el fenotipo ansioso encontrado en las hembras *Eaat3^{+/-}*. En la prueba de laberinto elevado en cruz no se aprecian diferencias significativas entre hembras y machos silvestres o heterocigotos, más solo una tendencia de las hembras de ambos genotipos a explorar durante más tiempo los brazos abiertos en comparación a los machos. En la prueba de enterrado de canicas no hay diferencias entre machos y hembras de ambos genotipos. Por último, al observar la actividad locomotora de los ratones *Eaat3^{+/+}* podemos observar que las hembras presentan significativamente una mayor actividad locomotora en comparación a los machos después de la administración de amfetamina. Por otro lado, en los animales heterocigotos también se aprecia una mayor actividad locomotora de las hembras por sobre los machos después de la administración de amfetamina, sin embargo la diferencia observada no es significativa. Estos hallazgos ratifican las observaciones publicadas en la literatura que demuestran que los estrógenos de la hembra favorecen la liberación de DA inducida por amfetamina a nivel estriatal [52], lo cual conlleva a una mayor actividad locomotora.

Aun después de lo visto y discutido, queda claro que es necesario realizar el análisis neuroquímico en hembras para evaluar el contenido de los diferentes neurotransmisores en las áreas del circuito CSTC y así poder buscar una respuesta más certera al posible cambio fenotípico encontrado en las hembras *Eaat3*.

CONCLUSIONES.

1. Los ratones machos $Eaat3^{+/-}$ no presentan un fenotipo ansioso el cual se evaluó a través de tres paradigmas conductuales: exploración de campo abierto, laberinto en cruz elevado y enterrado de canicas; así como tampoco presentan cambios en la actividad locomotora en comparación los ratones macho $Eaat3^{+/+}$.
2. Los ratones machos $Eaat3^{+/-}$ no presentan cambios en el contenido total de neurotransmisores monoaminérgicos y aminoácidos de las áreas correspondientes al circuito CSTC (Corteza Prefrontal, Estriado y Tálamo) en comparación a los ratones macho $Eaat3^{+/+}$.
3. Las hembras $Eaat3^{+/-}$ presentan un fenotipo ansioso en la prueba conductual de exploración de campo abierto en comparación a las hembras $Eaat3^{+/+}$, pero no así en la prueba de enterrado de canicas y laberinto elevado en cruz; tampoco se presentan cambios en la actividad locomotora.
4. Las hembras $Eaat3^{+/-}$ muestran una conducta tipo ansiolítica en las prueba de exploración de abierto y una mayor actividad locomotora después de la administración de anfetamina en comparación a los machos $Eaat3^{+/+}$.
5. Las hembras $Eaat3^{+/-}$ no presentan diferencias conductuales con respecto a los machos $Eaat3^{+/-}$ en los paradigmas conductuales realizados en esta tesis.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Sasson, Y., et al., Epidemiology of obsessive-compulsive disorder: a world view. *J Clin Psychiatry*, 1997. 58 Suppl 12: p. 7-10.
2. Inouye, E., Similar and Dissimilar Manifestations of Obsessive-Compulsive Neuroses in Monozygotic Twins. *Am J Psychiatry*, 1965. 121: p. 1171-5.
3. Grados, M.A., J. Walkup, and S. Walford, Genetics of obsessive-compulsive disorders: new findings and challenges. *Brain Dev*, 2003. 25(1): p. S55-61.
4. Kaplan, A. and E. Hollander, A review of pharmacologic treatments for obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Serv*, 2003. 54(8): p. 1111-8.
5. Jenike, M.A., Clinical practice. Obsessive-compulsive disorder. *N Engl J Med*, 2004. 350(3): p. 259-65.
6. Steketee, G. and R. Frost, Compulsive hoarding: current status of the research. *Clin Psychol Rev*, 2003. 23(7): p. 905-27.
7. Zohar, J., R.C. Zohar-Kadouch, and S. Kindler, Current concepts in the pharmacological treatment of obsessive-compulsive disorder. *Drugs*, 1992. 43(2): p. 210-8.
8. Sasson, Y. and J. Zohar, New developments in obsessive-compulsive disorder research: implications for clinical management. *Int Clin Psychopharmacol*, 1996. 5: p. 3-12.
9. Pitman, R.K., A cybernetic model of obsessive-compulsive psychopathology. *Compr Psychiatry*, 1987. 28(4): p. 334-43.
10. Arnold, P.D., et al., Association of a glutamate (NMDA) subunit receptor gene (GRIN2B) with obsessive-compulsive disorder: a preliminary study. *Psychopharmacology*, 2004. 174(4): p. 530-8.
11. Chakrabarty, K., et al., Glutamatergic dysfunction in OCD. *Neuropsychopharmacology*, 2005. 30(9): p. 1735-40.
12. Starck, G., et al., A 1H magnetic resonance spectroscopy study in adults with obsessive compulsive disorder: relationship between metabolite concentrations and symptom severity. *J Neural Transm*, 2008. 115(7): p. 1051-62.
13. Wilhelm, S., et al., Augmentation of behavior therapy with D-cycloserine for obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry*, 2008. 165(3): p. 335-41.
14. Aboujaoude, E., J.J. Barry, and N. Gamel, Memantine augmentation in treatment-resistant obsessive-compulsive disorder: an open-label trial. *J Clin Psychopharmacol*, 2009. 29(1): p. 51-5.
15. Penney, J.B., Jr. and A.B. Young, Speculations on the functional anatomy of basal ganglia disorders. *Annu Rev Neurosci*, 1983. 6: p. 73-94.
16. Gerfen, C.R., CHAPTER 18 - Basal Ganglia A2 - Paxinos, George, in *The Rat Nervous System (THIRD EDITION)* 2004, Academic Press: Burlington. p. 455-508.
17. Ting, J.T. and G. Feng, Glutamatergic Synaptic Dysfunction and Obsessive-Compulsive Disorder. *Curr Chem Genomics*, 2008. 2: p. 62-75.
18. Graybiel, A.M., The basal ganglia and chunking of action repertoires. *Neurobiol Learn Mem*, 1998. 70(1-2): p. 119-36.

19. Rosenberg, D.R. and M.S. Keshavan, A.E. Bennett Research Award. Toward a neurodevelopmental model of obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry*, 1998. 43(9): p. 623-40.
20. Saxena, S. and S.L. Rauch, Functional neuroimaging and the neuroanatomy of obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Clin North Am*, 2000. 23(3): p. 563-86.
21. Baxter, L.R., Jr., et al., Local cerebral glucose metabolic rates in obsessive-compulsive disorder. A comparison with rates in unipolar depression and in normal controls. *Arch Gen Psychiatry*, 1987. 44(3): p. 211-8.
22. McGuire, P.K., et al., Functional anatomy of obsessive-compulsive phenomena. *Br J Psychiatry*, 1994. 164(4): p. 459-68.
23. Benkelfat, C., et al., Local cerebral glucose metabolic rates in obsessive-compulsive disorder. Patients treated with clomipramine. *Arch Gen Psychiatry*, 1990. 47(9): p. 840-8.
24. Saxena, S., et al., Localized orbitofrontal and subcortical metabolic changes and predictors of response to paroxetine treatment in obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychopharmacology*, 1999. 21(6): p. 683-93.
25. Baxter, L.R., Jr., et al., Caudate glucose metabolic rate changes with both drug and behavior therapy for obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 1992. 49(9): p. 681-9.
26. Mindus, P. and H. Nyman, Normalization of personality characteristics in patients with incapacitating anxiety disorders after capsulotomy. *Acta Psychiatr Scand*, 1991. 83(4): p. 283-91.
27. Welch, J.M., et al., Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature*, 2007. 448(7156): p. 894-900.
28. Shmelkov, S.V., et al., Slitrk5 deficiency impairs corticostriatal circuitry and leads to obsessive-compulsive-like behaviors in mice. *Nat Med*, 2010. 16(5): p. 598-602.
29. Davenport, H.W., Early history of the concept of chemical transmission of the nerve impulse. *Physiologist*, 1991. 34(4): p. 178-90.
30. Danbolt, N.C., Glutamate uptake. *Prog Neurobiol*, 2001. 65(1): p. 1-105.
31. Murphy, D.L., et al., Anxiety and affective disorder comorbidity related to serotonin and other neurotransmitter systems: obsessive-compulsive disorder as an example of overlapping clinical and genetic heterogeneity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013. 368(1615).
32. Stewart, S.E., et al., Meta-analysis of association between obsessive-compulsive disorder and the 3' region of neuronal glutamate transporter gene SLC1A1. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2013. 4: p. 367-79.
33. Arnold, P.D., et al., Glutamate transporter gene SLC1A1 associated with obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 2006. 63(7): p. 769-76.
34. Dickel, D.E., et al., Association testing of the positional and functional candidate gene SLC1A1/EAAC1 in early-onset obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 2006. 63(7): p. 778-85.
35. Stewart, S.E., et al., Association of the SLC1A1 glutamate transporter gene and obsessive-compulsive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2007. 5(8): p. 1027-33.

36. Wendland, J.R., et al., A haplotype containing quantitative trait loci for SLC1A1 gene expression and its association with obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 2009. 66(4): p. 408-16.
37. Abarca, J. and G. Bustos, Differential regulation of glutamate, aspartate and gamma-amino-butyrate release by N-methyl-D-aspartate receptors in rat striatum after partial and extensive lesions to the nigro-striatal dopamine pathway. *Neurochem Int*, 1999. 35(1): p. 19-33.
38. Cruz, G., et al., Neonatal exposure to estradiol valerate increases dopamine content in nigrostriatal pathway during adulthood in the rat. *Horm Metab Res*, 2014. 46(5): p. 322-7.
39. de Freitas Silva, D.M., V.P. Ferraz, and A.M. Ribeiro, Improved high-performance liquid chromatographic method for GABA and glutamate determination in regions of the rodent brain. *J Neurosci Methods*, 2009. 177(2): p. 289-93.
40. Moussawi, K., et al., Extracellular glutamate: functional compartments operate in different concentration ranges. *Front Syst Neurosci*, 2011. 5(94).
41. Hölter, S.M., et al., Tests for Anxiety-Related Behavior in Mice, in *Current Protocols in Mouse Biology* 2011, John Wiley & Sons, Inc.
42. Inoue, I., et al., Impaired locomotor activity and exploratory behavior in mice lacking histamine H1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(23): p. 13316-20.
43. Wang, Z., et al., A critical role of glutamate transporter type 3 in the learning and memory of mice. *Neurobiol Learn Mem*, 2014. 114: p. 70-80.
44. Grewer, C., A. Gameiro, and T. Rauen, SLC1 glutamate transporters. *Pflugers Arch*, 2014. 466(1): p. 3-24.
45. Na, H.S., et al., 17beta-Estradiol attenuates the activity of the glutamate transporter type 3 expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol*, 2012. 676(1-3): p. 20-5.
46. Frye, C.A., S.M. Petralia, and M.E. Rhodes, Estrous cycle and sex differences in performance on anxiety tasks coincide with increases in hippocampal progesterone and 3alpha,5alpha-THP. *Pharmacol Biochem Behav*, 2000. 67(3): p. 587-96.
47. Mitrovic, A.D., J.E. Maddison, and G.A. Johnston, Influence of the oestrous cycle on L-glutamate and L-aspartate transport in rat brain synaptosomes. *Neurochem Int*, 1999. 34(2): p. 101-8.
48. Lee, E., et al., Transforming growth factor-alpha mediates estrogen-induced upregulation of glutamate transporter GLT-1 in rat primary astrocytes. *Glia*, 2012. 60(7): p. 1024-36.
49. Lee, E.S., et al., Estrogen and tamoxifen reverse manganese-induced glutamate transporter impairment in astrocytes. *J Neurochem*, 2009. 110(2): p. 530-44.
50. Walf, A.A. and C.A. Frye, A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. *Neuropsychopharmacology*, 2006. 31(6): p. 1097-111.
51. Walf, A.A. and C.A. Frye, Effects of two estradiol regimens on anxiety and depressive behaviors and trophic effects in peripheral tissues in a rodent model. *Gend Med*, 2009. 6(1): p. 300-11.
52. Becker, J.B. and J.H. Cha, Estrous cycle-dependent variation in amphetamine-induced behaviors and striatal dopamine release assessed with microdialysis. *Behav Brain Res*, 1989. 35(2): p. 117-25.

