

**LA DISMINUCION DE LA EXPRESION DE LA SUBUNIDAD GLUN2A DEL
RECEPTOR DE NMDA EN EL HIPOCAMPO PRODUCE CAMBIOS EN EL
COMPORTAMIENTO NORMAL DE ROEDORES**

Trabajo Final de Grado
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino/Junín, 13/07/2024

**LA DISMINUCION DE LA EXPRESION DE LA SUBUNIDAD GLUN2A DEL
RECEPTOR DE NMDA EN EL HIPOCAMPO PRODUCE CAMBIOS EN EL
COMPORTAMIENTO NORMAL DE ROEDORES**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

LUISINA CASTELLARI

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Maria Laura Palumbo
Evaluador/a

Maria Jose Delgado
Evaluador/a

Manuela Santalla
Evaluador/a

Maria Florencia Acutain
Co-Director/a

Maria Veronica Baez
Director/a

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino/Junín, 13/07/2024

Agradecimientos

Con la entrega de estas 62 páginas, se termina lo que fue una de las etapas más lindas para mí. Una etapa en la que, no solo crecí a nivel académico y profesional, sino que principalmente me dio herramientas para construir una nueva “yo” que me gusta un montón.

Una etapa en la que aprendí a valorar los momentos con las personas que quiero porque, por más raro que sea estar lejos de tu familia y amigos de toda la vida, es hermoso poder volver a tu casa y que se sienta como si se vieran todos los días.

Una etapa en la que aprendí que me encanta la independencia de vivir solo, siempre y cuando tenga personitas cerca para compartir una comida, una charla o el simple hecho de ir a tirarnos al solcito al arroyo a escuchar música.

Una etapa en la que conocí personas que se volvieron mi segunda familia que, por más de que a algunos no los vea mucho, ocupan un espacio súper importante para mí.

Les quiero agradecer a todas estas personas por acompañarme a lo largo de estos 7 hermosos años, que siento que me llevaron a ser la persona que soy hoy en día.

A nivel académico, quiero agradecerle a la UNNOBA como institución. Nunca pensé que podía disfrutar tanto una carrera como lo hice. Me llevo un montón de herramientas para aplicar en mi futuro, gracias a todos los buenos profesionales que se cruzaron en mi camino.

Y, por último, quería agradecerle principalmente a Vero por confiar en mí y darme un lugar en su laboratorio para que este trabajo se pudiera materializar. Gracias a Vero, Flor y todas las chicas del laboratorio por acompañarme en este proceso. Durante el tiempo que estuve, aprendí un montón sobre el mundo de la investigación y siento que me voy con muchísimas herramientas para el futuro, tanto profesionales como personales. Nada mejor que trabajar en un lugar donde te hacen sentir parte de todo, donde se labura con muchas ganas y buenas energías.

Y con estas palabras, damos por finalizado otro capítulo de mi vida que se llama
“Facultad y otras cositas”

(lo escribo y lo digo en voz alta, y aun así no parece real)

Resumen

Los receptores NMDA (RNMDA) tienen un rol fundamental en la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria. Dentro de este último proceso, los RNMDA se encuentran involucrados en las distintas fases, principalmente en la codificación y almacenamiento de la información. Estos receptores son proteínas de membrana de estructura heterotetramérica compuestos por dos subunidades GluN1, obligatorias para el ensamblado del receptor, y dos subunidades regulatorias: GluN2 (A, B, C o D) o GluN3 (A o B). En el SNC de mamíferos, en particular en el hipocampo y las estructuras corticales relacionadas con la formación de memorias; las subunidades regulatorias de mayor expresión son GluN2A y GluN2B. La expresión de dichas subunidades varía a lo largo del desarrollo y en respuesta a la actividad sináptica con un patrón de regulación muy específico. Durante el desarrollo embrionario predomina la expresión de GluN2B; pero luego del nacimiento, y en paralelo a la maduración sináptica y neuronal, se produce un incremento en la expresión de GluN2A, cambiando la relación entre estas dos subunidades, lo cual se conoce como *switch* del desarrollo. Este cambio en la relación GluN2A/GluN2B permite la maduración sináptica tanto durante el desarrollo como en la vida adulta, durante el aprendizaje y la formación de nuevas memorias. Durante la presente tesis, estudiamos el rol de la subunidad GluN2A en la memoria y el aprendizaje a través del uso de un modelo *knock down* de dicha subunidad en el hipocampo de rata Wistar, luego del *switch* del desarrollo. Los animales se expusieron a varios ensayos de comportamiento, permitiendo evaluar distintos tipos de memoria. Los resultados demostraron que el silenciamiento específico de GluN2A *in vivo*, en CA1 y giro dentado del hipocampo, afecta el comportamiento esperado durante un paradigma de localización de objetos y de interacción social. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en la memoria de trabajo, sugiriendo que la disminución de los niveles de expresión de GluN2A, estaría mayormente vinculada a una alteración en la adquisición y/o consolidación de memorias de tipo espaciales y de reconocimiento social.

Abreviaturas

AAV: Vector derivado de virus adeno-asociado.

AAV-sh2A: Vector AAV que codifica para un ARNsh específico para GluN2A.

AAV-shSc: Vector AAV que codifica para un ARNsh inespecífico *scramble*.

AP: Anteroposterior

AP5: ácido 2-amino 5-fosfono valérico

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

BM: Barnes Maze

CA: Campo abierto

DG: Giro Dentado

DPI: Días post-infección.

DV: Dorsoventral.

eGFP: Proteína verde fluorescente mejorada.

Glu: Glutamato

GluN1: Subunidad 1 del RNMDA.

GluN2A: Subunidad 2A del RNMDA.

GluN2B: Subunidad 2B del RNMDA.

GluN2A-KD: animales inyectados con el AAV-sh2A

GluN2A-RNMDA: Receptor NMDA contenido GluN2A.

GluN2B-RNMDA: Receptor NMDA contenido GluN2B.

IBCN: Instituto de Biología Celular y Neurociencia.

ID: Índice de discriminación

IF: Intensidad de Fluorescencia

IS: Interacción social

KO: del inglés *knock out*

KD: del inglés *knock down*

LL: Laterolateral

LTD: Depresión de larga duración (del inglés *Long Term Depression*)

LTP: Potenciación de larga duración (del inglés *Long Term Potentiation*)

MOI: Multiplicidad de infección.

MoDG: capa molecular del giro dentado

MLP: memoria de largo plazo

MWM: del inglés *Morris Water Maze*

MW24: placa multipocillo de 24 pocillos

NMDA: N-metil-D-aspartato

PBS: Buffer fosfato salino (del inglés *Phosphate saline buffer*).

PoDG: capa polimórfica del giro dentado

RAMPA: receptor AMPA (responde a ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico)

RNMDA: Receptor NMDA (responde al N-metil-D-aspartato)

OF: del inglés *Open Field*

OL: del inglés *Object Location*

PS: Plasticidad sináptica

PYR: zona de los somas de las neuronas piramidales

shRNA: del inglés *short hairpin RNA*

SI: Sitio de inyección.

SNC: Sistema nervioso central.

SO: *Stratum Oriente*

SR: *Stratum Radiatum*

Y-M: del inglés Y-maze

Índice

Resumen	3
Abreviaturas.....	4
Introducción.....	7
<i>Memoria y aprendizaje</i>	7
<i>Sinapsis y Plasticidad Sináptica</i>	7
<i>Receptores involucrados en la memoria</i>	8
<i>RNMDA</i>	9
<i>RNMDA en la memoria y el aprendizaje</i>	11
<i>Cambios en la expresión de la subunidad GluN2A y su relación con los procesos de memoria y aprendizaje.</i>	12
<i>Resultados previos del laboratorio</i>	13
Hipótesis y Objetivos	16
<i>Vectores AAV</i>	17
<i>Inyección de los vectores</i>	18
<i>Ensayos de comportamiento</i>	19
<i>Inmunofluorescencia</i>	28
<i>Análisis estadístico</i>	31
<i>Memoria y aprendizaje en ratas GluN2A-KD.</i>	32
<i>Disminución de la expresión de la subunidad GluN2A en el hipocampo de ratas Winstar.</i>	45
Discusión.....	51
Conclusiones	57
Bibliografía	58

Introducción

Memoria y aprendizaje

El aprendizaje y la memoria son procesos que permiten la modificación del comportamiento en base a la experiencia. Se considera que el aprendizaje es la adquisición de nuevos conocimientos sobre el entorno a partir de una experiencia o la exposición a un estímulo determinado, mientras que la memoria, es la capacidad de almacenar el conocimiento adquirido de manera tal de volver a utilizarlo ante el estímulo adecuado (Kandel and Schwartz, 1982).

La memoria puede tener distinta duración dependiendo de la experiencia previa y la fuerza y frecuencia del estímulo que la originó. Principalmente, se distinguen dos grandes tipos: memoria de corto plazo (MCP) y memoria de largo plazo (MLP) (Kandel, 2001). La MCP es la capacidad de mantener disponible una pequeña cantidad de información durante un corto período de tiempo (Camina & Güell, 2017) y su formación es independiente de la síntesis proteica. Por otro lado, la MLP permite conservar información por períodos de tiempo más largos, y su formación implica la activación de distintas cascadas de señales que llevan a un cambio en el patrón de expresión proteico, lo que induce arreglos estructurales en las células del sistema nervioso (Kandel, 2001; McGaugh, 2000).

Existen dos enfoques principales de análisis para el estudio de los mecanismos involucrados en la memoria y el aprendizaje: 1) comportamental, que evalúa el desempeño del sujeto de estudio ante un paradigma específico y 2) celular y molecular, que estudia mediante la observación y medición, los cambios biofísicos, bioquímicos y estructurales en regiones cerebrales específicas, involucradas en las distintas etapas de la memoria. Es importante mencionar la existencia de un tercer enfoque que no se abordará en esta tesis, pero es de gran importancia para el estudio de estos procesos: la electrofisiología, que se encarga de estudiar las corrientes eléctricas y los cambios en las mismas dentro de los circuitos neuronales.

Sinapsis y Plasticidad Sináptica

Las sinapsis son el sitio de comunicación entre las neuronas del sistema nervioso central (SNC) y periférico. Son estructuras plásticas cuya composición molecular y, en consecuencia, sus características funcionales, cambian en respuesta a los distintos estímulos recibidos (Kandel et al., 2012; Mayford et al., 2012; Nimchinsky et al., 2002; Zagrean, 2014).

Las modificaciones que ocurren a nivel sináptico se conocen, en conjunto, como plasticidad sináptica (PS), e implican cambios en la plasticidad neuronal y los circuitos que subyacen a la cognición y el comportamiento. La plasticidad neuronal puede involucrar cambios en la morfología, lo que se conoce como plasticidad estructural; y, por otro lado, variaciones en la actividad de los receptores y circuitos neuronales involucrados, definido como plasticidad funcional (Forrest et. al, 2018).

Estos cambios funcionales y estructurales en las sinapsis serían la base del almacenamiento de una memoria o una experiencia aprendida (Lau and Zukin, 2007).

Los mismos son inducidos en función de la actividad y experiencia. Los cambios de duración prolongada dependientes de actividad, como la LTP (potenciación a largo plazo, del inglés *Long Term Potentiation*) o la LTD (depresión de larga duración, del inglés *Long Term Depression*), consisten respectivamente en un reforzamiento o en un debilitamiento sostenido de ciertas sinapsis (Bliss and Gardner-Medwin, 1973; MacDonald et al., 2006). Estas formas de PS estarían involucradas en la estabilización de las sinapsis, constituyendo un posible sustrato para el procesamiento del aprendizaje y la memoria (Bliss and Collingridge, 1993; Bliss and Gardner-Medwin, 1973).

Receptores involucrados en la memoria

La mayor parte de sinapsis excitatorias presentes en el SNC están mediadas por el glutamato (Glu), un aminoácido no esencial que actúa como neurotransmisor (Pin and Duvoisin, 1995; Kelly and Stanley, 2001). Esta molécula participa en una gran variedad de procesos neuronales involucrados con el aprendizaje y la memoria, la LTP y la PS (Fairman and Amara, 1999).

A lo largo de los años, se han identificado dos tipos principales de receptores de Glu: 1) Receptores ionotrópicos, correspondientes a canales iónicos dependientes de voltaje responsables de generar una rápida respuesta postsináptica (Figura 1A) y 2) Receptores metabotrópicos acoplados a proteína G, encargados de modular la transmisión sináptica mediante la interacción con segundos mensajeros intracelulares (Figura 1B) (Hollmann and Heinemann 1994; Nakanishi et al. 1998).

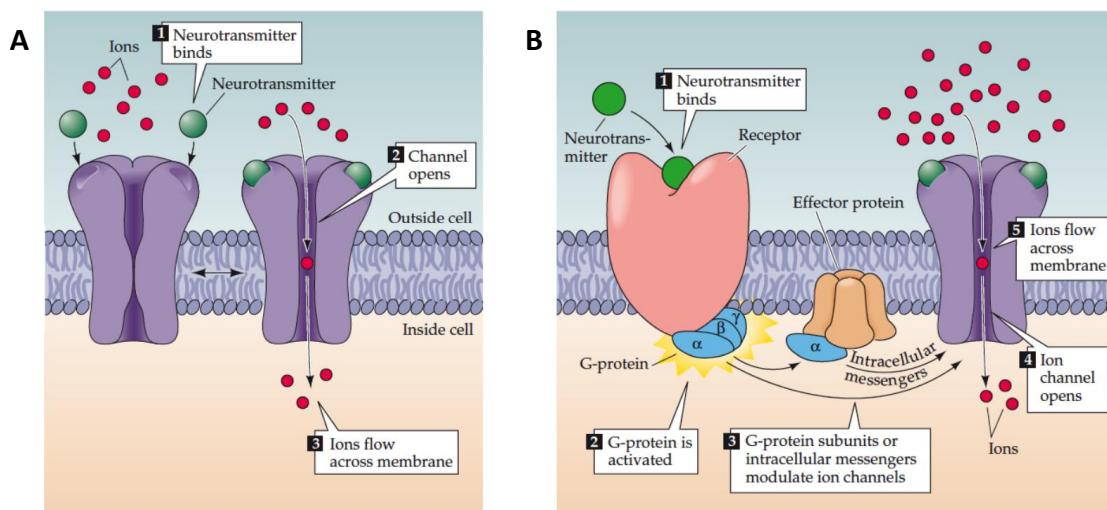


Figura 1. Tipos de receptores de Glu. A. Receptores Inotrópicos de la membrana plasmática neuronal que funcionan como canales iónicos específicos. B. Receptores acoplados a proteína G, conformados por una gran familia de proteínas receptores transmembrana que responden a la unión de un ligando particular para generar respuestas celulares específicas. Extraído de *Circuits within the basal ganglia system* en *Neuroscience. 2nd edition*.

Los receptores metabotrópicos modulan la transmisión sináptica lenta. Presentan una estructura clásica de siete dominios transmembrana (característica de los receptores acoplados a proteína G), que les permite activar vías de señalización específicas tras la unión de Glu. Según la homología de secuencia, la farmacología y las asociaciones de segundos mensajeros, se clasifican en las subfamilias de los grupos I, II, III y V (Heuss et al., 1999).

Por otro lado, los receptores ionotrópicos de Glu se dividen en tres grupos principales según sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas: los que responden a ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), aquellos que tienen como agonista al kainato (KA) y los que tienen al N-metil-D-aspartato (NMDA) como agonista (Hollmann and Heinemann, 1994; Monaghan et al., 1989). Los receptores AMPA (RAMPA) contribuyen a la respuesta rápida de las corrientes postsinápticas excitatorias, mientras que los receptores NMDA (RNMDA) median la respuesta tardía. Esto sucede ya que la activación de estos últimos depende, entre otros factores, de la despolarización de la membrana post sináptica inducida por la activación de los RAMPA, lo que conduce finalmente a un incremento en la concentración del calcio citoplasmático (Seeburg et al., 1998).

La hipótesis conocida como "*NMDA-LTP hypothesis*", propuesta por Morris y colaboradores, en relación con el aprendizaje de la versión espacial del tanque de agua (en inglés *Morris Water Maze*, MWM) -con plataforma sumergida no visible-, propone una relación directa y causal entre la LTP en el hipocampo, los RNMDA y el aprendizaje/memoria (Morris et al., 1986). La misma fue propuesta a partir de que los antagonistas de RNMDA que inhiben la introducción de LTP, bloquean la consolidación de las LTM.

RNMDA

Los RNMDA son canales iónicos que se distribuyen en todo el SNC y se expresan en diversos tipos celulares. Estos receptores, son dependientes de ligando y voltaje ya que, para promover la entrada de Ca^{2+} y Na^+ a las células, es necesario que se produzcan dos sucesos en simultáneo: 1) la unión de los co-agonistas Glu y glicina, liberados desde las presinapsis, a sus sitios específicos en el receptor. Y 2) la despolarización de la membrana postsináptica, lo que induce un cambio de conformación en el RNMDA para liberar el ion Mg^{2+} que, en condiciones de reposo, bloquea el canal del receptor (Seeburg et al., 1995; Mayer et al., 1984).

Los RNMDA presentan una estructura heterotetramérica ya que están compuestos por cuatro subunidades específicas (Figura 2A y 2B). Dos de las mismas, denominadas GluN1, son obligatorias y permiten el ensamblado del receptor, mientras que las dos restantes son subunidades regulatorias que le confieren distintas propiedades farmacocinéticas (Lau & Zukin, 2007; Sanz-Clemente, 2013). Estas últimas pueden ser de tipo GluN2 (GluN2A – GluN2D) o GluN3 (GluN3A y GluN3B) y se expresan diferencialmente dependiendo del momento del desarrollo, la región y la población celular analizada. De esta manera se pueden ensamblar receptores di-heteroméricos o tri-heteroméricos según la agrupación de las subunidades que lo conforman (Paoletti et al., 2013) (Figura 2B).

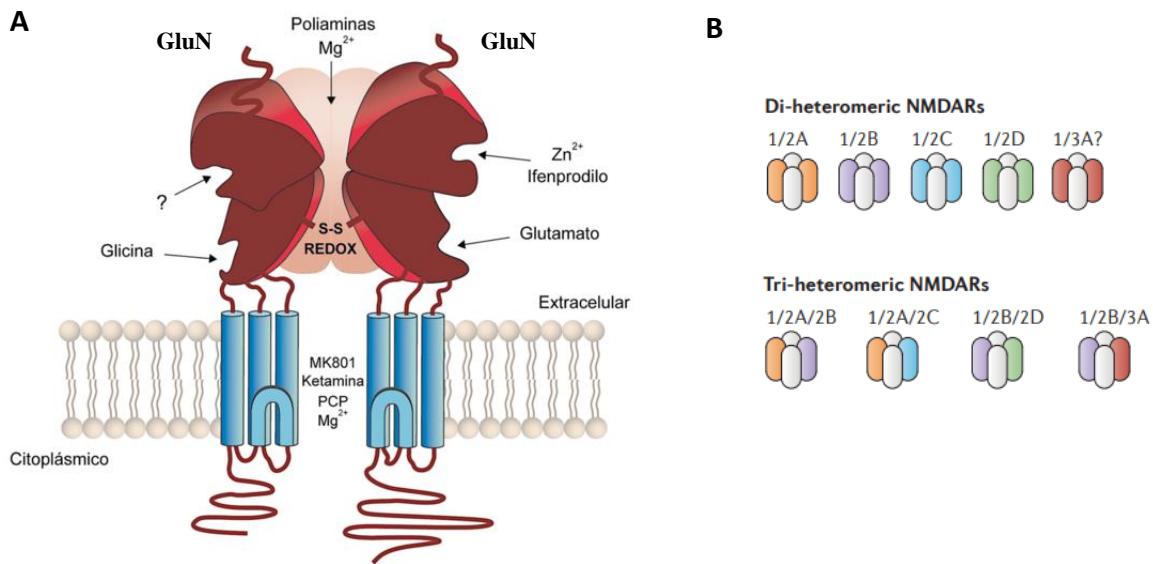


Figura 2. RNMDA. **A.** Esquema de la estructura del RNMDA. Adaptada de Kemp & McKernan, 2002. **B.** Tipo de receptores según la agrupación de las subunidades regulatorias. Adaptada de Paoletti et al., 2013.

En el SNC de mamíferos, en particular en el hipocampo y las estructuras corticales relacionadas con la formación de memorias; las subunidades regulatorias de mayor expresión son GluN2A y GluN2B. (Monyer et al., 1994; Paoletti et al., 2013). El patrón de expresión de las mismas varía de una manera muy específica a lo largo del desarrollo y en respuesta a la actividad sináptica (Figura 3). Durante el desarrollo embrionario, existe una expresión preponderante de la subunidad GluN2B por lo que los RNMDA dentro del SNC, son ensamblados con dos copias de esta subunidad ($GluN1_2 - GluN2B_2$). Luego del nacimiento, aumentan los niveles de traducción y transcripción de GluN2A, produciendo un incremento de los receptores que contienen esta subunidad: los diheteroméricos $GluN1_2 - GluN2A_2$ y los triheteroméricos $GluN1_2 - GluN2A - GluN2B$ (Hoffmann et al., 2000; Sans et al., 2000). Este cambio en la relación de expresión GluN2A/GluN2B se conoce como *switch de desarrollo* y está asociado a la maduración sináptica de las estructuras involucradas, tanto durante el desarrollo como durante los procesos de aprendizaje y memoria (Paoletti et al., 2013).

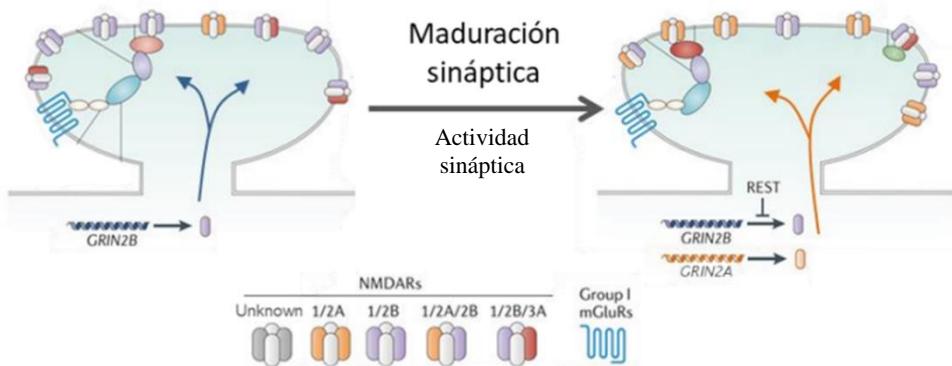


Figura 3. Maduración sináptica. Durante el desarrollo, las estructuras inmaduras del SNC presentan mayoritariamente RNMDA-GluN2B. Luego del *switch* del desarrollo y la maduración sináptica inducida por actividad, aumenta la expresión de GluN2A a partir de su ARNm (*grin2a*). Adaptado de Paoletti et al., 2013.

RNMDA en la memoria y el aprendizaje

A lo largo de los años se ha estudiado que los RNMDA tienen un rol fundamental en el aprendizaje, la memoria y el desarrollo sináptico. En un principio, mediante estudios en los que se bloqueó farmacológicamente el receptor (Izquierdo and Medina, 1993; Jentsh and Roth, 1999; Morris et al., 1986); y posteriormente, mediante ensayos genéticos donde se bloquearon o se silenciaron las distintas subunidades del mismo en áreas relacionadas con estos procesos (Bannerman et al., 2012; Chen et al., 1992; Gilman and Helmstetter, 2010; Kennard et al., 2009; Morris, 2013; Sun et al., 2016).

La administración de antagonistas del RNMDA induce un déficit en el rendimiento de tareas dependientes del hipocampo y la amígdala (Izquierdo and Medina, 1993; Jentsh and Roth, 1999). Morris y colaboradores demostraron cómo la administración en el hipocampo de agonistas competitivos de los RNMDA, como el ácido 2-amino 5-fosfato valérico (AP5) produce amnesia anterógrada en los animales cuando son expuestos al MWM (Morris et al., 1986). Asimismo, los estudios farmacológicos en ratas y ratones también revelaron déficits en la memoria social después de la administración de antagonistas del RNMDA, como MK-801 (Shimazaki et al., 2010; Hikichi et al., 2013), PCP (Harich et al., 2007) y ketamina (Gao et al., 2009).

Por otra parte, el estudio en roedores transgénicos y mutantes ha proporcionado mayor evidencia que apoya la hipótesis de que los RNMDA están involucrados en los procesos de memoria y aprendizaje. Ratones transgénicos *knock out* (KO) para GluN1 que, por lo tanto, carecen de RNMDA en la región CA1 del hipocampo, presentan déficits severos en diversos paradigmas del aprendizaje espacial y no espacial (Shimizu et al., 2000; Tsien et al., 1996). Asimismo, en otro modelo de ratones KO para la subunidad GluN1, no se observaron déficits en la prueba del MWM pero si en la tarea del laberinto radial que permite evaluar memoria de referencia espacial (Bannerman et al., 2012). También, se describieron déficits en la memoria de reconocimiento social en ratones en los que la subunidad GluN1 se silenció selectivamente en interneuronas

GABAérgicas corticales y del hipocampo durante el desarrollo posnatal, pero no durante la edad adulta (Lukas et al., 2011).

No sólo el uso de bloqueantes farmacológicos y animales transgénicos nos brinda información de cómo los RNMDA están involucrados en los procesos de aprendizaje y memoria. En trabajos recientes se han reportado cambios en los niveles de expresión o localización de las subunidades del RNMDA luego de diferentes ensayos comportamentales que involucran la adquisición de una MLP en diferentes paradigmas de entrenamiento. En paradigmas que involucran entrenamiento de sesión única, como la habituación a un campo abierto (Baez et al., 2013) y el entrenamiento de la tarea de reconocimiento de objetos (Cercato et al., 2017); se observó un aumento significativo y transitorio en los niveles de GluN1 y GluN2A en el hipocampo). Estos aumentos también fueron reportados en tareas espaciales que requieren entrenamientos más largos, como el *hole-board*, donde se observó que los niveles de GluN1 y GluN2A se encontraban aumentados en las fracciones sinaptosomales del hipocampo (Subramaniyan et al., 2015) luego del entrenamiento que inducía una MLP.

Los resultados mencionados previamente demuestran la importancia de la correcta expresión del RNMDA para la adquisición y la expresión de un MLP en diferentes paradigmas.

Cambios en la expresión de la subunidad GluN2A y su relación con los procesos de memoria y aprendizaje.

El gen *grin2A* codifica para la subunidad GluN2A del RNMDA y mapea en el cromosoma humano 16p13. En los últimos años, se han encontrado más de 60 mutaciones para este gen en pacientes que presentan diversos tipos de retraso y trastornos del neurodesarrollo (Elmasri et al., 2022; Benke 2021). En aproximadamente el 80% de los pacientes se observa el desarrollo de convulsiones, y en el 60 % de los mismos, discapacidad cognitiva (Benke et al., 2021; Elmasri et al., 2022). Varias de las mutaciones descritas se manifiestan con la disminución en la expresión de la subunidad GluN2A, debido a que no se expresa la proteína o se genera una proteína truncada (Reutlinger et al, 2010; Lesca et al, 2013; Endelev et al, 2010). Por esta razón, es de gran importancia investigar cómo los cambios en la expresión de la subunidad influyen en distintos parámetros de la cognición.

Los modelos KO para GluN2A poseen un desarrollo normal, al contrario que los KO de GluN1 y GluN2B que resultan letales (Paoletti et al, 2013). Sin embargo, se demostró que estos KO para GluN2A presentan déficits de memorias espaciales a corto plazo y de memoria de trabajo (Bannerman et al., 2008; Bannerman, 2009; Kannangara et al., 2015) sin cambios en la adquisición de MLPs espaciales. Además, en otro modelo de ratones KO para la subunidad, se observó un déficit en la memoria contextual durante una prueba de condicionamiento aversivo dependiente de tono y de contexto (Kiyama et al, 1998). Asimismo, en trabajos donde se les indujo a los animales una mutación en el extremo C-terminal de la subunidad GluN2A, se observó que los mismos exhibían una memoria de trabajo espacial deteriorada (Bannerman et al., 2008) y presentaban déficits en la memoria de miedo formada a partir de un condicionamiento aversivo (Sprengel et al., 1998).

La expresión de GluN2A también puede ser disminuida indirectamente. En animales KO para Kif3b, una quinesina que se encarga de transportar vesículas con GluN2A, se observó una disminución de GluN2A a nivel proteico en las sinapsis. El posterior análisis de comportamiento de estos animales mostró déficits tanto en el interés social durante la prueba de las tres cámaras, como en la flexibilidad cognitiva durante la prueba de Barnes Inverso, que permite identificar si los animales son capaces de adaptarse frente a situaciones nuevas e inesperadas (Alsabban et al., 2019).

Los resultados publicados a lo largo de los últimos años sugieren que la disminución en la expresión de GluN2A desde el desarrollo embrionario, afectan a la MCP y a la adquisición de memorias de trabajo espaciales, pero no así a la MLP. Estos cambios fueron descriptos en animales que se desarrollaron sin la expresión (o con la expresión de una mutante) de GluN2A. Sin embargo, los pacientes que exhiben mutaciones en *grin2A* sólo poseen disminución de la expresión de GluN2A, por lo que es importante continuar con la realización de ensayos que puedan demostrar como la disminución en la expresión de GluN2A post *switch del desarrollo*, afectan la memoria y el aprendizaje en distintos paradigmas.

Resultados previos del laboratorio

En el Laboratorio de Sinapsis y Neurobiología Celular, se ha estudiado la disminución de la expresión de GluN2A mediante un shRNA (del inglés *short hairpin RNA*) anti GluN2A codificado por un vector AAV, tanto *in vitro*, en cultivos primarios maduros de neuronas de hipocampo como *in vivo*, mediante inyección intrahipocampal en un modelo de rata (Acutain et al 2021 y 2023). *In vitro*, los cultivos fueron transducidos con el vector AAV-sh2A o un vector control que codifica para un shRNA sin blanco en células eucariotas (*scramble*, AAV-shSC). A nivel mensajero se observó, mediante RT-qPCR, que la expresión de GluN2A disminuye en los cultivos transducidos con el AAV-sh2A comparada con los cultivos controles, sin afectar la expresión de los mensajeros de GluN1 o GluN2B. A nivel proteína, se observó una disminución de GluN2A, pero no de GluN2B lo que produjo un cambio en la relación GluN2A/GluN2B disminuyéndola significativamente en aquellos cultivos transducidos con el AAV-sh2A (Acutain et al., 2021).

Por otra parte, el silenciamiento de GluN2A *in vivo* (GluN2A-KD), en el hipocampo de ratas Wistar macho jóvenes, luego del *switch* del desarrollo, produjo cambios en la exploración del espacio (Figura 4) y un déficit en la parte contextual de una memoria de miedo durante un ensayo de condicionamiento auditivo (Figura 5). En un paradigma de reconocimiento de objetos (Figura 4A), las ratas en las cuales la expresión de GluN2A se hallaba disminuida, exploraron por más tiempo los objetos en una sesión de entrenamiento en un paradigma de reconocimiento de objetos (Figura 4B). Sin embargo, los animales GluN2A-KD no mostraron un comportamiento diferencial en comparación a los animales control durante la sesión de testeо en un paradigma de reconocimiento de objeto novedoso, alcanzando el criterio de aprendizaje de manera similar a los controles por lo que los animales GluN2A-KD pueden diferenciar entre un objeto previamente conocido y uno totalmente novedoso (Figura 4C y D) (Acutain et al., 2021).

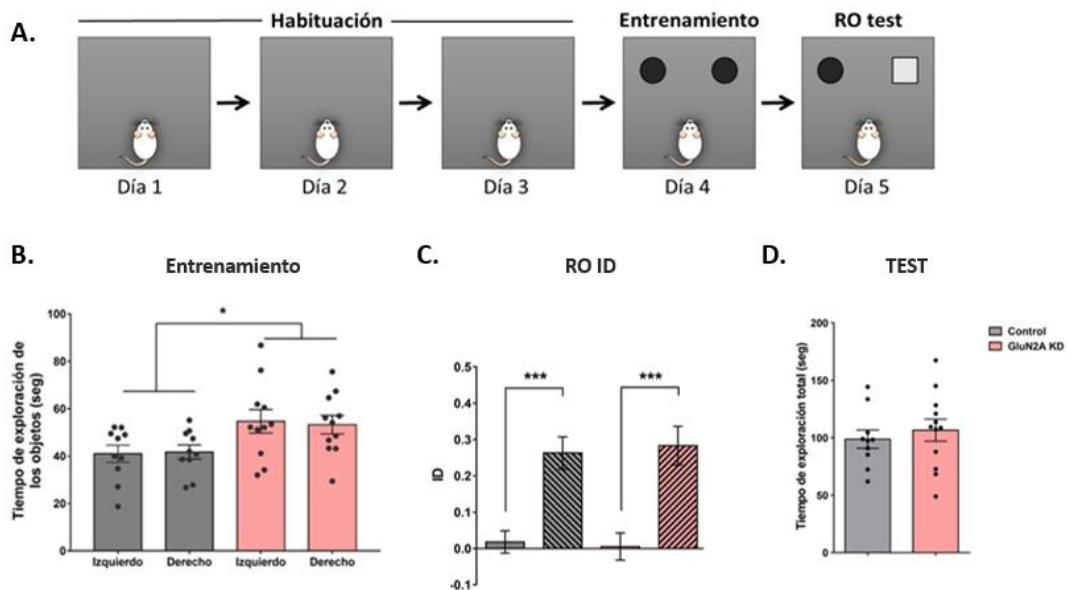


Figura 4. Evaluación de memoria de reconocimiento de objetos. A. Esquema de la prueba de reconocimiento de objetos (RO) utilizada. **B.** Análisis del tiempo total de exploración de cada uno de los objetos durante el entrenamiento de la tarea de RO. Se observa una diferencia significativa en el tiempo total de exploración de los animales inyectados con el vector AAV-sh2A (barras rosas) respecto de los controles (barras grises). * P < 0.05. ANOVA de 2 vías, post test de Tukey. **C.** Índice de discriminación (ID) entre los objetos, durante el entrenamiento (barras lisas) y test (barras rayadas). Se observa una diferencia significativa en el ID en ambos grupos de animales inyectados con los vectores AAV-shSC y AAV-sh2A. *** P < 0.001. ANOVA de 2 vías, post test de Tukey. **D.** Tiempo de exploración total durante la sesión del testeо. No se observan diferencias significativas entre los grupos de estudio. (Acutain et al., 2021).

Por otro lado, en el paradigma de condicionamiento por miedo utilizado (Figura 5A), los animales en los cuales la expresión de GluN2A se hallaba disminuida en el hipocampo, mostraron similar porcentaje de *freezing* ante el test auditivo (Figura 5B y 5C) y una disminución significativa de la respuesta de inmovilidad con respecto a los controles en la parte contextual (Figura 5D) (Acutain et al., 2021). Esto sugiere que la adquisición y/o consolidación del componente espacial de un paradigma que involucra la formación de una memoria asociativa de miedo, con componente aversivo, se encuentra alterado.

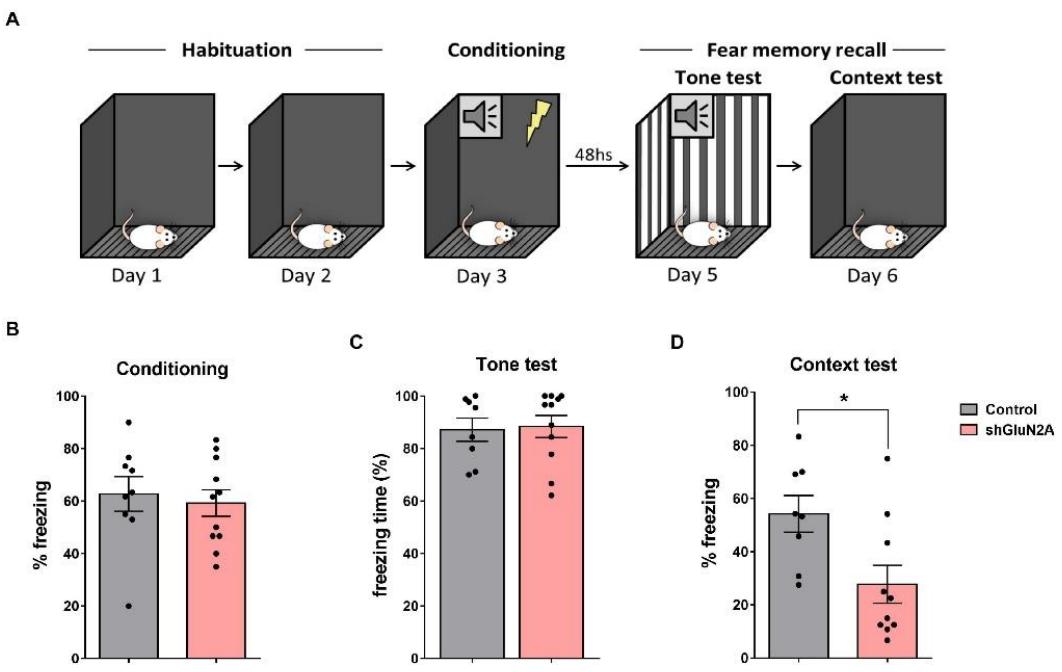


Figura 5. Evaluación de la memoria de miedo en los animales GluN2A-KD (barras rosas) y control (barras grises). A. Esquema representativo del desarrollo de la tarea y de los contextos utilizados. B. Tiempo promedio de inmovilidad total de los animales (*freezing*) durante la presentación de los últimos 2 sonidos durante el condicionamiento. C. Tiempo promedio de inmovilidad total de los animales durante la presentación del estímulo condicionado en el test auditivo en un contexto nuevo. D. Tiempo promedio de inmovilidad total de los animales durante el test contextual, e ausencia de estímulo condicionado. * P < 0.05, Test de Student. En todos los casos la respuesta de inmovilidad de los animales (*freezing*) se expresa como porcentaje respecto del tiempo total analizado en cada contexto. n=10 animales por grupo (Acutain et al., 2021).

En conjunto, estos resultados indicarían que, la disminución de la expresión de GluN2A en el hipocampo, produce un déficit en la respuesta dependiente del contexto, pero no así en las memorias de asociación (Acutain et al., 2021).

Hipótesis y Objetivos

Considerando que a lo largo de los últimos años se han descripto mutaciones en *grin2A* en pacientes que presentan diversos tipos de discapacidad intelectual y trastornos del neurodesarrollo y, que estas mutaciones, producen una disminución de la expresión en GluN2A (Reutlinger et al, 2010; Lesca et al, 2013; Ende et al, 2010), es importante investigar que sucede en diferentes paradigmas comportamentales cuando la expresión de la subunidad está disminuida, sobre todo, después del *switch del desarrollo*.

Por esta razón y, teniendo en cuenta que en distintos modelos murinos donde la expresión de GluN2A está disminuida o silenciada, se producen déficits en la memoria relacionada con contexto sin alterar la adquisición de memorias de largo plazo, proponemos que la disminución en la expresión de la subunidad GluN2A en el hipocampo, luego del *switch* del desarrollo, produce cambios en el comportamiento normal de roedores y en la adquisición y consolidación de memorias de tipo espacial.

Para probar esta hipótesis, planteamos como objetivo general comprobar si la disminución de la expresión de la subunidad GluN2A, luego del *switch* de desarrollo, en el hipocampo de ratas macho adultas, exhibe cambios comportamentales y en la adquisición y consolidación de diferentes paradigmas, poniendo énfasis en las tareas de tipo espacial.

Esto será cumplido mediante los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar si el silenciamiento de la subunidad GluN2A en el hipocampo, afecta la memoria espacial y el aprendizaje en roedores a partir de las pruebas de *Object Location* y *Barnes Maze*.
2. Evaluar la flexibilidad cognitiva en los animales GluN2A-KD y controles mediante una prueba de *Barnes Maze* inverso.
3. Comprobar si el silenciamiento de GluN2A en el hipocampo, produce déficits en la memoria de trabajo y la memoria de reconocimiento social, durante la prueba de *Y-Maze* e Interacción social, respectivamente.
4. Evaluar el área y patrón de infección de los vectores virales AAV-shSC y AAV-sh2A utilizados en el modelo de estudio, y comprobar la eficiencia en el silenciamiento de la subunidad GluN2A en el grupo GluN2A-KD.

Materiales y Métodos

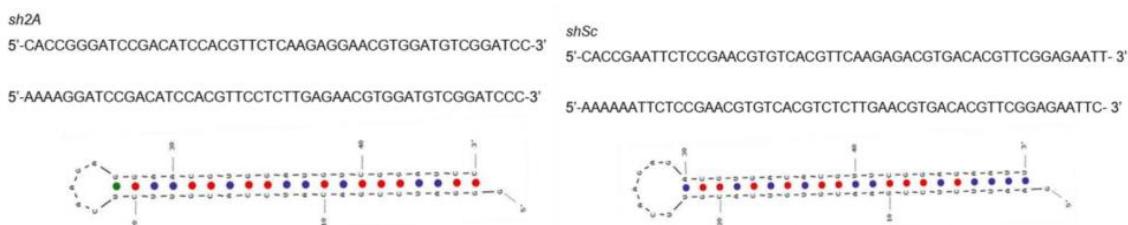
PARTE I: Ensayos de comportamiento.

Vectores

AAV

Para silenciar la expresión de la subunidad GluN2A, se emplearon vectores adenoasociados (AAV) que codifican para un short hairpin RNA (shRNA) específico contra el ARNm de GluN2A (AAV-sh2A) o para una secuencia al azar (*scramble*) que se utilizó como control (AAV-shSC). Este último, presenta la misma composición de nucleótidos que el sh2A, pero sin blanco en células eucariotas (Figura 6A). La producción viral se realizó previo al inicio de esta tesis, mediante la cotransfección de células 293SZ con los plásmidos pBS-GFP-U6-sh2A o pBS-GFP-U6-shSc (Figura 6B), el plásmido helper y el plásmido rep-cap (Tesis de licenciatura, Cecilia Alejandra Vázquez, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN-UBA), 2016). Ambos vectores obtenidos contienen, como gen reportero, la secuencia de la proteína verde fluorescente (eGFP), la cual permite detectar aquellas células efectivamente transducidas (Acutain et al., 2021).

A



B

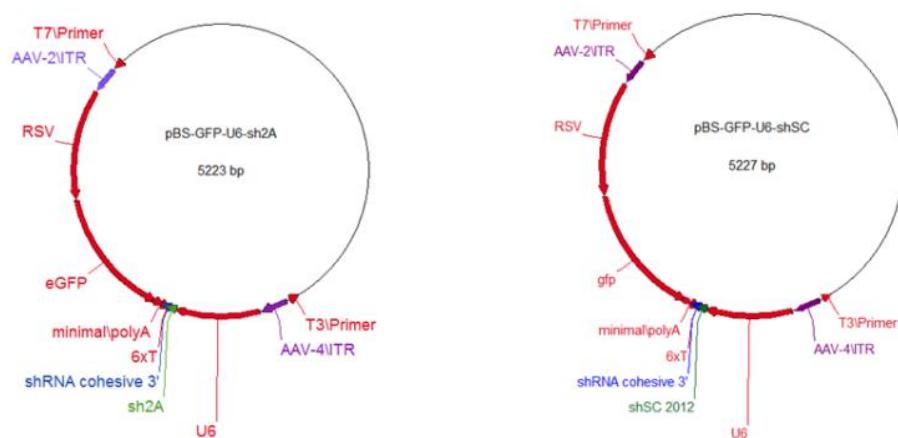


Figura 6. Secuencia de los shRNA codificadas en los vectores adenoasociados (AAV). A. Secuencias de los shRNA contra el ARNm de GluN2A (sh2A) y de la secuencia *scramble* (shSC) empleadas en la construcción de los vectores AAV-sh2A y AAV-shSC respectivamente. Debajo de cada secuencia se esquematiza la estructura del shRNA transcripto (Acutain et al., 2021). B. Mapas de los plásmidos pBS-GFP-U6-sh2A y pBS-GFP-U6-shSc utilizados para la producción viral (Tesis de licenciatura, Cecilia Alejandra Vazquez, FCEN-UBA, 2016).

Animales

En este trabajo se utilizaron ratas Wistar macho adultos jóvenes (300-350 g) criadas en la Sala de Animales de Experimentación del Instituto de Biología Celular y Neurociencias (IBCN), Facultad de Medicina - Universidad de Buenos Aires (Argentina). Las mismas fueron alojadas en grupos de 3 a 5 animales, en jaulas con agua y alimento balanceado disponibles *ad libitum*. Las jaulas con los animales fueron colocadas en cuartos con condiciones controladas de luz y temperatura, con ciclo de luz: oscuridad de 12:12h (luces encendidas a las 7:00 AM), y temperatura constante de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Todos los protocolos experimentales utilizados se ajustan a las normas y cuidados indicados en “*National Institute of Health Guide of the Care and Use of Laboratory Animals*” (2011) y se encuentran aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Usos de Animales de Laboratorio (RESCD-2023-3685-E-UBA-DCT#FMED0) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires. En todos los experimentos se intentó minimizar el sufrimiento y el número de animales utilizados, manteniendo las condiciones apropiadas para garantizar el bienestar de los mismos. Se utilizaron 14 animales por grupo experimental.

Inyección de los vectores

Los vectores virales AAV-shSC (animales control) o AAV-sh2A (GluN2A-KD) fueron administrados *in vivo*, mediante cirugía estereotáctica, en la región CA1 del hipocampo de ratas Wistar macho bajo anestesia general (ketamina:xilazina 75:10 mg/Kg i.p.). El sitio de inyección se estableció según las coordenadas del Atlas de Paxinos (Paxinos & Watson, 2006), desde el Bregma: Anteroposterior (AP) - 4.0 mm, Laterolateral (LL) \pm 3.0 mm, Dorsoventral (DV) -1.8 mm. Posteriormente, se infundieron bilateralmente 2 μl (0.07 $\mu\text{l}/\text{min}$) de los correspondientes vectores AAV (MOI: 2x104) en la región definida. La multiplicidad de la infección y los días post inyección (DPI) con los cuales se obtiene una disminución efectiva de GluN2A fueron puestos a punto en un trabajo anterior (Acutain et al., 2021).

A todos los animales se les administró Meloxicam (1mg/kg) por vía subcutánea, como analgésico y antiinflamatorio durante la cirugía, y cada 24 hs hasta 48 hs después de la misma. Luego de la operación, los animales fueron devueltos a las jaulas para su recuperación, con agua y alimento balanceado disponibles *ad libitum*. Dichos animales fueron monitoreados diariamente para controlar la presencia de signos de dolor, decaimiento o cualquier otro cambio en el patrón de conducta.

Ensayos de comportamiento

Los mismos se llevaron a cabo en una de las salas de comportamiento pertenecientes a la Sala de Animales de Experimentación del IBCN, con el siguiente esquema experimental:

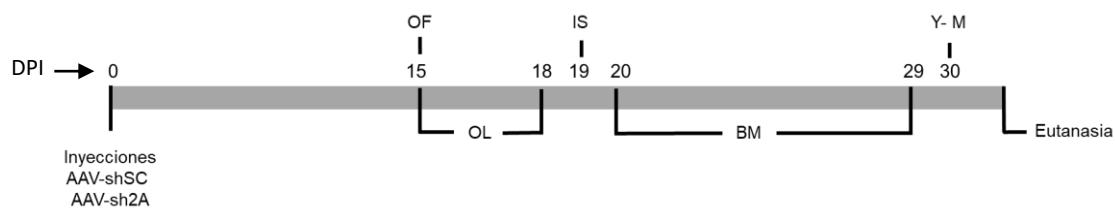


Figura 7. Esquema experimental de los ensayos de comportamiento llevados a cabo durante este estudio. DPI: Días Post Inyección. OF: Open Field. OL: Object Location. IS: Interacción Social. BM: Barnes Maze. Y-M: Y – Maze.

➤ OF

El ensayo de OF se llevó a cabo para corroborar que las cirugías no hubieran provocado modificaciones en la locomoción y el patrón normal exploratorio de los animales. La exposición a un campo abierto (CA), permite evaluar distintos aspectos del comportamiento como la actividad locomotora y exploratoria en roedores, así como también el comportamiento simil-ansioso en estos animales. El ensayo consiste en colocar al animal en un ambiente novedoso, libre de cualquier estímulo apetitivo o aversivo y dejarlo explorar libremente durante un determinado tiempo. Se evalúan los cambios en la actividad exploratoria del individuo a medida que pasa el tiempo, buscando estudiar el comportamiento locomotor normal y la habituación del animal al nuevo ambiente (Prut and Belzung, 2003).

En este estudio, el CA novedoso donde se realizó el entrenamiento y la evaluación consistió en una caja de madera de 75 cm x 75 cm x 40 cm de altura. El piso, de tipo vinílico y de color gris, estaba dividido en 25 cuadrados de 15 cm X 15 cm. Las paredes, funcionaban como claves visuales: dos de las mismas, enfrentadas, eran de color gris liso –distinto del piso–; y de las adyacentes a estas, una presentaba líneas horizontales, y la otra, líneas verticales; ambas pintadas en gris claro y negro (Figura 8A).

Para este ensayo se realizó un protocolo de sesión única, donde cada animal fue colocado individualmente en la arena enfrentado a una de las paredes para evitar que observe el CA antes de iniciada la sesión. Durante 5 minutos se le permitió explorar libremente el espacio y, una vez transcurrido dicho tiempo, cada animal fue devuelto a su jaula original con alimento y agua donde permaneció hasta la siguiente tarea. La posición de inicio se alternó entre los animales de experimentación para evitar posibles influencias visuales o espaciales del entorno.

La sesión fue grabada para analizar el comportamiento, registrando los siguientes parámetros exploratorios:

- Cruces: El animal realiza un cruce cada vez que atraviesa con las cuatro patas alguna de las líneas divisorias de los cuadrados en el piso. El número total de cruces durante el tiempo total de la prueba permite obtener una valoración de la actividad exploratoria y locomotora del individuo.
- Tiempo en el centro: se definió un cuadrante central que cubre el 36% de la arena (9 cuadrados centrales) para poder delimitar el centro y la periferia de la misma (Figura 8B). De esta manera se analizó el tiempo que el animal permaneció en cada una de las zonas, pudiendo de este modo realizar una valoración completa de la actividad exploratoria horizontal y de la actividad locomotora de los animales. Se describe que aquellos animales que tienden a pasar mayor tiempo en el centro que en la periferia, presentan un comportamiento simil-ansioso.
- Elevaciones: Este tipo de comportamiento se visualiza como una postura bípeda, donde el animal se levanta sobre sus patas traseras y olfatea el aire circundante, pudiendo estar, o no, apoyado con sus extremidades anteriores sobre las paredes de la arena. El número de dichas elevaciones permite obtener una valoración de la exploración vertical del espacio.

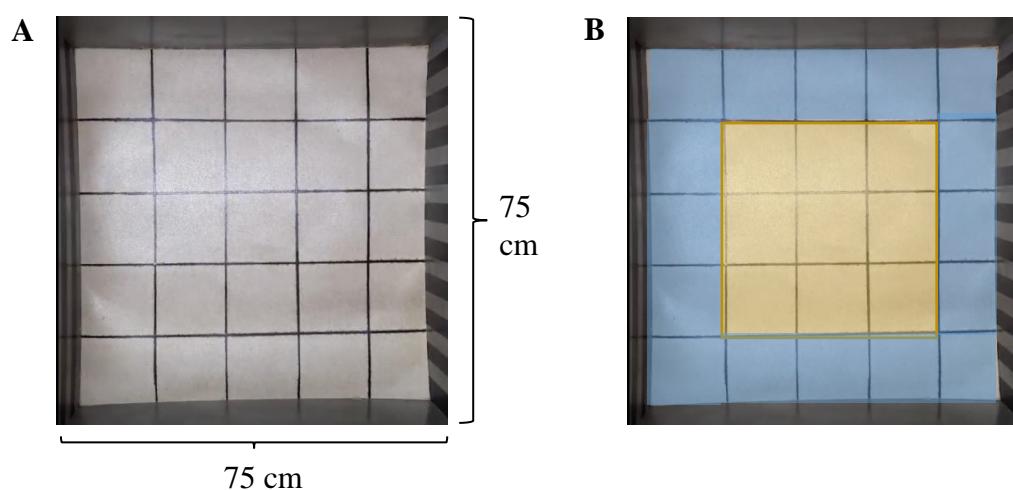


Figura 8. Arena de prueba para el OF. A. Campo abierto utilizado durante el ensayo, donde se indican las medidas de la caja utilizada como arena de prueba. B. Definición periferia-centro. En amarillo se resalta la zona considerada como “centro”, mientras que en azul se indica la “periferia” de la arena.

➤ *Object Location o Ensayo de Localización de Objetos (OL)*

Este tipo de ensayo sirve para evaluar la memoria espacial, la cual es dependiente del hipocampo. Se basa en la preferencia intrínseca de un animal por la novedad, la cual depende de la posición de los objetos a utilizar durante la prueba. Durante el ensayo, se presenta un objeto que se encuentra en una posición novedosa frente a otro colocado en una posición conocida, siendo los objetos completamente iguales (Vogel-Ciernia y Wood, 2014). La prueba comienza con la habituación del animal a la arena donde se llevará a cabo la tarea. En una sesión posterior, se le permite investigar 2 objetos idénticos en relación con señales ambientales espaciales (sesión de entrenamiento). Finalmente, en la sesión de testeо, uno de los objetos se mueve a una posición novedosa y se vuelve a introducir al animal en la arena para que explore libremente ambos objetos. Los roedores sanos, pasan mayor tiempo investigando el objeto que sufrió un cambio de posición (criterio de aprendizaje). Los animales con lesiones en el hipocampo poseen alteraciones en la adquisición de memorias espaciales lo que se refleja en un aprendizaje contextual espacial deteriorado y, en consecuencia, no muestran preferencia por la nueva ubicación de los objetos (Ammassari-Teule and Passino, 1997).

En nuestro caso, el ensayo se llevó a cabo en la arena previamente descripta y empleada para la prueba de CA. El protocolo consistió en cuatro sesiones: 2 de habituación, una de entrenamiento y una de testeо; separadas por 24hs cada una. La fase de habituación se realizó durante dos días consecutivos en los que se les permitió a los animales de prueba explorar libremente la arena durante 10 minutos, sin la presencia de los objetos. Durante la fase de entrenamiento, 24 hs después de la segunda sesión de habituación, dos objetos idénticos y novedosos fueron colocados en la arena y se permitió a los animales explorar la arena y los objetos durante 5 minutos (Figura 9A y sección resultados, pág. 31, Figura 16). Inmediatamente después, los animales fueron devueltos a sus jaulas y, al día siguiente, se realizó la sesión de testeо. En esta, uno de los objetos mantuvo su posición original (A) mientras que el otro se colocó en una posición novedosa (A') (Figura 9B), y nuevamente se dejó al animal de prueba explorar el ambiente durante 5 minutos.

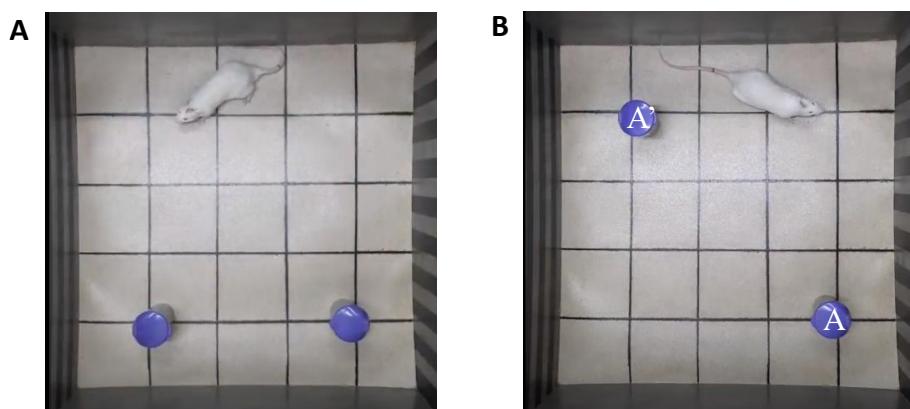


Figura 9. Distribución de los objetos en la arena de prueba en la tarea de OL. A. Posición de los objetos en la sesión de entrenamiento. B. Posición de los objetos en la sesión de testeо.

Todas las sesiones fueron grabadas para su posterior análisis. Durante la fase de entrenamiento y de testeо se registraron los siguientes parámetros: tiempo de exploración, número de aproximaciones para cada objeto, objeto con el que presentan la primera interacción y tiempo (latencia) en el que esto sucede. Se consideró que el animal estaba explorando un objeto cuando su cabeza apuntaba y estaba a menos de 2 cm del objeto o cuando olfateaba o interaccionaba físicamente con el mismo.

Para cada sesión, se calculó el promedio del tiempo de exploración de cada objeto y con estos valores se calculó un índice de discriminación (ID) en la fase de testeо (Acutain et al., 2021):

$$ID = \frac{\text{Tiempo de exploración } A' - \text{Tiempo de exploración } A}{\text{Tiempo de exploración } A + \text{Tiempo de exploración } A'}$$

Como objetos se utilizaron 2 vasos plásticos cónicos llenos de cemento para evitar que los animales pudieran moverlos de las posiciones respectivas a cada sesión. Estos habían sido probados previamente con otro grupo de animales para descartar la existencia de alguna preferencia por los mismos. El CA y los objetos se limpian con etanol 70% luego de cada sesión para eliminar marcas olfativas. Para neutralizar la influencia de posibles preferencias de lugar, para cada animal, el par de objetos fue colocado en distintas posiciones dentro del campo abierto. Además, la posición del objeto novedoso fue intercambiada entre izquierda y derecha aleatoriamente.

➤ *Evaluación de interacción social (IS)*

El comportamiento social es un concepto amplio que abarca muchos tipos de interacciones entre individuos de la misma especie. Entre ellas, la capacidad de aprender y recordar a congéneres específicos es fundamental para la estabilidad de los grupos sociales. Por esta razón, es de gran importancia comprender las variables que influyen en la memoria de reconocimiento social, la cual se basa en la capacidad de diferenciar entre individuos familiares y novedosos (Engelmann et al. 1995; Thor y Holloway 1982). En roedores, algunos trabajos han demostrado que este tipo de memoria depende de la integridad del hipocampo (Stevenson and Caldwell, 2014; Okuyama et al. 2016), y que es afectada por la alteración de los niveles de RNMDA (Finlay et al., 2015). Por esto, decidimos evaluar si la disminución en la expresión de GluN2A en esta región, produce cambios en la interacción social y en la capacidad de diferenciación entre animales novedosos y conocidos. Para esto, se realizó la prueba del paradigma de tres cámaras (Yang et al. 2011) en una versión adaptada (Habif et al; 2020). La prueba se llevó a cabo en un campo abierto (CA) de 50 × 50 × 39 cm con paredes de madera contrachapada negra y un piso dividido por líneas blancas en

nueve cuadrados. (Figura 10A). Una hora antes de comenzar con el ensayo, se aisló cada rata experimental (rata E) de sus compañeros de camada en jaulas individuales con agua y comida *ad libitum*. La prueba se llevó a cabo durante un único día en el cual se realizaron cuatro sesiones, una a continuación de la otra: Habitación al CA - Habitación al ambiente – Sesión Objeto-Animal (O-N) – Sesión Animal Conocido-Animal Novedoso (N-N') (ver resultados, pág. 41, figura 18). En la primera sesión de habitación, se colocó a la rata E en el CA y se le permitió explorar libremente durante 5 minutos antes de ser devuelta a su jaula individual. Previo a comenzar con la segunda sesión de habitación, se limpió el CA con Etanol 70% y se colocaron en dos de las esquinas de uno de los lados del CA, 2 jaulas idénticas (Figura 10B). Se le permitió a la rata E explorar durante 5 minutos el ambiente modificado y luego fue devuelta a su jaula individual mientras se preparó la arena para la próxima sesión, limpiando con Etanol 70% el CA y cada una de las jaulas. En la sesión de reconocimiento O-N, una rata novedosa del mismo sexo y de menor edad (rata N) fue colocada en una de las jaulas y, un objeto de tamaño y color similar a la rata N, se colocó en la jaula restante. Se dejó a la rata E explorar la arena por otros 5 minutos, luego de los cuales fue devuelta a su jaula. En la sesión final, se le permitió a la rata E explorar la arena durante 5 minutos con la rata N conocida en la misma jaula que en la sesión O-N y un nuevo animal (rata N') en la jaula donde se encontraba el objeto previamente.

Todas las pruebas fueron grabadas para su posterior análisis donde se midió durante la sesión de reconocimiento: el tiempo que la rata E pasó explorando al animal N y al objeto. Por otro lado, durante la sesión de testeo: el tiempo de exploración del animal N y el N'.

El índice de discriminación (ID) relativo a la exploración de la rata N frente al objeto o la rata N frente a la rata N' se calculó de la siguiente manera:

$$ID = \frac{\text{Tiempo de exploración rata N} - \text{Tiempo de exploración del objeto}}{\text{Tiempo de exploración rata N} + \text{Tiempo de exploración del objeto}}$$

$$ID = \frac{\text{Tiempo de exploración rata N}' - \text{Tiempo de exploración de la rata N}}{\text{Tiempo de exploración rata N}' + \text{Tiempo de exploración de la rata N}}$$

Las esquinas donde se colocaron las jaulas, el objeto y los animales novedosos se fueron rotando entre ratas E para evitar la influencia del contexto. Además, tanto la rata N como la N' fueron previamente habituadas a las jaulas utilizadas durante el ensayo para disminuir el estrés debido al espacio reducido. La jaula donde las ratas N y el objeto fueron colocadas, se rotaron entre cada animal para prevenir influencias del entorno. Además, entre sesiones y animales experimentales, se limpió el área de prueba con alcohol 70% para eliminar marcas olfativas.

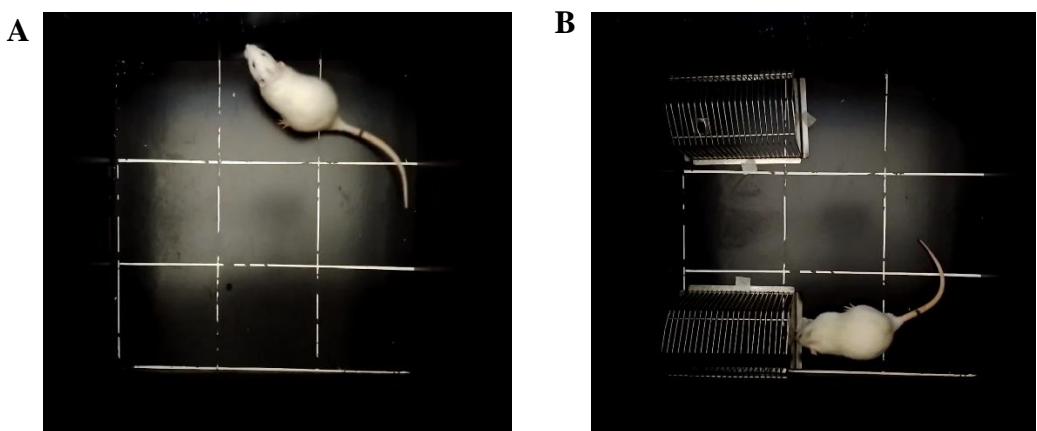


Figura 10. Ensayo de comportamiento social. A. Arena donde se realizó el ensayo. B. Posición de las jaulas utilizadas durante el ensayo, durante la sesión de Habitación 2.

➤ *Barnes Maze o Laberinto Barnes Directo e Inverso*

El Laberinto de Barnes es una importante herramienta utilizada para evaluar el aprendizaje espacial complejo en modelos murinos. Consiste en una plataforma circular elevada de 1,2m de diámetro con 20 orificios ubicados en la periferia de la circunferencia los cuales se encuentran bloqueados, salvo por uno que conduce a una caja de escape (orificio de escape). La plataforma se coloca en una habitación con señales visuales específicas y luz directa sobre la misma. La prueba se basa en la preferencia natural de los roedores por los espacios cerrados y oscuros por sobre las áreas abiertas y luminosas. El sujeto experimental es colocado en el centro de la plataforma, donde explorará el espacio en busca de la cámara de escape (Gawel et al., 2019; Harrison et al., 2006). La prueba del Laberinto de Barnes directo se lleva a cabo durante varias sesiones. En la primera se le indica al animal donde se encuentra el orificio de escape. En las sesiones siguientes, se lo deja explorar libremente la plataforma hasta que logre localizar el orificio de salida. Después de varias sesiones de entrenamiento (establecidas previamente), los roedores suelen recordar cuál de los orificios posee la cámara de escape y se reduce el tiempo en el que el sujeto experimental encuentra el mismo. Finalmente, en la sesión de testeo, todos los orificios se bloquean (inclusivo el de escape) y se le permite al animal explorar la superficie libremente durante 5 minutos. El criterio de aprendizaje se logra si el animal pasa un mayor tiempo explorando el cuadrante correspondiente al orificio de salida. Esto brinda indicios de una memoria sana y un correcto aprendizaje de la tarea.

En complementación con este ensayo, se puede realizar el Laberinto de Barnes inverso en el que, luego de realizar la prueba directa, se rota el orificio de salida a 180º de la posición original y se repite la metodología aplicada en el protocolo directo. Esto

permite evaluar la flexibilidad cognitiva en el aprendizaje de la nueva ubicación (Paul et al. 2009; Stalnaker et al. 2009).

En el presente estudio se utilizó una plataforma octogonal negra (0,6 m del centro a cada vértice), que contenía 20 orificios distribuidos de manera uniforme en su periferia, separados cada uno por 5 cm. Debajo de los mismos contábamos con placas negras de madera removibles (Figura 11A).

El ensayo del Laberinto de Barnes directo se divide en tres fases principales: habituación, entrenamiento y testeо. Antes de comenzar con las sesiones de entrenamiento, las ratas se habituaron a la caja de escape y se realizó una primera sesión para indicarle a cada animal donde estaba el orificio de escape. La fase de entrenamiento se llevó a cabo durante cuatro días consecutivos. Al inicio de cada sesión (una por día), ubicamos al animal en el centro de la plataforma y lo cubrimos con una caja de 36X19x24 cm durante 10 segundos (para evitar que observe el entorno antes de comenzar con el tiempo de la prueba). Posteriormente, levantamos la caja y permitimos que la rata explore libremente hasta encontrar el orificio de escape o hasta que se cumplan 5 minutos. En el día cinco, para la fase de testeо, cubrimos el orificio de escape con la placa de madera respectiva y permitimos que cada rata recorra durante 5 minutos la plataforma. Inmediatamente después de finalizada la prueba directa, en el sexto día, se comenzó con el ensayo del Laberinto de Barnes inverso. La metodología fue la misma utilizada para la prueba de Barnes directo, con la diferencia de que no se realizó la sesión de habituación y el orificio de escape se colocó del lado opuesto, a 180º de la posición original. El resto de las sesiones (entrenamiento y testeо) se llevaron a cabo repitiendo el protocolo del Barnes directo, explicado anteriormente.

Entre los distintos animales se rotó el orificio de escape para neutralizar la influencia de posibles preferencias en el espacio donde se llevó a cabo la prueba. Además, la plataforma y la caja de escape se limpiaron con etanol 70% luego de cada sesión para eliminar marcas olfativas.

En este paradigma, todas las pruebas fueron grabadas para su posterior análisis. En las sesiones de entrenamiento se midió el tiempo hasta encontrar el orificio de salida y el número de orificios con los que el animal interaccionaba hasta encontrar el de escape, a los cuales se los indicó como “errores”. Para el análisis del testeо, se dividió la plataforma en 4 cuadrantes (Figura 11B) y se midió el tiempo que pasaban en cada uno.

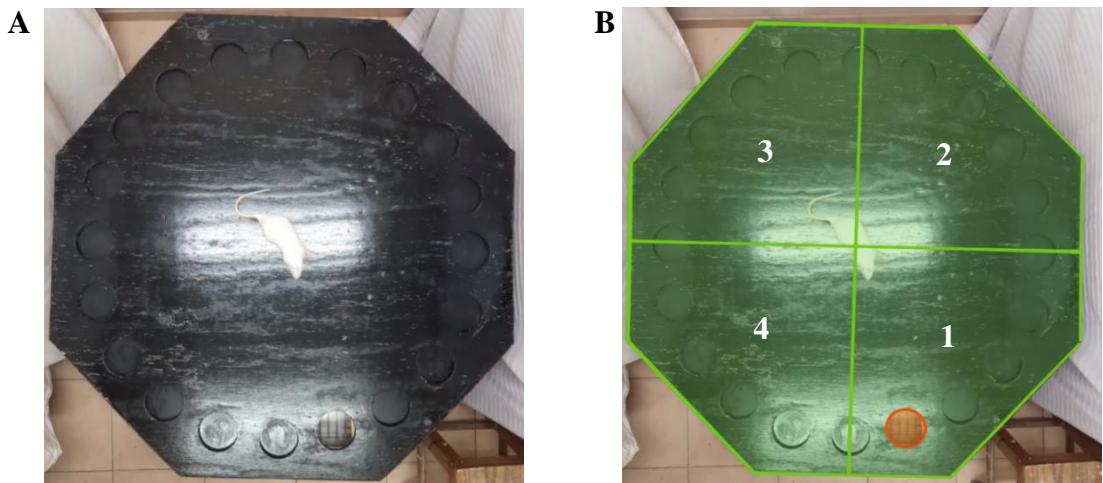


Figura 11. Laberinto Barnes. A. Plataforma octogonal utilizada durante el ensayo. B. Definición de los cuadrantes (en verde) utilizados para el análisis de la prueba de testeо. El número 1 es el que contiene el orificio de escape indicado con el círculo rojo, siendo los cuadrantes adyacentes los enumerados como 2 y 4, y el número 3 como el opuesto de salida.

➤ Y-Maze

El laberinto en forma de “Y” es una prueba de comportamiento que se utiliza para evaluar la memoria de trabajo espacial en roedores, la cual permite medir la capacidad para explorar nuevos entornos. La prueba se lleva a cabo en un laberinto en forma de Y que presenta un brazo de salida y dos idénticos de meta (izquierdo y derecho). En un principio, se bloquea la entrada a uno de los brazos de meta y se le permite al animal explorar el restante y el de salida libremente. La función de memoria del animal se prueba cuando se lo devuelve al laberinto con todos los brazos abiertos. Un roedor con memoria de trabajo intacta recordará los brazos visitados anteriormente y mostrará una tendencia a entrar en el brazo novedoso con mayor frecuencia (Kraeuter et. al 2019). Esta prueba es particularmente útil como prueba inicial de la función de la memoria de trabajo en roedores. Se conoce que varias regiones del cerebro, incluido el hipocampo, el tabique, el prosencéfalo basal y la corteza prefrontal, están involucradas en esta tarea (Kirby et. al 1967; Divac et. al 1975; Johnson et. al 1977).

En nuestro caso utilizamos un laberinto acrílico blanco en forma de Y. Cada brazo del laberinto tenía 27 cm de largo y 10 cm de ancho, con paredes de 40 cm de alto, impidiendo que el animal visualice cualquier señal externa. Todos los brazos contaban con puertas de guillotina para facilitar el cierre o apertura de los mismos, según correspondiera (Figura 12A).

La prueba consistió en 2 sesiones seguidas, realizadas durante el mismo día. En la primera, el animal fue puesto en el brazo de salida, se bloqueó uno de los brazos con las puertas de guillotina y se le permitió explorar libremente los dos restantes durante 3 minutos. Luego, se retiró al sujeto experimental del laberinto, se limpió el mismo y se

prosiguió con la segunda sesión. En esta, todos los brazos estaban disponibles por lo que cada rata exploró libremente los tres brazos durante 3 minutos. Al igual que en las pruebas anteriores, entre los distintos animales se definió el brazo novedoso de forma alternada para neutralizar la influencia de posibles preferencias en el espacio donde se llevó a cabo la prueba. Además, el laberinto en Y se limpió con etanol 70% luego de cada sesión para eliminar marcas olfativas.

Todas las pruebas fueron grabadas para su posterior análisis. En cada una, se midió el tiempo de permanencia en cada uno de los brazos (Salida - Conocido – Novedoso) y el número de veces que los animales ingresaban a cada uno de los mismos. Se consideró como “entrada” cuando el animal pasaba la mitad de su cuerpo por la línea de referencia. El mismo parámetro se utilizó para definir cuando salía del brazo. Con esta información se calculó el porcentaje de exploración y la preferencia por los brazos individuales para la sesión de testeо. A su vez, tanto para el entrenamiento como para el testeо, se calculó la preferencia entre brazos.

$$\% \text{ de Exploración} = \frac{\text{Tiempo de exploración brazo Salida/Conocido/Novedoso}}{\text{Tiempo total de la sesión}}$$

$$\frac{ID}{\text{Entrenamiento}} = \frac{T' \text{ brazo meta} - T' \text{ brazo de Salida}}{\text{Tiempo total de la sesión}}$$

$$\frac{ID}{\text{Testeo}} = \frac{T' \text{ brazo Novedoso} - T' \text{ brazo Conocido}}{\text{Tiempo total de la sesión}}$$

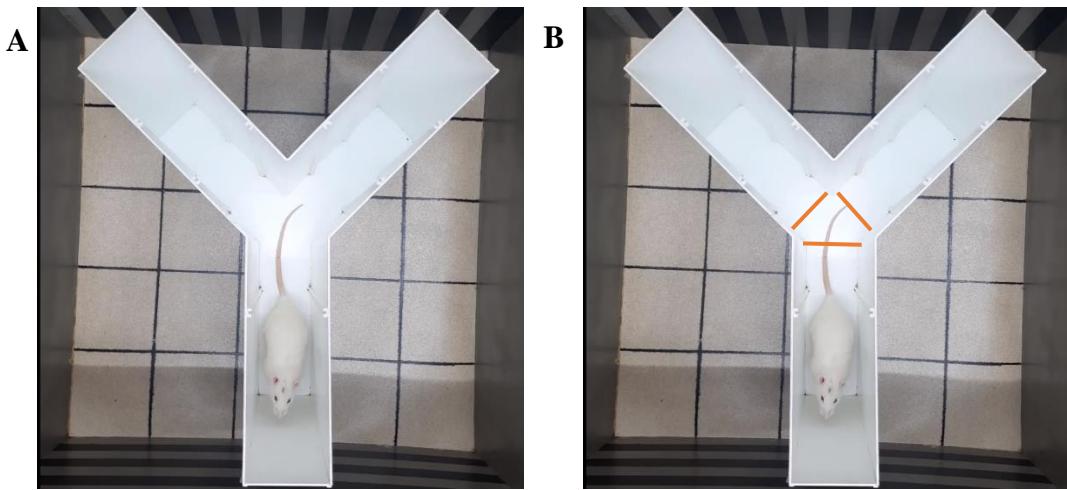


Figura 12. Laberinto en Y. A. Laberinto utilizado durante el ensayo B. Se indican en naranja las líneas de referencia utilizadas para definir la entrada y salida a los brazos.

Después de pasar por la batería de pruebas comportamentales, los animales fueron perfundidos con una solución de paraformaldehído al 4% (PFA4%) en *buffer* fosfato salino 1X (PBS 1X) para fijar el tejido. Los cerebros fueron disecados y se colocaron en PFA 4% a 4 ° C durante 3 horas. A continuación, las muestras se colocaron en una solución de 30% Sacarosa en *buffer* fosfato (PB) 0.1M a 4 ° C hasta que se sumergieron completamente (aproximadamente entre 3 y 5 días). Finalmente, se conservaron a -80° hasta su posterior utilización.

PARTE II: Procesamiento de Muestras

Inmunofluorescencia

Una vez fijados, los cerebros se cortaron mediante criostato (Leica CM1850) en rodajas de 20 a 30 μm de espesor que fueron conservadas de manera seriada en solución criopreservadora (Etilenglicol 30%, Glicerol 20% en PBS 1X) en una placa multipocillo de 24 pocillos (MW24), colocando 3 rodajas por pocillo. Las muestras obtenidas se preservaron hasta su utilización a -20°C. Para la inmunofluorescencia, se seleccionaron las rodajas correspondientes a 3 alturas diferentes del hipocampo según las coordenadas del Atlas Paxinos & Watson (Figura 13) y se lavaron en PBS 1X. Las mismas correspondían al sitio de inyección (SI, aproximadamente -4,00 mm desde el Bregma), una rodaja a 1 mm del SI hacia anterior y una hacia posterior (-1 y +1 respectivamente) (Figura 13).

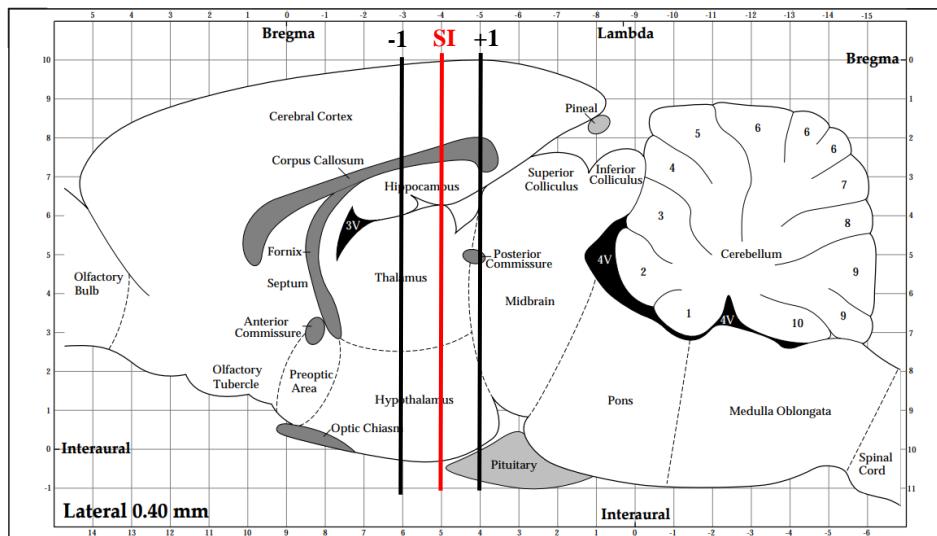


Figura 13. Alturas de las rodajas seleccionadas para el análisis de inmunofluorescencia. SI (rojo): altura del sitio de inyección. -1 (negro): un milímetro hacia la región anterior del cerebro desde el SI. +1 (negro): un milímetro hacia la región posterior del cerebro desde el SI. Imagen adaptada de Atlas Paxinos & Watson, 2003.

Luego, se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos junto con la permeabilización de las membranas, con una solución de PBS 1X conteniendo 0,5% de Tritón X-100 y 5% de suero normal de cabra decomplementado, durante 2 horas, en agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 1X y las rodajas se incubaron con el anticuerpo primario diluido en PBS 1X conteniendo 0,25% de Tritón X-100 y 2,5% de suero normal de cabra a 4°C, *over night* (ON), en agitación suave. Al día siguiente, se lavaron las muestras con PBS 1X (tres lavados de 10 minutos cada uno) y se incubaron con el anticuerpo secundario diluido de la misma manera que los primarios, durante 2 horas a temperatura ambiente, en agitación suave y en oscuridad. Luego, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS 1X y las rodajas se incubaron con una dilución de Hoescht (1:5000) en PBS 1X. Despues de realizar los lavados en PBS 1X, se colocaron las rodajas en un portaobjetos para su secado y por último se realizó el montaje con Mowiol 4-88 y se cubrió con el cubreobjetos correspondiente. En los ensayos realizados se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- Anti-GluN2A polyclonal de ratón (1:200) (Cell Signalling, Nro. catálogo 4205S).
- Anti-eGFP monoclonal de ratón (1:400) (Hibrydome Bank, Nro. catálogo 126A6)
- Anti-conejo A647 (1:2500) (Jackson InmunoResearch 111-606-003)
- Anti-ratón A488 (1:2500) (Jackson InmunoResearch 111-545-003).

Análisis de imágenes

Los preparados se observaron mediante microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX83) utilizando los filtros correspondientes. En el mismo se tomaron imágenes a un aumento de 20X para su posterior análisis.

Para cada hipocampo correspondiente a las alturas mencionadas, se analizaron 4 regiones específicas de esta estructura: CA1, CA2, CA3 y giro dentado (GD). Asimismo, para cada región se realizó un análisis de las subáreas correspondientes: PYR (zona de los somas de las neuronas piramidales), SO (Stratum Oriente) y SR (Stratum Radiatum) para CA1, CA2 y CA3; y PoDG (capa polimórfica del giro dentado) y MoDG (capa molecular del giro dentado) para GD (Figura 14).

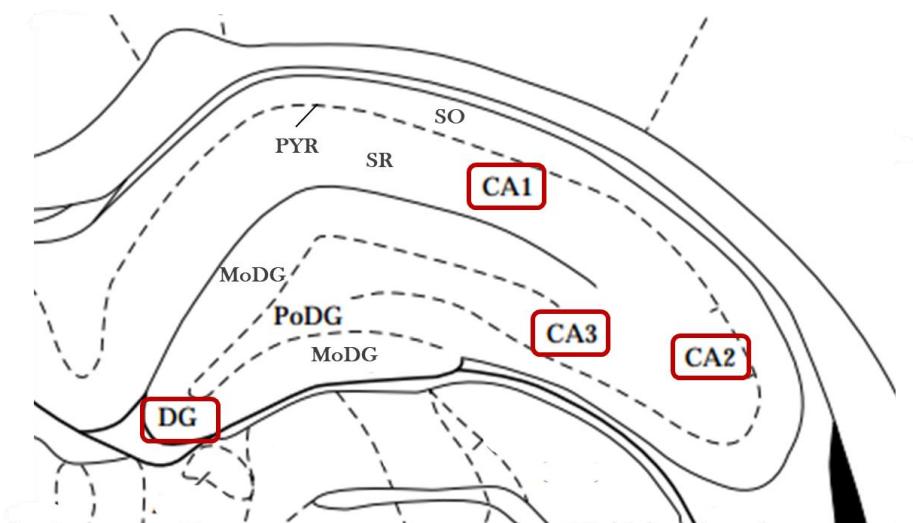


Figura 14. Estructura y regiones del Hipocampo. División de las subáreas dentro de las distintas regiones del hipocampo. Para las regiones de CA1, CA2 y CA3 se indican las áreas PYR (zona de los somas de las neuronas piramidales), SO (Stratum Oriente) y SR (Stratum Radiatum). Para GD se indican las zonas PoDG (capa polimórfica del giro dentado) y MoDG (capa molecular del giro dentado). Adaptado de Atlas Paxinos (Paxinos et al., 2006)

En cada región, se obtuvieron imágenes de los campos en los cuales se observaron neuronas eGFP positivas (aproximadamente 5 campos por región) y, mediante el uso del software ImageJ, se seleccionaron los somas de estas células. En los mismos, se midió el área y la intensidad de fluorescencia promedio (IF) para cada anticuerpo utilizado. Con esta información se calculó la relación entre la IF de GluN2A y la IF de eGFP para corroborar la efectividad de los vectores AAV.

Análisis

estadístico

Para todas las variables obtenidas, primero se verificó la distribución mediante el test de Normalidad y Log-normalidad. Los datos paramétricos, provenientes de variables cuantitativas que se distribuyen normalmente, se expresaron como MEDIA + EEM (error estándar medio). En los casos donde se compararon dos grupos o variables de muestras dependientes o independientes se utilizó el test t de Student. Mientras que para las comparaciones entre más de dos variables se realizó un Análisis de Varianza de dos vías (ANOVA), seguido por un test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls o de Dunnet. Por otra parte, los datos no paramétricos provenientes de variables cuantitativas que no seguían una distribución normal, cuya distribución era asimétrica y-o, con valores discretos, se expresaron como MEDIANA y rango. En este caso, cuando se compararon dos grupos, se utilizó una prueba de Mann Whitney para muestras independientes, o prueba de Wilcoxon para muestras pareadas.

En caso que no se cumpliera la normalidad de las variables y cuando se analizaron más de dos variables, se empleó Análisis de dos Varianzas con test de Kruskal-Wallis para muestras independientes, o de Friedman para muestras pareadas, seguido por test de comparaciones múltiples de Dunn. Para los Índices de Discriminación (ID), además de realizar una prueba t de Student, se llevó a cabo una prueba t de una única muestra que permite comparar las medias obtenidas con un valor medio hipotético. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el programa Graphpad Prism 9.

Resultados

PARTE I: Ensayos de comportamiento.

Memoria y aprendizaje en ratas GluN2A-KD.

La correcta expresión en tiempo y espacio de GluN2A juega un rol fundamental en los procesos de plasticidad y memoria. Sin embargo, existen evidencias contradictorias en cuanto a la disminución de la expresión de esta subunidad y el efecto en los procesos mencionados (Acutain et al., 2021; Bannerman, 2008; Bannerman et al., 2008; Kiyama et al., 1998; Sprengel et al., 1998). Considerando tales antecedentes, en este trabajo se evaluó si el silenciamiento de GluN2A en el hipocampo de rata luego del *switch* del desarrollo, afecta la adquisición de nuevos aprendizajes y la memoria espacial. Para esto se utilizó un modelo de ratas KD empleado en estudios previos del laboratorio (Acutain et al., 2021). Inicialmente, se inyectaron los vectores AAV-shSC (animales control) o AVV-sh2A (GluN2A-KD) bilateralmente en la región CA1 del hipocampo de ratas Wistar macho adultos, mediante cirugía estereotáctica. A los 15 DPIs, ambos grupos de animales fueron expuestos a una batería de ensayos de comportamiento (ver Materiales y Métodos, pág. 18, figura 7) que involucran principalmente al hipocampo en las etapas de adquisición y consolidación de la memoria.

- ENSAYO DE CAMPO ABIERTO

La prueba de campo abierto es una prueba sencilla que permite evaluar comportamientos estereotipados de roedores. En este trabajo, el ensayo se llevó a cabo para corroborar que la expresión de los vectores no introduzca modificaciones en la locomoción y el patrón normal exploratorio de los animales (Prut and Belzung, 2003; Cercato et al., 2017).

Durante esta prueba, se expuso a los animales a una arena novedosa y se les permitió explorar libremente el espacio por 5 minutos. Posteriormente, se analizó el número total de cruces en la grilla dibujada en el piso del espacio novedoso (medida de locomoción), así como el tiempo que los animales pasaban en la periferia y el centro del mismo (evaluación de comportamiento símil ansioso) (Figura 15A y B). Ambos grupos de estudio presentaron un patrón de exploración horizontal similar y, el posterior análisis estadístico demostró que no existen diferencias significativas en el número de cruces entre el grupo de animales control y el grupo de animales GluN2A-KD (Figura 15A). Por otro lado, ambos grupos, control y GluN2A-KD, presentaron un número de elevaciones similar (Figura 15C), por lo que tampoco se vería alterada la exploración vertical cuando la expresión de GluN2A se encuentra disminuida. Además, no observamos cambios en el tiempo de exploración en el centro y la periferia, lo cual sugeriría que los animales GluN2A-KD no presentan conductas simil-ansiosas significativamente distintas que los controles (Figura 15B).

Estos resultados indicarían que, el silenciamiento de la subunidad GluN2A en el hipocampo, no afecta la capacidad exploratoria ni la locomoción en el modelo evaluado, ni induce comportamientos simil-ansiosos.

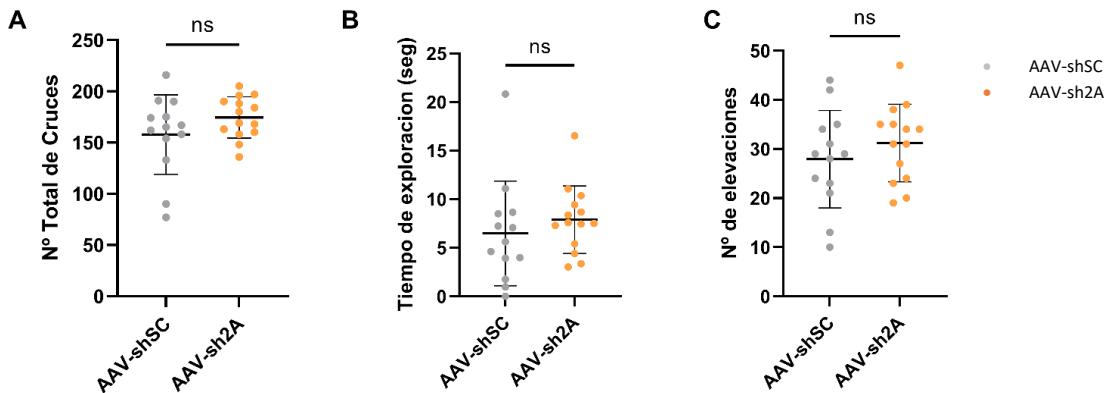


Figura 15. La disminución de la expresión de GluN2A en el hipocampo, no afecta la capacidad exploratoria ni la locomoción en ratas. Para ambos grupos, animales control (gris) y animales GluN2A-KD (naranja), se evaluó: **A.** Número total de cruces. **B.** Tiempo de exploración en el centro de la arena. Prueba T de Student (ns $p = 0,4228$). **C.** Número de elevaciones. Prueba T de Student (ns $p = 0,3485$). No se observaron diferencias significativas para ninguna de las tres variables mencionadas entre los grupos analizados durante el ensayo de CA. n = 14 animales por grupo.

- ENSAYO DE LOCALIZACION DE OBJETOS

En un trabajo anterior se observó que la disminución de la expresión de GluN2A induce un déficit en la consolidación de una memoria de miedo relacionada con contexto, pero no en el paradigma de reconocimiento de objetos novedosos (Acutain et al, 2021). Por lo que, en la presente tesis, se evaluó un paradigma de memoria espacial de entrenamiento único en ratas GluN2A-KD y sus respectivos controles. Para esto, se expuso a ambos grupos de animales a una prueba de localización de objetos que permite evaluar la adquisición de una MLP de tipo espacial y la capacidad de discriminación entre posiciones espaciales (Figura 16). Este ensayo se realizó en 4 sesiones, separadas por 24 hs cada una. Las dos primeras correspondieron a la habituación de la arena donde se llevó a cabo el ensayo. Las mismas fueron seguidas de una sesión de entrenamiento donde se presentaron los objetos novedosos, y una última sesión de testeо, en donde se cambió la posición de uno de los objetos previamente presentados (Figura 16A). En las sesiones de entrenamiento y testeо, se contabilizó el tiempo que el animal exploraba cada uno de los objetos y el número de

veces que interactuaba con los mismos. A su vez, se calculó el ID indicado en la sección de materiales y métodos correspondiente a este trabajo (pág. 21).

Durante la sesión de entrenamiento, se observó que la exploración de ambos objetos fue similar en las ratas control y GluN2A-KD. Los animales de ambos grupos no presentaron diferencias significativas en el tiempo total de interacción con los objetos (Figura 16B). Además, el tiempo de exploración y el número de aproximaciones, no fue significativamente diferente entre el objeto de la derecha y el de la izquierda en los animales control y GluN2A-KD (Figura 16C). Esto indica que ambos grupos no presentan preferencia por una posición u objeto durante la fase de entrenamiento.

Durante el testeo, no se observaron diferencias significativas entre los grupos para el tiempo total de interacción con los objetos (Figura 16D). Al analizar cada grupo, las ratas control interaccionaron significativamente más tiempo con el objeto que se encontraba en una posición novedosa frente al que mantuvo su posición original, cumpliendo el criterio de aprendizaje (Figura 16E). Sin embargo, en los animales GluN2A-KD se observa una mayor dispersión de la población: algunos animales interaccionan más tiempo con el objeto en la posición conocida, otros con el objeto en la posición novedosa y otros pasan similar tiempo explorando ambas posiciones. Este mismo comportamiento se visualiza para el número de aproximaciones a cada localización (Figura 16E). Al comparar los ID obtenidos en el entrenamiento y el test, los animales inyectados con el vector AAV-shSC presentan una diferencia significativa entre el ID de la sesión de entrenamiento y de testeo lo que indicaría que el grupo control alcanzó el criterio de aprendizaje. En cambio, para el grupo GluN2A-KD, no se observa esta diferencia entre los ID de las sesiones de entrenamiento y testeo (Figura 16F). Los resultados, en conjunto, sugieren que la disminución en la expresión de la subunidad GluN2A en el hipocampo induciría un déficit en el paradigma de localización de objetos, sugiriendo que la memoria espacial de largo plazo estaría afectada en este modelo.

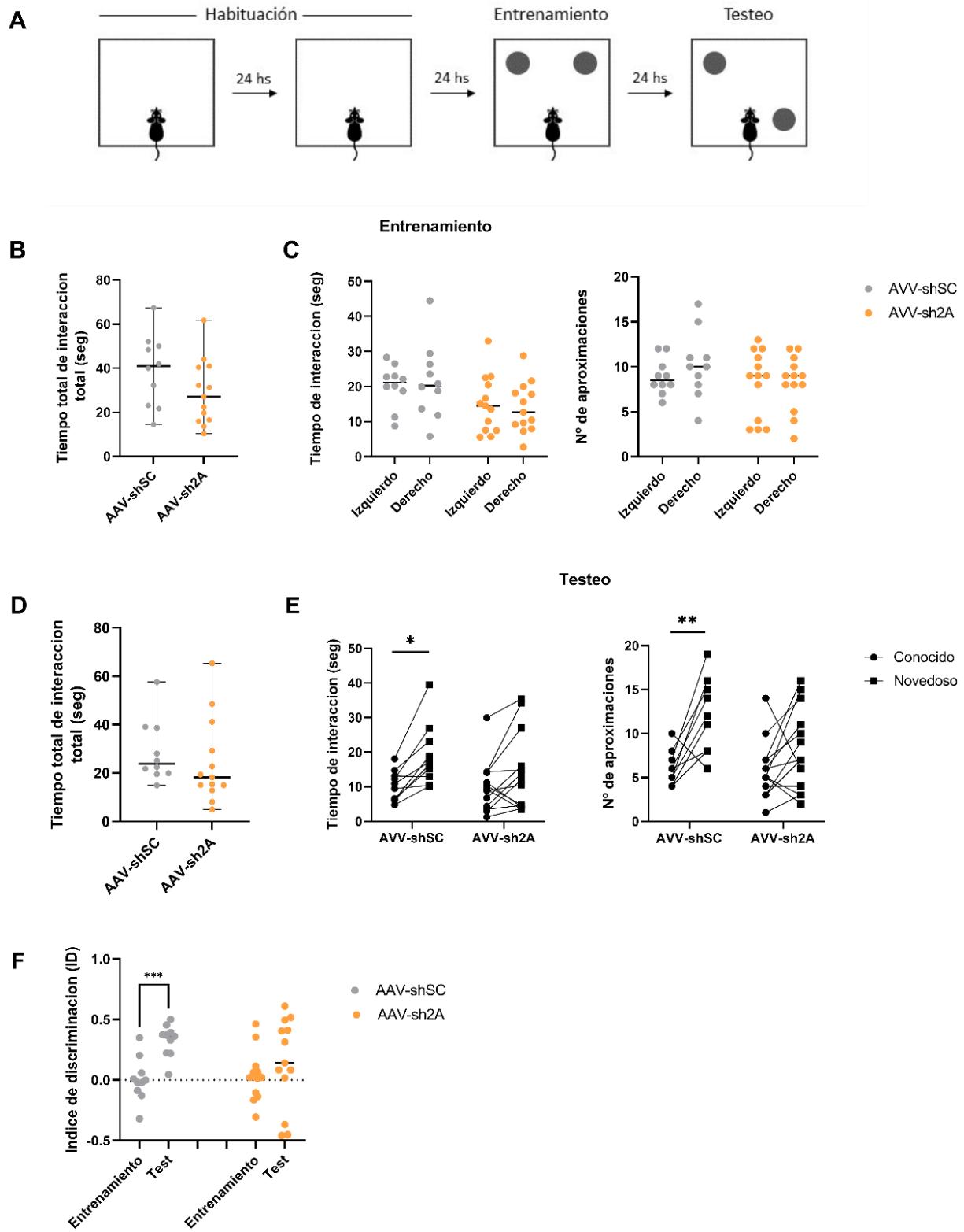


Figura 16. Evaluación de memoria espacial y criterio de aprendizaje en un paradigma de localización de objetos para animales control (puntos grises) y GluN2A-KD (puntos naranjas). A. Esquema utilizado para llevar a cabo el ensayo. B. Tiempo total de interacción durante la sesión de entrenamiento. C. Tiempo de interacción y número de aproximaciones a los objetos durante la sesión de entrenamiento. No se observa preferencia por la posición izquierda o derecha en ninguno de los dos grupos experimentales. D. Tiempo total de interacción con los objetos, durante el testeо. E. Tiempo de interacción y número de aproximaciones a los objetos durante la sesión de testeо para cada grupo. Los círculos indican la exploración del objeto en la posición familiar y los cuadrados la localización novedosa para cada animal dentro de cada grupo. Los animales control interactúan significativamente más tiempo y veces con el objeto que se encuentra en una posición novedosa. *Multiple Wilcoxon Test* ($**p = 0,004$) En los animales GluN2A-KD, no se observan diferencias significativas. *Multiple Wilcoxon Test* ($p = 0,094238$). F. ID para la sesión de entrenamiento y la sesión de testeо. Se observan diferencias significativas entre el ID del entrenamiento y del test para el grupo control ($***p = 0,0003$), pero no para el grupo GluN2A-KD ($p = 0,2035$). Mann – Whitney Test. $n= 10$ control, $n= 13$ GluN2A-KD.

- Y- MAZE

Debido a que Bannerman y col (2009) observaron un déficit en las memorias de trabajo en un modelo de GluN2A KO y teniendo en cuenta el déficit observado en la prueba de OL de esta tesis, decidimos realizar otros ensayos que permiten evaluar la memoria espacial y la memoria de trabajo. Para esto, los animales control y GluN2A-KD fueron expuestos a la prueba del “Laberinto en forma de Y”. En un mismo día, se llevaron a cabo dos sesiones consecutivas: Entrenamiento – Testeo. Durante la sesión de entrenamiento, se bloqueó la entrada a uno de los brazos del laberinto y se le permitió al sujeto experimental recorrer libremente los dos brazos restantes. En la sesión de testeо, se permitió el libre acceso a los tres brazos del laberinto para que el animal explorara por otros 3 minutos (Figura 17A). En ambas sesiones, se contabilizó el tiempo dentro de cada brazo y el número de entradas a los mismo y se calculó el ID para la preferencia de brazos (ver Materiales y Métodos pág. 27).

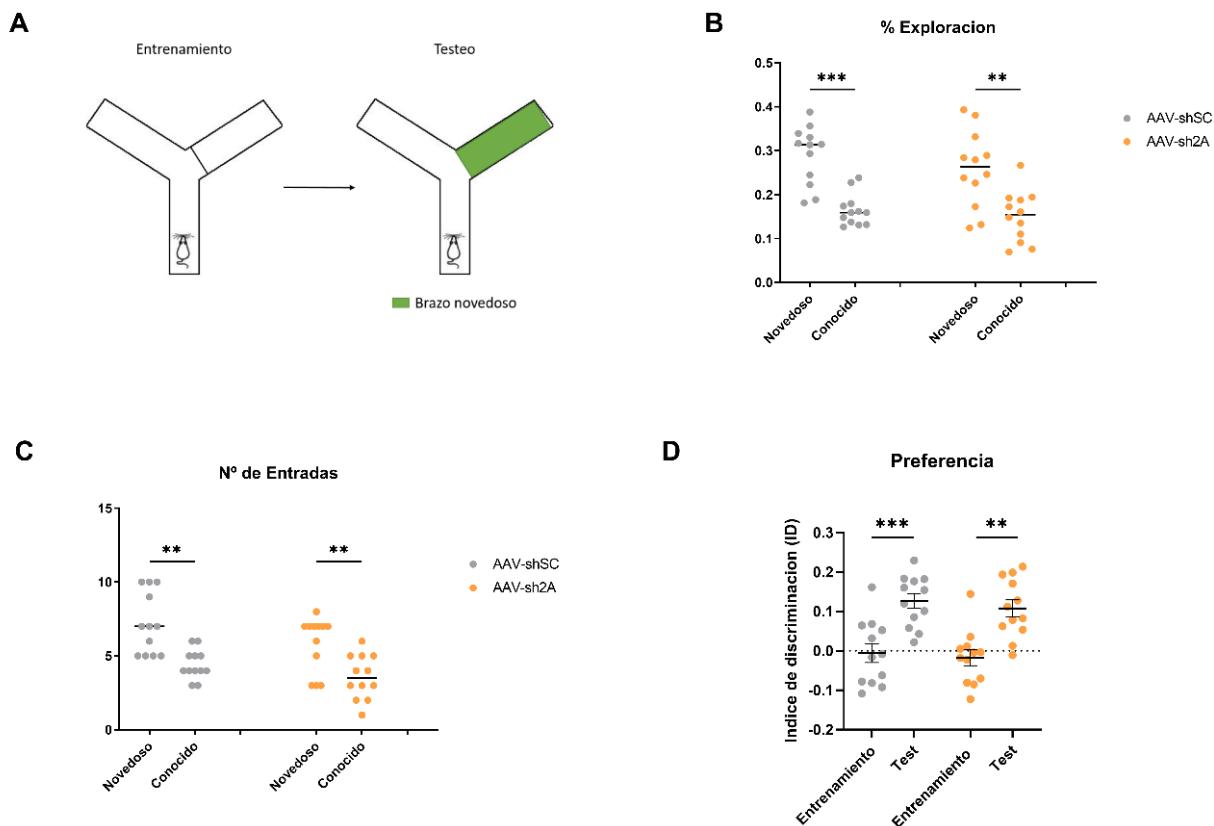


Figura 17. Evaluación de la memoria espacial a corto plazo. **A.** Esquema llevado a cabo para el ensayo del laberinto en forma de Y. **B.** Porcentaje de exploración durante el testeo para brazos individuales. Se observan diferencias significativas entre el brazo novedoso y el brazo conocido. ANOVA, test de comparaciones múltiples (AAV-shSC *** $p = 0,0001$; AAV-sh2A ** $p= 0,0010$). **C.** Número de entradas a brazos individuales durante el testeo. Ambos grupos ingresan significativamente más veces al brazo novedoso. ANOVA, test de comparaciones múltiples (AAV-shSC ** $p = 0,0011$; AAV-sh2A ** $p= 0,0094$). **D.** Preferencia entre brazos durante testeo y entrenamiento. En ambos grupos se observan diferencias significativas entre el ID de la sesión de entrenamiento y el obtenido durante el testeo. Prueba T de Student no pareada (AAV-shSC ** $p = 0,0003$; AAV-sh2A ** $p=0,0003$). n= 12 animales por grupo. Animales control (puntos grises), GluN2A-KD (puntos naranjas).

Contrario a lo esperado, los animales control y los GluN2A-KD mostraron un comportamiento similar a lo largo de la prueba. Ambos grupos de estudio no presentaron diferencias significativas en el número de entradas y el tiempo de permanencia en cada uno de los brazos. En el análisis posterior se observó que existen diferencias significativas para el porcentaje de exploración (Figura 17B) y el número de entradas (Figura 17C) entre el brazo novedoso y el brazo conocido. Este comportamiento se observa para los animales GluN2A-KD y los controles ya que no existen diferencias significativas entre los mismos para las variables previamente mencionadas. Tanto para los animales control como para los GluN2A-KD, el ID fue

significativamente mayor durante la sesión de testeo en comparación con el ID de la sesión de entrenamiento (Figura 17D), lo que indicaría que ambos grupos pasan una mayor cantidad de tiempo en el brazo novedoso que en el previamente conocido. Estos resultados indican que la disminución de la expresión de GluN2A en el hipocampo, luego del *switch* del desarrollo, no produce déficits en la discriminación entre un brazo previamente conocido y uno novedoso en el paradigma de Y - maze, por lo que la memoria de trabajo espacial no se vería afectada por el silenciamiento de dicha subunidad en este modelo.

- LABERINTO BARNES DIRECTO E INVERSO

Posteriormente, llevamos a cabo la tarea del laberinto de Barnes debido a que permite evaluar el aprendizaje espacial complejo y las deficiencias de memoria de este tipo en roedores. Las diferentes fases de la tarea permiten medir el aprendizaje espacial (Barnes directo) y la flexibilidad cognitiva (Barnes Inverso) (Gawel et al. 2019). La prueba consta de una plataforma circular en altura que posee una serie de orificios en su periferia, los cuales permiten al sujeto salir del laberinto a una caja de escape. El ensayo se basa en la preferencia innata de los roedores por los espacios oscuros y cerrados en lugar de las áreas abiertas y luminosas (Harrison et al. 2006).

Para comprobar si la disminución de la expresión de GluN2A en el hipocampo de ratas Wistar produce un déficit en el aprendizaje espacial complejo, expusimos a animales control y GluN2A-KD a la prueba del laberinto de Barnes directo (Figura 18) seguido por su versión inversa (Figura 19). La prueba constó de una fase de habituación, para mostrarle al animal donde se encuentra el agujero de salida; cuatro sesiones de entrenamiento, donde se midió el tiempo que transcurrió desde que el animal fue depositado en el centro de la plataforma hasta que encontró el agujero de salida previamente presentado (latencia de escape); y una sesión de testeo, durante la cual se bloquearon todos los orificios de la plataforma (incluyendo el de escape) y el animal exploró libremente la misma durante 5 minutos. Todas las sesiones se grabaron para su posterior análisis y, durante el testeo, se midió el tiempo que el animal paso en cada uno de los cuatro cuadrantes definidos en la arena.

Durante la prueba de Barnes Directo, no se observaron diferencias en el comportamiento entre los grupos de estudio. Tanto en los animales control como en los GluN2A-KD, se observa una disminución en la latencia de escape a lo largo de los días de entrenamiento, lo que sugeriría que ambos grupos presentan un comportamiento similar durante el aprendizaje complejo en este tipo de paradigmas. A partir del análisis de los videos, no se observaron diferencias significativas entre los animales injectados con el vector AAV-shSC y AAV-sh2A para el porcentaje de exploración (Figura 18A) y la distancia recorrida (Figura 18B) durante la versión directa de este paradigma. Asimismo, ambos grupos presentaron una disminución significativa en la latencia de escape entre el día 1 y el día 4, lo que indicaría que el silenciamiento de GluN2A no impide que los animales recuerden el agujero de salida a lo largo de las

sesiones de entrenamiento (Figura 18C). Durante el testeo, no se observaron diferencias para el factor vector, pero si para el factor cuadrantes. El tiempo de exploración de la zona 1 para las ratas control, donde se encontraba previamente el orificio de salida, fue significativamente mayor que el tiempo de exploración de las zonas restantes. Sin embargo, las ratas GluN2A-KD no mostraron diferencias significativas en el tiempo de exploración para las cuatro zonas analizadas, lo que indicaría que no existe preferencia por alguno de los cuadrantes de estudio. En ambos grupos se observa una tendencia a explorar menos tiempo la zona 3, correspondiente al cuadrante más alejado del agujero de salida, pero esta diferencia resultó estadísticamente no significativa (Figura 18E). Los resultados obtenidos durante la prueba de Barnes Directo indican que ambos grupos logran recordar la posición del orificio de escape en el transcurso de los días de entrenamiento, lo que sugeriría que la disminución en la expresión de GluN2A no afecta el aprendizaje en este tipo de paradigmas. Sin embargo, durante el testeo, no se presentan diferencias en el tiempo de exploración de zonas dentro del grupo GluN2A-KD, sugiriendo que el silenciamiento de la subunidad no permite diferenciar la zona 1 de las restantes.

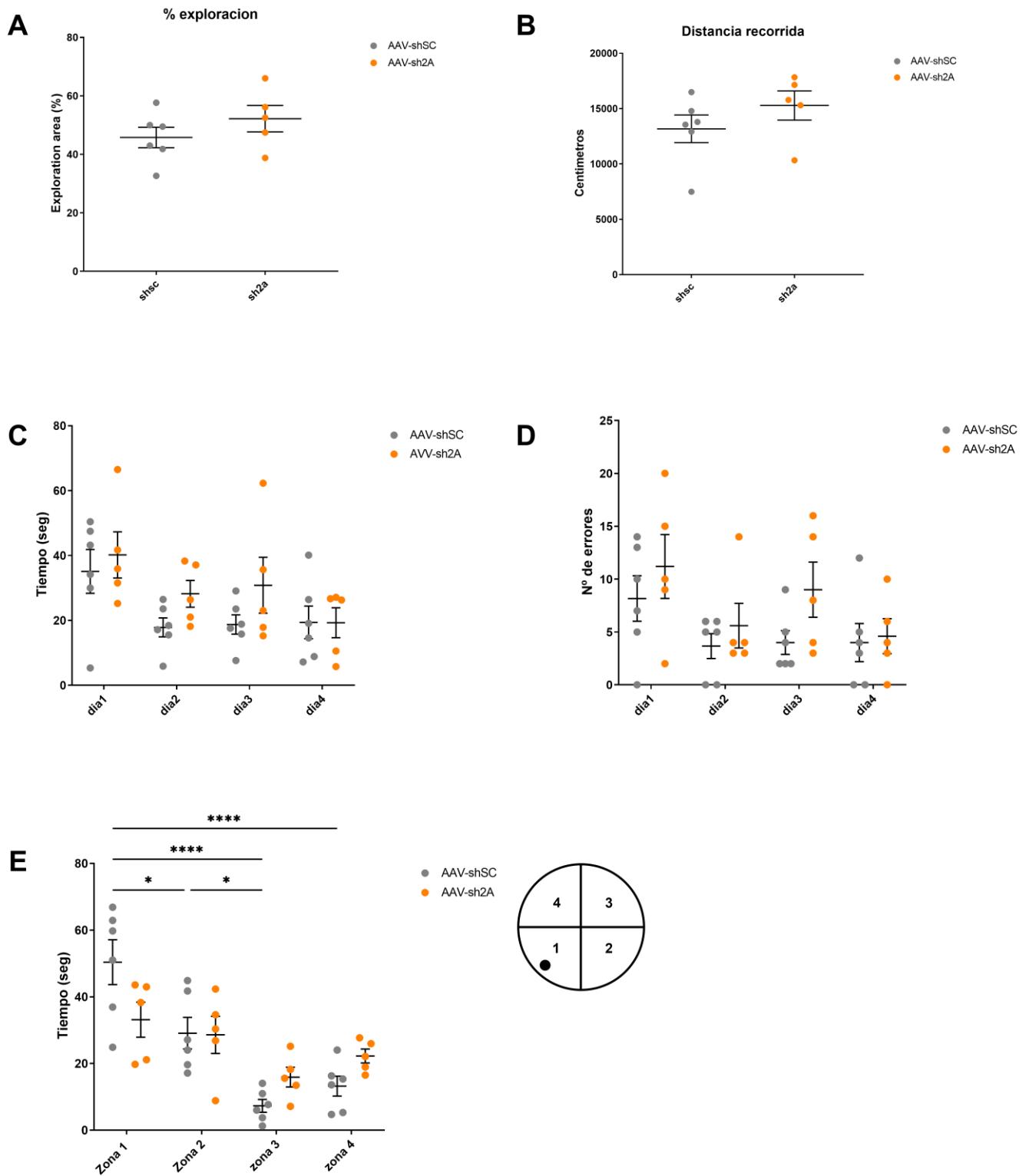


Figura 18. La disminución de la expresión de GluN2A en el hipocampo, no afecta el aprendizaje complejo ni la memoria en ratas. A. Porcentaje de exploración del área. No hay diferencias significativas entre los grupos ($p = 0,3038$). T de Student. B. Distancia recorrida durante el test de exploración de zonas. Los animales GluN2A-KD no recorren una distancia significativamente diferente a la recorrida por los animales control ($p = 0,4543$). T de Student. C. Tiempo transcurrido hasta ingresar al orificio de escape. Se observa una disminución de la latencia a medida que se realizan las distintas sesiones de adquisición. D. Número de errores hasta ingresar al orificio de escape. E. Test de exploración de zonas. La zona 1 representa aquella donde se encuentra el orificio de escape. Mediante una prueba ANOVA de dos vías, no se presentan diferencias significativas entre los grupos de animales ($p = 0,9944$), pero si entre las diferentes zonas de estudio ($p = <0,0001$). Los animales control recorren significativamente más tiempo la zona 1. Test de comparaciones múltiples. $n= 6$ control (puntos grises), $n= 5$ GluN2A-KD (puntos naranjas).

En la prueba de Barnes Inverso, donde se rota 180º el agujero de salida, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos durante la prueba del laberinto de Barnes directo. Ambos grupos de estudio lograron identificar y recordar la nueva posición del agujero de salida a lo largo de las sesiones. No se observaron diferencias significativas entre animales control y GluN2A-KD para el porcentaje de exploración de la arena (Figura 19A) ni la distancia recorrida (Figura 19B). Además, la latencia de escape (Figura 19C) y el número de errores (Figura 19D) disminuyó a lo largo de las sesiones de entrenamiento, sin observarse diferencias significativas entre los grupos. En la sesión de testeо, los animales inyectados con el vector AAV-sh2A no fueron significativamente diferentes que aquellos tratados con el vector AAV-shSC; sin embargo, ambos grupos presentaron diferencias en el tiempo de exploración de zonas. El grupo control exploró mayoritariamente la zona 3 (que contiene el agujero de salida) con respecto a la zona 1 y 4, sin presentar diferencias significativas con el tiempo que recorre la zona 2. En el grupo GluN2A-KD, la zona 2 fue significativamente la más explorada durante los 5 minutos que duró la prueba, pero sin presentar diferencias significativas con el tiempo de exploración con la zona 3 (Figura 19E). Teniendo en cuenta los resultados mencionados para las sesiones de entrenamiento hipotetizamos que, la rotación del orificio de escape 180º durante la prueba del laberinto de Barnes Inverso, no impidió que ambos grupos de animales identifiquen y recuerden la nueva posición a lo largo de los días. Estos resultados podrían sugerir que la disminución en la expresión de la subunidad GluN2A del RNMDA en el hipocampo de ratas Wistar, no afecta la flexibilidad cognitiva.

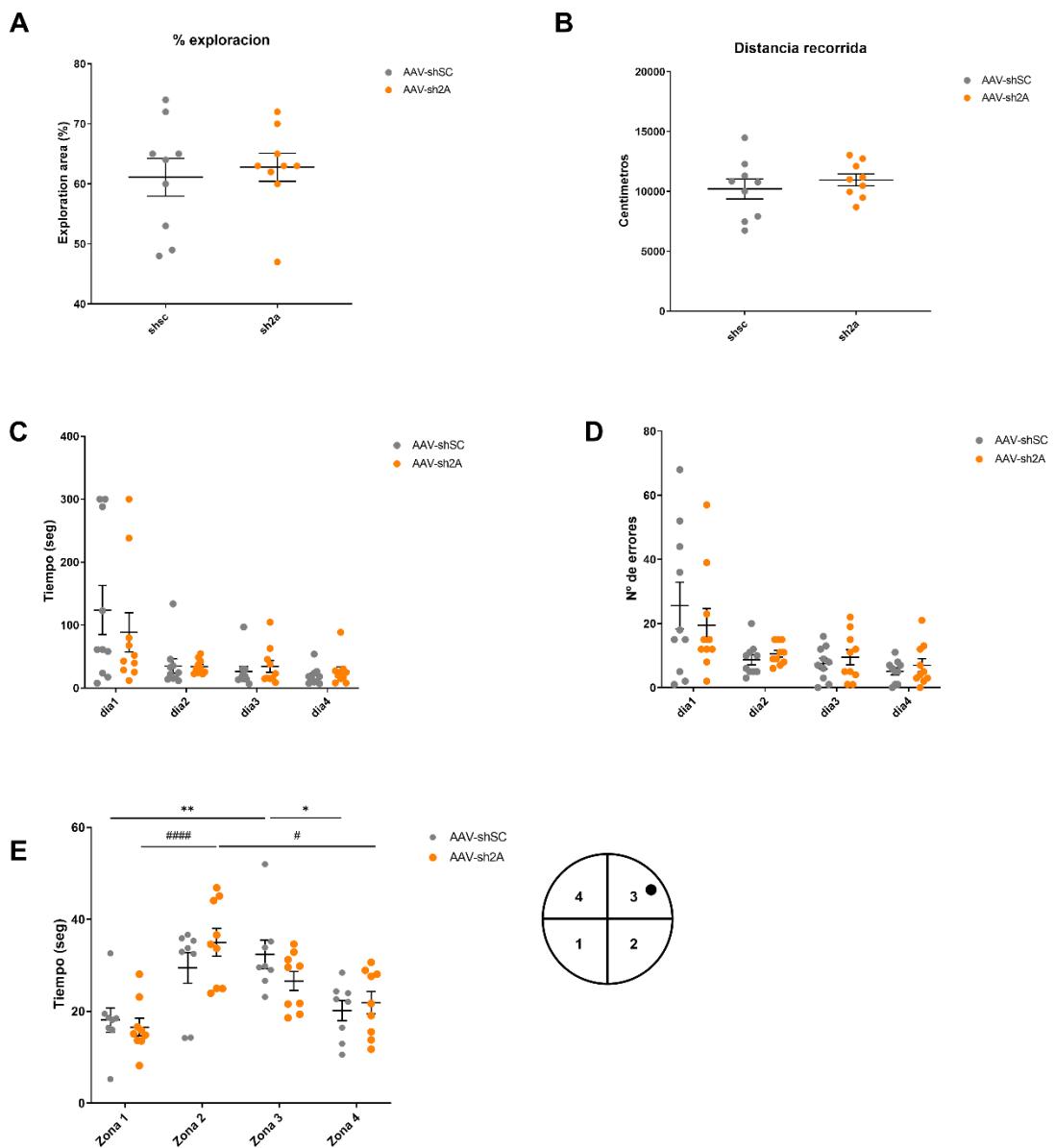


Figura 19. Evaluación de la flexibilidad cognitiva en ratas GluN2A-KD. A. Porcentaje de exploración total del área ($p = 0,9488$). T de Student. B. Distancia total recorrida durante el test de exploración de zonas ($p = 0,5822$). T de Student. C. Latencia de escape durante las cuatro sesiones de adquisición realizadas en días consecutivos. D. Número de errores hasta ingresar al orificio de salida durante los cuatro días de sesión de adquisición. E. Test de exploración de zonas. ANOVA de dos vías (entre grupos $p = 0,9885$; entre zonas $p < 0,0001$). n= 9 animales por grupo. Animales control (puntos grises), GluN2A-KD (puntos naranjas).

Durante el test de exploración de zonas, tanto en la prueba de Barnes directo como en el Barnes inverso, se observa una tendencia en los animales a recorrer más tiempo la zona 2. Este resultado puede deberse a que una de las claves visuales presentes en este cuadrante, generó un mayor interés por parte de las ratas control y GluN2A-KD. Por esta razón creemos que los resultados del test de exploración de zonas son no concluyentes con los resultados de esta prueba y sería necesario repetir el ensayo.

- ENSAYO DE INTERACCIÓN SOCIAL

Por último, decidimos evaluar otros parámetros de la cognición como es la interacción social, la cual depende del hipocampo y se halla mediada por RNMDA (Belforte et al., 2010; Mohn et al., 1999). Para esto, se realizó un ensayo de comportamiento social adaptado (Habif et al., 2021) del paradigma de tres cámaras (Yang et al. 2011). El mismo consistió en cuatro sesiones consecutivas, realizadas durante un mismo día. La primera se trataba de una sesión de habituación a la arena donde se llevó a cabo el ensayo. Inmediatamente, se realizó una segunda sesión de habituación en la misma arena, pero que ahora contenía dos jaulas vacías en uno de los lados del CA. Para la sesión siguiente, se colocó una rata novedosa del mismo sexo y menor edad (rata N) en una de las jaulas, y un objeto de igual tamaño y color en la restante, permitiendo que el animal explore libremente. Durante la sesión final, se le permitió a la rata experimental explorar la arena que ahora contenía a la rata N conocida en una de las jaulas y un nuevo animal (rata N') en la jaula donde previamente se encontraba el objeto (Figura 20A). Tanto en la sesión O-N como en la sesión N-N', se contabilizó el tiempo que el animal exploraba al objeto, la rata N y la rata N'. Con esta información, se calcularon los ID correspondientes (ver Materiales y métodos, pág. 23).

Durante la sesión O-N, se observó un comportamiento similar entre las ratas control y las GluN2A-KD ya que todos los animales interaccionaron más con la rata N que con el objeto. Al realizar el análisis estadístico se comprobó que, tanto los animales control como los GluN2A-KD, interaccionan significativamente más tiempo con la rata N que con el objeto. Este resultado indica una preferencia de ambos grupos por relacionarse con un par que con un objeto (Figura 20B). Al analizar el ID, se observa que no existen diferencias significativas entre los animales inyectados con el AVV-shSC o AVV-sh2A (Figura 20C).

Durante la sesión N-N', se observó una diferencia en el comportamiento de ambos grupos de estudio. Las ratas control pasaron significativamente más tiempo interaccionando con la rata N' en comparación con la rata N, mientras que los animales GluN2A-KD, interaccionaron de manera similar con la rata N y la rata N' (Figura 20D). El posterior análisis, mostró diferencias significativas entre los grupos para el ID durante esta sesión (Figura 20E). Estos resultados sugieren que la discriminación de un par novedoso se ve afectada por la disminución de la expresión de GluN2A en el hipocampo, lo que no estaría relacionado con la interacción social.

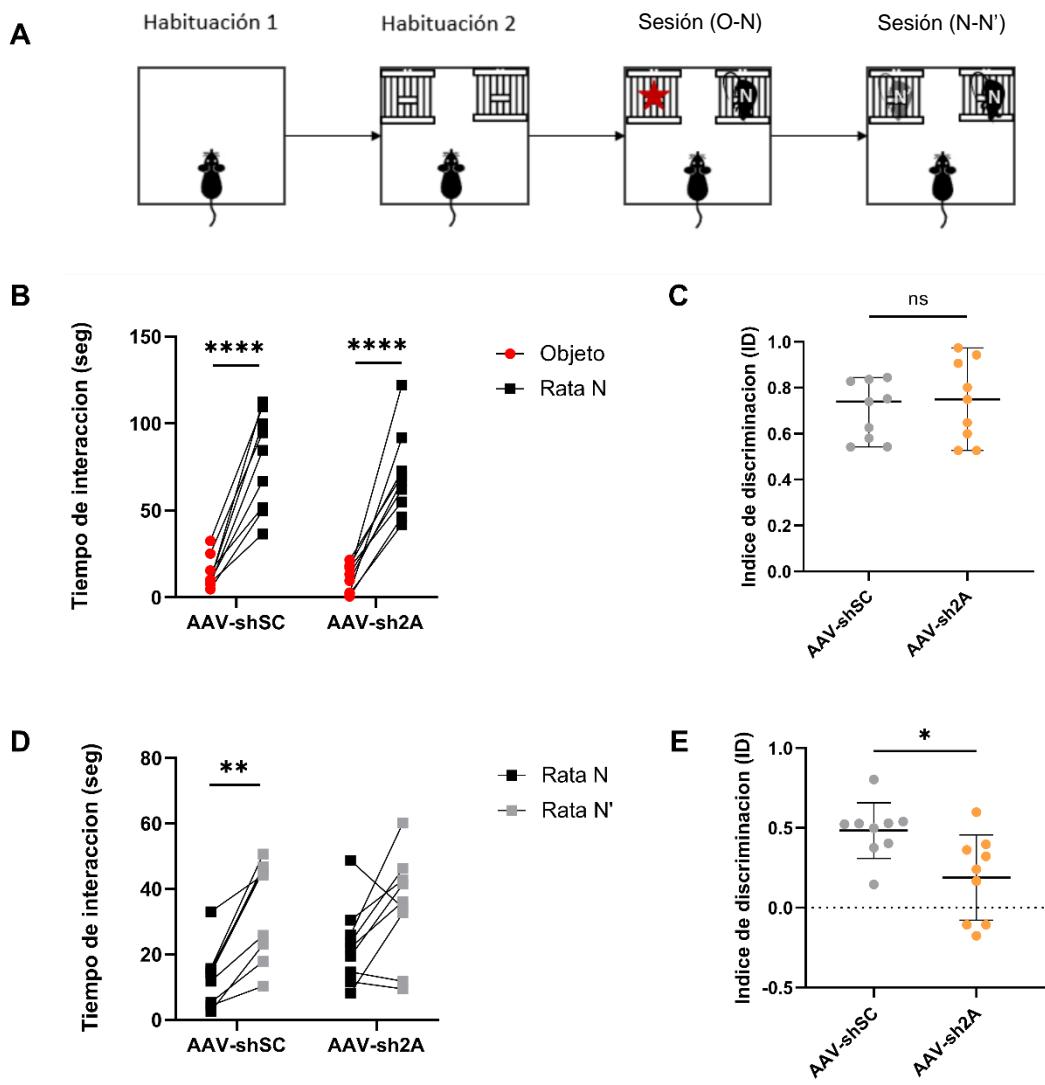


Figura 20. La preferencia por la novedad social se ve alterada en ratas GluN2A-KD en el hipocampo. **A.** Esquema del ensayo de comportamiento social llevado a cabo en el estudio. **B.** Análisis de tiempo de interacción total con el objeto (O, círculos rojos) y la rata novedosa (N, cuadrados negros) para las ratas control y GluN2A-KD durante la sesión de reconocimiento. Existe una diferencia significativa entre el tiempo de interacción con el objeto y con la rata para ambos grupos estudiados (AAV-shSC *** $p = <0,0001$; AAV-sh2A *** $p = <0,0001$). ANOVA de dos vías. **C.** Índice de discriminación para la sesión de reconocimiento para las ratas control (gris) y GluN2A-KD (naranja). T test de una única muestra, $p = 0,3825$. **D.** Análisis del tiempo de interacción con la rata N (ahora conocida) y rata N' (novedosa) durante la sesión de testeo. La interacción con el animal novedoso frente al conocido es significativamente mayor para los animales control, resultado que no se observa en los animales GluN2A-KD. (AAV-shSC ** $p = 0,0035$; AAV-sh2A $p = 0,1193$). ANOVA de dos vías. **E.** Índice de discriminación para la sesión de testeo. Los animales GluN2A-KD presentan un ID significativamente menor que los animales control. T test de una única muestra, $p= 0,0137$. n= 9 animales por grupo.

PARTE II: Inmunofluorescencia.

Disminución de la expresión de la subunidad GluN2A en el hipocampo de ratas Winstar.

Luego de las pruebas de comportamiento, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los cerebros para realizar los ensayos de inmunofluorescencia. El objetivo fue evaluar la eficiencia de los vectores virales en la disminución de la expresión de GluN2A e identificar el área y patrón de infección de los AAV. Para esto, se seleccionaron rodajas correspondientes a 3 alturas diferentes del hipocampo según las coordenadas del Atlas Paxinos & Watson: la correspondiente al sitio de inyección (SI, aproximadamente -4,00 mm desde el Bregma), una rodaja a 1 mm del SI hacia anterior y una hacia posterior (-1 y +1 respectivamente).

Una vez seleccionadas las rodajas correspondientes, se realizó el ensayo de inmunofluorescencia contra GluN2A y la proteína verde fluorescente (eGFP), y se identificaron los núcleos mediante tinción con DAPI. A partir de las imágenes de inmunofluorescencia de la región del hipocampo a bajo aumento, se delimitaron las distintas regiones a estudiar mediante el atlas Paxinos & Watson (Paxinos et al., 2006) (Figura 21).

En las imágenes específicas para cada región, se seleccionaron las neuronas eGFP positivas y se midió la intensidad de fluorescencia (IF) para los distintos canales. A su vez, para comprender de manera más específica el patrón de infección, se realizó un análisis de las subáreas que conforman cada estructura del hipocampo previamente mencionada. Las regiones CA2 y CA3 se excluyeron del análisis estadístico debido a que el número de neuronas eGFP positivas encontradas no fue lo suficientemente alto como para realizar el mismo. Todos los análisis estadísticos realizados en las regiones CA1 y giro dentado (GD) se presentaron como la relación entre la intensidad de fluorescencia media de GluN2A y la intensidad de fluorescencia media de eGFP (IF GluN2A/IF eGFP).

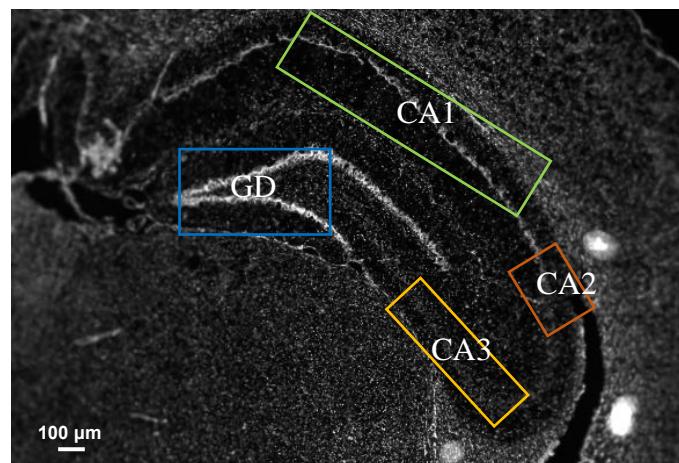


Figura 21. Estructura y regiones del Hipocampo. A. Imagen del hipocampo tomada en microscopio óptico a un aumento de 4 X, donde se marcan las regiones de interés para este trabajo (CA1, CA2, CA3 y GD).

Se comenzó con el análisis de la expresión de los vectores en la región CA1 del hipocampo, donde se había realizado previamente la inyección durante la cirugía estereotáxica, para analizar la extensión de la infección. En las imágenes se encontraron neuronas eGFP positivas aisladas en las 3 zonas estudiadas para esta región.

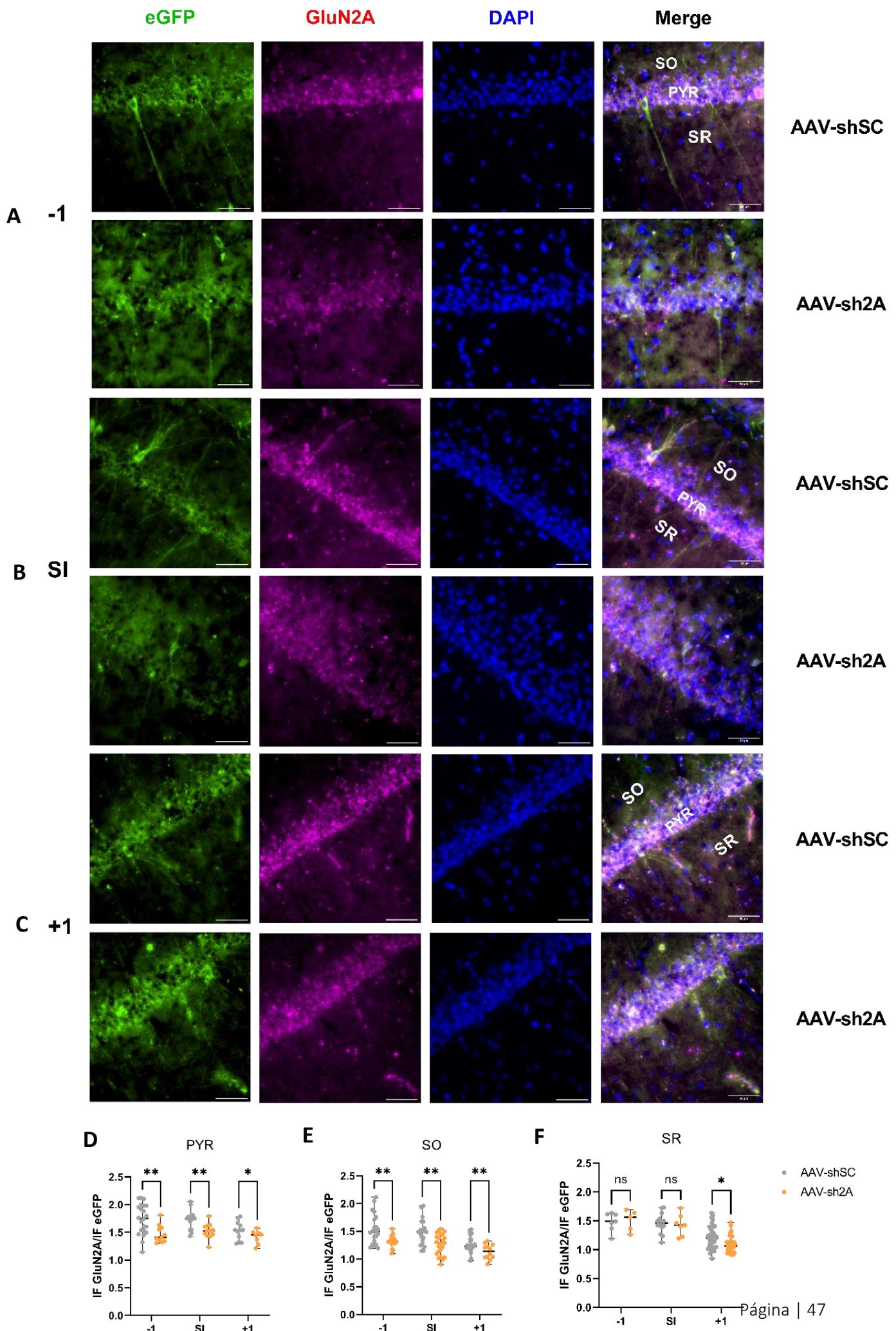


Figura 22. Inmunofluorescencia de la región CA1 del hipocampo. Relación entre la intensidad de fluorescencia de GluN2A y eGFP en: **A-C** fotos representativas de las zonas +1 (**A**) SI (**B**) y -1 (**C**). Aumento: 20X. Tamaño de la escala: 50 μ m. **D-F**. Análisis de la IF promedio para las neuronas infectadas. **D.** zona de somas de las neuronas piramidales (PYR) (-1 $p^{**}=0,005352$; SI $p^{**}=0,004286$; +1 $p^{*}=0,023020$), **E.** *Stratum Oriens* (SO) (-1 $p^{**}=0,004526$; SI $p^{**}=0,000982$; +1 $p=**0,006563$), **F.** *Stratum Radiatum* (SR) (-1 $p=0,833249$; SI $p=0,738218$; +1 $p=0,012818$); para las 3 coordenadas de estudio. *Multiple umpear T test*. n = nº de neuronas eGFP positivas.

Analizamos la intensidad de GluN2A en las dendritas de las áreas PYR y SO (Figura 22 D y E) y observamos que, la relación entre la intensidad de fluorescencia de GluN2A/eGFP disminuyó significativamente en los animales tratados con el vector AAV-sh2A en comparación con aquellos tratados con el vector control. Observamos también que la disminución es similar para las 3 coordenadas estudiadas (Figuras A-C). Sin embargo, en las prolongaciones correspondientes a la zona SR (Figura 22F), la disminución en la relación IF GluN2A/IF eGFP sólo es significativa hacia posterior del SI (Figura C). Observamos además que, la infección con los vectores AAV, es efectiva y específica de neuronas piramidales dentro del hipocampo, ya que sólo se observan neuronas de este tipo eGFP positivas en todas las coordenadas analizadas (Figuras A-C). Asimismo, se observa que el vector se distribuye homogéneamente por el CA1 pero no infecta a todas las neuronas, ya que la expresión se localiza en células aisladas. Además, se corrobora que el AAV-sh2A produce una disminución efectiva en la expresión de GluN2A en las zonas analizadas de CA1.

Como observamos que la infección con el vector se expande anteroposteriormente desde el sitio de inyección, quisimos corroborar si la infección también se extendía a otras regiones del hipocampo. Para esto, buscamos neuronas eGFP positivas en las otras regiones del hipocampo. Sorprendentemente, encontramos neuronas eGFP positivas aisladas en las diferentes zonas del GD, pero un número muy reducido en CA3 y casi ninguna neurona infectada en CA2. Un análisis más profundo indicó que para las distintas zonas del giro dentado, se observa una disminución significativa de la relación IF GluN2A/IF eGFP en los animales GluN2A-KD en la zona PYR (Figura 23D), tanto hacia anterior como hacia posterior del SI (Figura 23 A y C), y en la zona PoDG (Figura 23F) para las tres coordenadas analizadas durante este trabajo (Figura 23 A-C). En las dendritas correspondientes a la capa MoDG (Figura 23E), el número de neuronas GFP positivas encontradas fue muy bajo, por lo que no fue posible realizar el análisis estadístico.

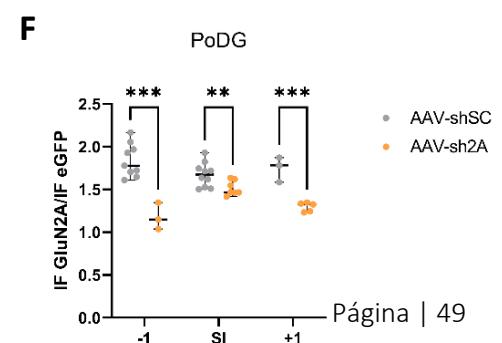
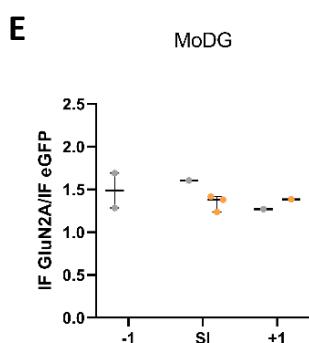
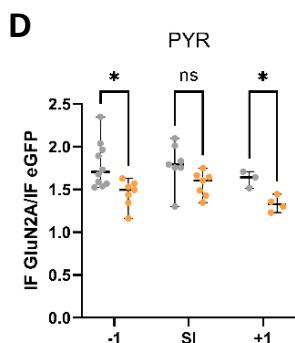
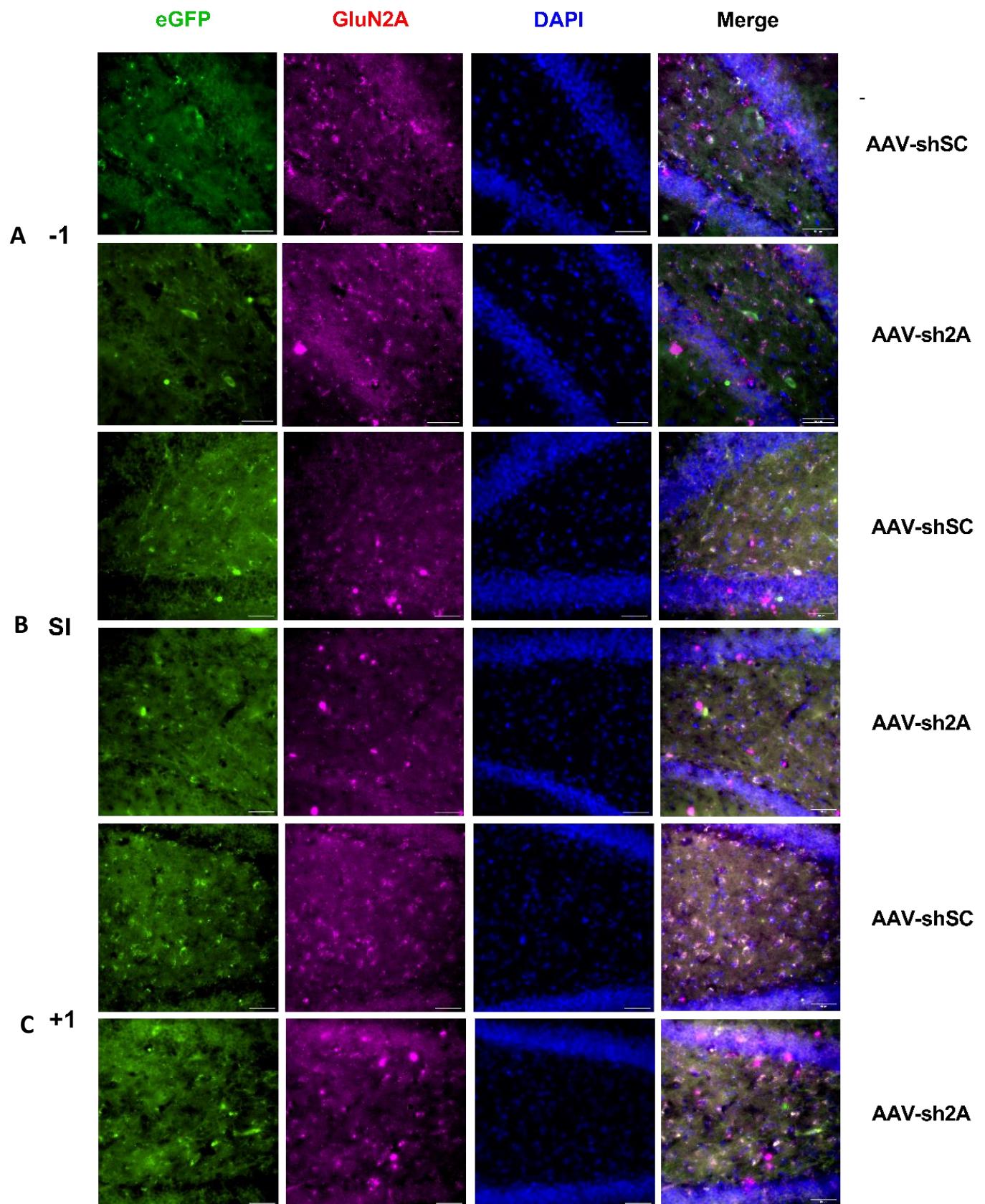


Figura 23. Inmunofluorescencia de la región DG del hipocampo. Relación entre la intensidad de fluorescencia de GluN2A y eGFP en: **A-C** fotos representativas de las zonas +1 (**A**) SI (**B**) y -1 (**C**). Aumento: 20X. Tamaño de la escala: 50 μ m. **D-F**. Análisis de la IF promedio para las neuronas infectadas. **D.** somas de la capa PYR (-1 $p^*=0,025352$; SI $p=0,64286$; +1 $p^*=0,033020$), **E.** prolongaciones de la capa molecular del giro dentado (MoDG) y; **F.** prolongaciones de la capa polimórfica del giro dentado (PoDG) (-1 $p^{***}=0,000726$; SI $p^{**}=0,002982$; +1 $p^{***}=0,000963$); para las 3 coordenadas de estudio. Tamaño de la escala: 50 μ m. Multiple umpear T test. n = nº de neuronas eGFP positivas.

Estos resultados indican que, existe difusión del vector y por tanto del área de infección hacia anteroposterior, y hacia otras estructuras del hipocampo desde el SI. En conjunto, los resultados obtenidos mediante inmunofluorescencia demuestran que existe un silenciamiento efectivo de la subunidad GluN2A no sólo en la región CA1 sino que también en el GD del hipocampo, en aquellos animales injectados con el vector AAV-sh2A.

Discusión

Durante el desarrollo de esta tesis encontramos que la disminución de la expresión de GluN2A una vez ocurrido el *switch* del desarrollo induce cambios en el aprendizaje de tareas espaciales y en el reconocimiento social. Numerosos trabajos de investigación han intentado explicar el rol de GluN2A y GluN2B, las dos subunidades regulatorias del RNMDA principalmente expresadas en el cerebro, en los procesos de plasticidad, memoria y aprendizaje (Paoletti et al., 2013). La subunidad mayormente estudiada, por su expresión más temprana, efectos deletéreos y la existencia de un bloqueo farmacológico selectivo conocido desde hace más tiempo, ha sido GluN2B (Lau and Zukin, 2007; Sanz-Clemente et al., 2013; Shipton and Paulsen, 2014; Yashiro and Philpot, 2008). Sin embargo, con el desarrollo de técnicas de biología molecular, ha sido posible estudiar el rol de GluN2A en los diversos procesos sinápticos (Bannerman et al., 2012; Burnashev and Szepetowski, 2015; Sans et al., 2000).

Las primeras estrategias empleadas para investigar la dinámica de los receptores NMDA, se basaban en el uso de bloqueantes farmacológicos dirigidos al receptor en su conjunto o a las subunidades individuales. En estos trabajos se observó que la infusión en hipocampo de agonistas competitivos de los RNMDA, como el ácido 2-amino 5-fosfato valérico (AP5), produce amnesia anterógrada en los animales cuando son expuestos al MWM (Morris et al., 1986; Packard and Teather, 1997). Tanto los cambios en la expresión génica de los RNMDA, como el silenciamiento sistémico o en áreas específicas del cerebro involucradas en la adquisición y la consolidación de nuevas memorias, permitió esclarecer aún más incógnitas con respecto al funcionamiento de este tipo de receptores y sus subunidades.

Algunos autores han demostrado que la infusión intrahipocampal (Fox et al., 2006) en amígdala o la inyección sistémica (Dalton et al., 2012) de NVP-AAM077, un antagonista con mayor afinidad hacia la subunidad GluN2A (que hacia GluN2B), genera un déficit en la memoria de miedo luego de un condicionamiento aversivo (Dalton et al., 2012; Gao et al., 2010b). Sin embargo, con el uso de fármacos aún no es posible comprender los efectos del bloqueo específico de GluN2A, ya que los antagonistas utilizados en la actualidad no son selectivos de esta subunidad y afectan también la funcionalidad de GluN2B (Frizelle et al., 2006). El uso de vectores virales, en este caso AVV, permite dirigir el silenciamiento de la subunidad GluN2A a una región específica de interés durante la adultez, a diferencia de otros modelos, como los KO, en los que el cambio en la expresión se produce desde el desarrollo embrionario. Por lo que, estos animales desarrollan mecanismos de compensación que les permite llegar a la adultez (Bannerman et al., 2008; Strehlow et al., 2009). Los vectores utilizados en la presente tesis fueron desarrollados en nuestro laboratorio. Con ellos se demostró que la disminución en la expresión de GluN2A luego del *switch* del desarrollo, tanto *in vivo* como *in vitro*, no afecta la expresión del ARNm correspondiente a GluN2B (Acutain et al., 2021). Esto también fue observado por Strehlow y colaboradores en un modelo KO para GluN2A (Strehlow et al., 2009) lo que resultó sorprendente y novedoso ya que este era uno de los mecanismos de compensación propuestos para el desarrollo normal observado en los animales GluN2A-KO (Strehlow et al., 2009; Acutain et al., 2021). Por lo que, el modelo GluN2A-KD utilizado en este trabajo, permite observar los efectos directos del cambio en la expresión de esta subunidad específica, una vez que la expresión de la subunidad GluN2A se vuelve predominante.

Durante la realización de esta tesis se utilizó un modelo *in vivo* de ratas GluN2A-KD en el hipocampo, previamente descripto en el laboratorio (Acutain et al., 2021). Existen pocos modelos de disminución de la expresión de GluN2A luego del *switch* del desarrollo reportados en la bibliografía (de Solis et al., 2015; Gambrill and Barria, 2011; Sepulveda et al., 2010), lo cual deja abierto el interrogante sobre el rol de GluN2A en procesos de plasticidad y memoria que impliquen cambios agudos en dicha subunidad. Contrario a los KO de GluN1 y GluN2B, los modelos de KO para GluN2A se desarrollan normalmente (Bannerman et al 2008; Strehlow et al, 2019). En estos ultimos, se observó un déficit en la MCP o la memoria de trabajo sin presentarse cambios en la adquisición de MLP de tipo espaciales de entrenamientos largos (Bannerman, 2009; Bannerman et al., 2008; Kannangara et al., 2015). Contrariamente, el modelo GluN2A-KD utilizado en esta tesis no presentó déficits en la memoria de trabajo y si, algún déficit que resta ser confirmado en LTM_s adquiridas en múltiples entrenamientos. Hipotetizamos que estas diferencias se deben a los paradigmas utilizados, el MWM resulta una prueba muy estresante y más difícil de adquirir en una sola sesión/día. Bannerman y col. usaron múltiples sesiones de entrenamiento en el mismo día, lo que permitió observar el déficit en la memoria de trabajo durante sesiones intra-entrenamiento. En nuestro caso, utilizamos el laberinto en Y para evaluar memoria de trabajo, que podría resultar una prueba muy simple para los animales. Por otro lado, el paradigma utilizado para LTM_s de múltiples entrenamientos, el Barnes Maze, es menos estresante que la prueba mencionada anteriormente y podría ser más susceptible a diferencias menores en la cognición.

Nuestros resultados de los ensayos de inmunofluorescencias nos permitieron observar por primera vez que, el uso de los vectores AAV produce un KD efectivo de la subunidad GluN2A a nivel proteína, no sólo en la región CA1 del hipocampo, donde el vector había sido inyectado; sino que también en otras estructuras del hipocampo, como el GD. Previamente, la disminución de la expresión de GluN2A en este modelo solo había sido corroborada a nivel ARNm (Acutain et al., 2021). Además, se corroboró que existe difusión del vector desde el área de infección hacia anteroposterior desde el sitio de inyección, debido a la expresión de eGFP y la disminución de GluN2A en las demás coordenadas analizadas. Esto podría deberse a que los vectores AAV suelen difundir a diferentes sitios luego de la inyección debido a su tamaño (Steward et al., 2021), lo que explicaría el patrón de infección observado en esta tesis, donde se encontraron células eGFP positivas aisladas y no un gradiente de la cantidad de neuronas infectadas.

Si se quisiera aumentar la cantidad de células infectadas, podría aumentarse la multiplicidad de infección (MOI) o cambiar los promotores del *shRNA*. Sin embargo, el aumento de la MOI o el cambio en los niveles de expresión podrían llevar a efectos tóxicos en las células. De Solis y colaboradores (2015) han demostrado que la utilización de vectores AAVs que codifican un *shRNA*-GluN2A, induce cierto grado de neurotoxicidad *in vivo*. Esta toxicidad podría enmascarar cambios genéticos específicos en el aprendizaje y sesgar los resultados obtenidos (de Solis et. al, 2015). En el presente trabajo no se observaron cambios en el número de las células a nivel del hipocampo ni tampoco signos de toxicidad en las células infectadas. Esto podría ser debido a la MOI utilizada y a que, en el vector AAV diseñado, los marcos de lectura del *shRNA* y la eGFP se encuentran enfrentados para disminuir la cantidad de *shRNA*

transcripto. Un aumento en el título del vector utilizado o una mayor expresión de los *shRNA* podría derivar en cambios no esperados que afecten la integridad de las neuronas y, por lo tanto, la observación de signos cognitivos no relacionados con la disminución de la expresión. Teniendo en cuenta los posibles efectos adversos observados previamente, en nuestro modelo se midió la sobrevida neuronal, durante la construcción del vector y la puesta a punto del modelo *in vitro* (Acutain et al., 2021). Teniendo en cuenta estos resultados, podría plantearse algunos cambios en el modelo para aumentar el número de células infectadas y/o disminuir aún más la expresión de GluN2A.

En un trabajo anterior, observamos que animales GluN2A-KD presentaron un déficit en la evocación de la parte contextual de un paradigma de memoria de miedo asociada al tono y al contexto, confirmando lo que se había observado previamente en modelo KO de GluN2A (Kiyama et al., 1998; Sprengel et al., 1998). Sin embargo, en otros modelos GluN2A-KD, inducidos antes del aumento de la expresión de la misma en el hipocampo, no se observaron alteraciones cognitivas relacionadas con dicha estructura (Gambrill and Barria, 2011; Kannangara et al., 2014). Las diferencias entre nuestros resultados y los obtenidos en la bibliografía podrían deberse a mecanismos compensatorios inducidos por la falta del *switch* del desarrollo (Gambrill and Barria, 2011). La dificultad en el conocimiento de tales mecanismos reside en que no están esclarecidos los mecanismos moleculares que llevan a este proceso, ni como es la regulación transcripcional de la expresión de GluN2A (Storey y Barria, 2024; Paoletti et al, 2013)

En el trabajo citado anteriormente, Acutain y colaboradores observaron que la adquisición del mapa espacial en ratas GluN2A-KD podría ser diferente o llevar más tiempo debido a la disminución en la expresión de GluN2A (Acutain et al., 2021). Sin embargo, otros autores demostraron que ni los animales GluN2A-KO (Bannerman et al., 2008), ni la disminución de la expresión (Ge et al., 2010) o la delección del dominio C-terminal de la subunidad GluN2A (Ng et al., 2009), afectan la memoria espacial. Estos últimos resultados fueron obtenidos en tareas que requieren varios días de entrenamiento para su adquisición, como por ejemplo el MWM.

Se ha postulado que los ratones GluN2A-KO poseen un déficit en la memoria de trabajo. Para comprobar si el mismo déficit se mantiene en el GluN2A-KD, realizamos una prueba de Laberinto en Y. Durante la misma, observamos que la disminución en la expresión de GluN2A, no indujo déficits en la discriminación entre un brazo previamente conocido y uno novedoso; contrario a lo observado en el modelo de GluN2A-KO, se sugiere que la subunidad GluN2A del RNMDA parece ser crucial para la memoria espacial de trabajo de rápida adquisición (Bannerman et al., 2008). La diferencia en los resultados puede deberse al tipo de paradigma utilizado para testear este tipo de memorias, ya que durante el trabajo de Bannerman y colaboradores se realiza la prueba en un laberinto en T elevado que posee mayor separación entre los brazos. También podrían existir diferencias entre el KO y KD, y-o mecanismos de compensación que permiten el correcto desarrollo del KO y que llevan al déficit en la memoria de trabajo. En línea con esta hipótesis, la disminución indirecta en la expresión de GluN2A debido a un déficit en Celsr2, una cadherina implicada en algunos procesos del desarrollo neuronal, no producen cambios en la memoria de trabajo

analizada durante de prueba de laberinto en Y (Chen et al., 2022), concordando con los resultados observados durante esta tesis.

Por otro lado, algunos trabajos sugieren que el bloqueo o la ausencia de GluN2A afectaría la adquisición rápida del contexto y estaría vinculada a la memoria de trabajo (Bannerman et al., 2008; Kannangara et al., 2015; Kiyama et al., 1998). Partiendo de estos trabajos, la presente tesis se basó en observar los posibles déficits en paradigmas de tipo espacial y de exploración en el GluN2A-KD luego del *switch* del desarrollo. Nuestros resultados mostraron que, los animales GluN2A-KD, no presentan un patrón de exploración horizontal diferente al observado en los animales control durante la prueba de OF. Igualmente, el análisis de la exploración vertical demostró que no hay diferencias entre el control y el GluN2A-KD. En un trabajo anterior del laboratorio se había reportado que los animales GluN2A-KD, realizaban significativamente más elevaciones que los animales control durante una prueba de campo abierto, sugiriendo que los animales GluN2A-KD exploran el espacio de una manera diferente que los controles (Acutain et al., 2021). La diferencia entre estos resultados podría estar relacionada con las condiciones al momento de realizar la prueba de comportamiento, ya que las mismas se ejecutaron en laboratorios diferentes utilizando arenas distintas. El aumento en la cantidad de animales o la posibilidad de realizar otra prueba que confirme las diferencias en los patrones de exploración ayudarían a esclarecer estas diferencias.

En la presente tesis encontramos que la disminución en la expresión de la subunidad GluN2A en el hipocampo, induce un déficit en el paradigma de localización de objetos ya que los animales GluN2A-KD no diferencian la posición conocida de la novedosa. De manera similar, en un modelo KO de Neto1 (una proteína que regula la abundancia de los RNMDA en las densidades postsinápticas), se observó una disminución de los niveles de GluN2A a nivel proteico y, a nivel comportamental, un déficit en la tarea de localización de objetos (Ng et al., 2009). Este deficit, podría ser recuperado al aumentar la actividad de los RNMDA en las sinapsis farmacológicamente mediante la administración de ampakina CX546. Este fármaco aumenta la corriente a través de los RNMDA al reducir el bloqueo de Mg²⁺ (Ng et al., 2009). Este resultado refuerza la hipótesis de que la disminución en la expresión de GluN2A en el hipocampo, produce un déficit en la adquisición-consolidación de una memoria espacial de entrenamiento único. Sin embargo, los mismos autores discuten la posibilidad de que otros cambios en la expresión génica sean los responsables de los déficits de comportamiento observados durante la prueba de OL en ratones KO para Neto1. En este sentido, Bannerman y colaboradores observaron que ratones GluN2A-KO no poseían déficit en la adquisición de una memoria espacial en el MWM, demostrando que la memoria de referencia espacial es independiente de la subunidad GluN2A (Bannerman et al., 2008). La prueba del laberinto de Barnes se conoce como una alternativa al laberinto acuático de Morris, debido a que reduce los niveles de estrés y los cambios de temperatura que pueden sesgar los resultados (Iivonen et al., 2003; Harrison et al., 2009). En la prueba del Barnes Maze, que permite comprender el aprendizaje complejo y la memoria espacial en roedores, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que, los animales GluN2A-KD, se comportan de manera similar a los controles. Estos resultados, refuerzan la hipótesis de que los animales GluN2A-KD (o

KO) necesitarían de más tiempo para recordar una tarea ya que son capaces de recordar tareas espaciales que requieren múltiples entrenamientos y no aquellas que requieren de entrenamiento único como el OL, sin embargo, deberían repetirse estos ensayos para aumentar el N de animales y confirmar los hallazgos del Barnes *Maze* ya que no pudimos determinar en la sesión de testeo de Barnes *Maze* directo y del Barnes *Maze* inverso cual es el cuadrante preferido por los animales KD.

En otros trabajos donde se produce una disminución indirecta de los niveles de GluN2A se han reportado resultados similares en el Barnes *Maze*. En ratones KO para Kif3b hemicigotas (Kif3b +/-), la expresión de GluN2A disminuye significativamente en el área dendrítica apical de CA1 del hipocampo. Estos animales, cuando son expuestos a la prueba de Barnes directo, tardan más en recordar la posición de escape. Sin embargo, una vez que consiguen aprender la tarea reconocen la posición de salida, lo que sugiere que los ratones Kif3b +/- tienen un deterioro en la adquisición-consolidación de una memoria espacial, pero mantienen conservada la fase de evocación de la misma MLP (Alsabban et al., 2019). Por otro lado, en un modelo *in vivo* donde se silencia la expresión de GluN2A en astrocitos del hipocampo, se observa un aumento significativo de la latencia de escape durante la prueba de Barnes *Maze* directo (Du et al., 2021). En conjunto, estos resultados podrían indicar que la disminución en la expresión de GluN2A en neuronas del hipocampo, no afecta la memoria espacial y el aprendizaje durante la prueba de Barnes *Maze*. Sin embargo, cuando el silenciamiento de GluN2A se produce en otros tipos celulares, como los astrocitos, se ven afectados la adquisición y la consolidación de la misma MLP. Estos resultados sugerirían que los RNMDA neuronales no son los únicos contribuyentes a la consolidación de los distintos tipos de memoria y aprendizaje y que los RNMDA expresados en otros tipos celulares podrían tener una importancia similar a los neuronales en diferentes fases de la memoria y el aprendizaje.

Como se había reportado que los ratones Kif3b +/-, que poseen una disminución indirecta de GluN2A en el hipocampo tardan significativamente más tiempo en alcanzar la nueva posición de escape en el Barnes directo (Alsabban et al., 2019), continuamos con el ensayo de Barnes inverso para comprobar si el silenciamiento de GluN2A produce déficit en la flexibilidad cognitiva. Los resultados de esta tesis mostraron que los animales GluN2A-KD se comportan similar a los controles. La diferencia entre los resultados de Alsabban y colaboradores y los obtenidos aquí puede deberse a que, en el trabajo primeramente mencionado, la disminución de los niveles de GluN2A fue reportada por cambios en la expresión de kif3b, un motor molecular que podría afectar los niveles de GluN2A, pero también de otras proteínas que están involucradas en varias vías de señalización. Esto sugiere que la disminución de los niveles de Kif3b, podrían estar impidiendo la llegada a las sinapsis de GluN2A y otras moléculas lo que produciría que el déficit observado pueda ser ocasionado por alteraciones en múltiples vías de señalización, y no solo por la falta de transporte de GluN2A a las sinapsis.

La disminución indirecta de los niveles de GluN2A por KO de Celsr2 induce un déficit en la memoria social en un paradigma de interacción social (Chen et al., 2022). Los ratones KO para Celsr2 no son capaces de distinguir entre un animal previamente conocido y uno novedoso. Por lo que, en la presente tesis probamos si nuestro modelo

tenía alterada la interacción social y/o la memoria social. Observamos que la disminución en la expresión de GluN2A, no afecta la sociabilidad en ratas, pero si la discriminación de un par novedoso frente a un animal previamente conocido. El hecho de que el silenciamiento de GluN2A en el hipocampo induzca un déficit en el reconocimiento de un par novedoso, sugiere que esta subunidad particular del RNMDA podría ser importante para los procesos neuronales subyacentes a la formación y el mantenimiento de este tipo de memoria. En concordancia con esta hipótesis, al incrementar farmacológicamente la actividad de los RNMDA, se observó una mejora significativa en la memoria social (Chen et al., 2022). Relacionando ambos resultados, podemos inferir que la regulación de los RNMDA puede ser crucial para la memoria social.

Por otro lado, SorCS2 es una proteína transmembrana que tiene un importante rol en el tráfico de otras proteínas y se expresa mayoritariamente en CA2 (Yang et al., 2021). Los animales KO para SorCS2 poseen un déficit en la interacción social. En trabajos anteriores se demostró que esta proteína interactúa específicamente con los RNMDA y que, la delección de la misma produce déficits en la memoria social revelando su papel como mediador crítico de la formación de la memoria social mediante la regulación del tráfico sináptico de NMDAR en las neuronas piramidales de CA2 (Yang et al., 2021). Otros estudios también discuten la importancia de la región CA2 del hipocampo, en la consolidación de la memoria social (Tzakis & Holahan, 2019; Lehr et. al, 2021). Durante los análisis de inmunofluorescencia de esta tesis, no observamos una disminución de GluN2A en la región CA2 debido a las pocas neuronas infectadas en esta zona. Estos resultados podrían indicar que, si bien CA2 es importante para la interacción social, otras regiones podrían tener un rol importante en este proceso.

Por lo anteriormente citado se confirma que los cambios en la expresión de la subunidad GluN2A producen déficits en el comportamiento social de roedores. Sin embargo, esta no es la única subunidad con un rol en la interacción social. La delección de la subunidad GluN2D, también resulta en un déficit en el reconocimiento social. Ratones KO para GluN2D presentan diferencias significativas en el tiempo de interacción social con un animal conocido o uno novedoso en un paradigma de las 3 cámaras lo que sugiere un déficit en la preferencia social (Yamamoto et al., 2017).

En conjunto, estos resultados sugieren que la interacción compleja entre distintas proteínas sinápticas y los RNMDA podría jugar un rol importante en los procesos de la interacción social, las cuales resultan de importancia en el correcto desarrollo neurológico y se ve afectada en diversas patologías dentro del síndrome del espectro autista. En pacientes con mutaciones en *grin2A*, se observó que aproximadamente el 10 % de los mismos poseen algún comportamiento compatible con este tipo de síndromes (Benke et al 2021). El mayor y mejor conocimiento de los mecanismos moleculares que llevan a déficits en la interacción social por alteración de la expresión de GluN2A resulta de importancia para la investigación futura, lo que podría llevar a una mayor comprensión de los mecanismos neurobiológicos de la memoria social.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de la tesis sobre el estudio de la disminución de la expresión de GluN2A en neuronas del hipocampo podemos decir que:

- Se confirmó a nivel proteico una disminución efectiva de la expresión de la subunidad GluN2A, tanto en CA1 como en DG. Se observó una difusión de los vectores inyectados a lo largo del eje anteroposterior y hacia otras regiones del hipocampo desde el sitio de inyección.
- Las ratas GluN2A-KD presentan un déficit en el paradigma de *OL*, lo que podría indicar una alteración en la memoria espacial.
- No se observaron diferencias entre los grupos de animales para la prueba de *Y – maze*, por lo que la disminución de la subunidad GluN2A no afectaría la memoria de trabajo en este tipo de paradigmas.
- El aprendizaje complejo espacial y la flexibilidad cognitiva no estarían alterados por el silenciamiento de GluN2A en el hipocampo.
- La discriminación de un par novedoso se ve afectada por la disminución de la expresión de GluN2A en el hipocampo, pero no observamos déficits en la interacción social.

En conjunto, nuestros resultados sugieren fuertemente que la disminución de la expresión de GluN2A en neuronas piramidales de CA1 y el GD, altera la adquisición-consolidación de memorias de tipo espaciales de entrenamiento único y la memoria de reconocimiento social. Sorprendentemente, no se observaron cambios significativos en la memoria de trabajo, contrario a lo que había sido observado anteriormente por otros autores.

Bibliografía

- Acutain, M. F., Griebler Luft, J., Vazquez, C. A., Popik, B., Cercato, M. C., Epstein, A., ... & Baez, M. V. (2021). Reduced expression of hippocampal GluN2A-NMDAR increases seizure susceptibility and causes deficits in contextual memory. *Frontiers in Neuroscience*, 15, 644100.
- Alsabban, A. H., Morikawa, M., Tanaka, Y., Takei, Y., & Hirokawa, N. (2020). Kinesin Kif3b mutation reduces NMDAR subunit NR 2A trafficking and causes schizophrenia-like phenotypes in mice. *The EMBO Journal*, 39(1), e101090.
- Ammassari-Teule, M., & Passino, E. (1997). The dorsal hippocampus is selectively involved in the processing of spatial information even in mice with a genetic hippocampal dysfunction. *Psychobiology*, 25(2), 118-125.
- Baez, M. V., Oberholzer, M. V., Cercato, M. C., Snitcofsky, M., Aguirre, A. I., & Jerusalinsky, D. A. (2013). NMDA receptor subunits in the adult rat hippocampus undergo similar changes after 5 minutes in an open field and after LTP induction. *PLoS One*, 8(2), e55244.
- Bannerman, D. M., Niewoehner, B., Lyon, L., Romberg, C., Schmitt, W. B., Taylor, A., ... & Rawlins, J. N. (2008). NMDA receptor subunit NR2A is required for rapidly acquired spatial working memory but not incremental spatial reference memory. *Journal of Neuroscience*, 28(14), 3623-3630.
- Bannerman, D. M., Bus, T., Taylor, A., Sanderson, D. J., Schwarz, I., Jensen, V., ... & Sprengel, R. (2012). Dissecting spatial knowledge from spatial choice by hippocampal NMDA receptor deletion. *Nature neuroscience*, 15(8), 1153-1159.
- Belforte, J. E., Zsiros, V., Sklar, E. R., Jiang, Z., Yu, G., Li, Y., ... & Nakazawa, K. (2010). Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nature neuroscience*, 13(1), 76-83.
- Benke, T. A., Park, K., Krey, I., Camp, C. R., Song, R., Ramsey, A. J., ... & Lemke, J. (2021). Clinical and therapeutic significance of genetic variation in the GRIN gene family encoding NMDARs. *Neuropharmacology*, 199, 108805.
- Cercato, M. C., Vázquez, C. A., Kornisiuk, E., Aguirre, A. I., Colettis, N., Snitcofsky, M., ... & Baez, M. V. (2017). GluN1 and GluN2A NMDA receptor subunits increase in the hippocampus during memory consolidation in the rat. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 10, 242.
- Chen, H. S., Pellegrini, J. W., Aggarwal, S. K., Lei, S. Z., Warach, S., Jensen, F. E., & Lipton, S. A. (1992). Open-channel block of N-methyl-D-aspartate (NMDA) responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 12(11), 4427-4436.
- Chen B, Wang L, Li X, Shi Z, Duan J, Wei JA, Li C, Pang C, Wang D, Zhang K, Chen H, Na W, Zhang L, So KF, Zhou L, Jiang B, Yuan TF, Qu Y. Celsr2 regulates NMDA receptors and dendritic homeostasis in dorsal CA1 to enable social memory. Mol Psychiatry. 2022 Jul 4. doi: 10.1038/s41380-022-01664-x. Epub ahead of print. PMID: 35789199.
- Dalton, G. L., Wu, D. C., Wang, Y. T., Floresco, S. B., & Phillips, A. G. (2012). NMDA GluN2A and GluN2B receptors play separate roles in the induction of LTP and LTD in the amygdala and in the acquisition and extinction of conditioned fear. *Neuropharmacology*, 62(2), 797-806.
- de Solis, C. A., Holehonnur, R., Banerjee, A., Luong, J. A., Lella, S. K., Ho, A., ... & Ploski, J. E. (2015). Viral delivery of shRNA to amygdala neurons leads to neurotoxicity and deficits in Pavlovian fear conditioning. *Neurobiology of learning and memory*, 124, 34-47.
- Divac, I., Wikmark, R. G. E., & Gade, A. (1975). Spontaneous alternation in rats with lesions in the frontal lobes: an extension of the frontal lobe syndrome. *Physiological Psychology*, 3(1), 39-42.

- Du, Z., Song, Y., Chen, X., Zhang, W., Zhang, G., Li, H., ... & Wu, Y. (2021). Knockdown of astrocytic Grin2a aggravates β -amyloid-induced memory and cognitive deficits through regulating nerve growth factor. *Aging Cell*, 20(8), e13437.
- Endele, S., Rosenberger, G., Geider, K., Popp, B., Tamer, C., Stefanova, I., ... & Kutsche, K. (2010). Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nature genetics*, 42(11), 1021-1026.
- Engelmann, M., Wotjak, C. T., & Landgraf, R. (1995). Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiology & behavior*, 58(2), 315-321.
- Fairman, W. A., & Amara, S. G. (1999). Functional diversity of excitatory amino acid transporters: ion channel and transport modes. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 277(4), F481-F486.
- Fox, C. J., Russell, K. I., Wang, Y. T., & Christie, B. R. (2006). Contribution of NR2A and NR2B NMDA subunits to bidirectional synaptic plasticity in the hippocampus in vivo. *Hippocampus*, 16(11), 907-915.
- Frizelle, P. A., Chen, P. E., & Wyllie, D. J. (2006). Equilibrium constants for (R)-[(S)-1-(4-bromo-phenyl)-ethylamino]-[2, 3-dioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoxalin-5-yl]-methyl]-phosphonic acid (NVP-AAM077) acting at recombinant NR1/NR2A and NR1/NR2B N-methyl-D-aspartate receptors: Implications for studies of synaptic transmission. *Molecular pharmacology*, 70(3), 1022-1032.
- Gambrill, A. C., & Barria, A. (2011). NMDA receptor subunit composition controls synaptogenesis and synapse stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(14), 5855-5860.
- Gao, X. M., Elmer, G. I., Adams-Huet, B., & Tamminga, C. A. (2009). Social memory in mice: disruption with an NMDA antagonist and attenuation with antipsychotic drugs. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 92(2), 236-242.
- Gao, C., Gill, M. B., Tronson, N. C., Guedea, A. L., Guzmán, Y. F., Huh, K. H., ... & Radulovic, J. (2010). Hippocampal NMDA receptor subunits differentially regulate fear memory formation and neuronal signal propagation. *Hippocampus*, 20(9), 1072-1082.
- Gawel, K., Gibula, E., Marszalek-Grabska, M., Filarowska, J., & Kotlinska, J. H. (2019). Assessment of spatial learning and memory in the Barnes maze task in rodents—methodological consideration. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 392, 1-18.
- Ge, Y., Dong, Z., Bagot, R. C., Howland, J. G., Phillips, A. G., Wong, T. P., & Wang, Y. T. (2010). Hippocampal long-term depression is required for the consolidation of spatial memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(38), 16697-16702.
- Gilmartin, M. R., & Helmstetter, F. J. (2010). Trace and contextual fear conditioning require neural activity and NMDA receptor-dependent transmission in the medial prefrontal cortex. *Learning & Memory*, 17(6), 289-296.
- Habif, M., Do Carmo, S., Báez, M. V., Colettis, N. C., Cercato, M. C., Salas, D. A., ... & Jerusalinsky, D. A. (2021). Early long-term memory impairment and changes in the expression of synaptic plasticity-associated genes, in the McGill-R-Thy1-APP rat model of Alzheimer's-like brain amyloidosis. *Frontiers in aging neuroscience*, 12, 585873.
- Harrison, F. E., Reiserer, R. S., Tomarken, A. J., & McDonald, M. P. (2006). Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learning & memory*, 13(6), 809-819.
- Harich, S., Gross, G., & Bespalov, A. (2007). Stimulation of the metabotropic glutamate 2/3 receptor attenuates social novelty discrimination deficits induced by neonatal phencyclidine treatment. *Psychopharmacology*, 192, 511-519.

Hikichi, H., Kaku, A., Karasawa, J. I., & Chaki, S. (2013). Stimulation of metabotropic glutamate (mGlu) 2 receptor and blockade of mGlu1 receptor improve social memory impairment elicited by MK-801 in rats. *Journal of pharmacological sciences*, 122(1), 10-16.

Heuss C, Scanziani M, Gahwiler BH et al (1999) G-proteinindependent signaling mediated by metabotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* 2:1070–1077

Hoffmann, H., Gremme, T., Hatt, H., & Gottmann, K. (2000). Synaptic activity-dependent developmental regulation of NMDA receptor subunit expression in cultured neocortical neurons. *Journal of neurochemistry*, 75(4), 1590-1599.

Hollmann, M., & Heinemann, S. (1994). Cloned glutamate receptors. *Annual review of neuroscience*, 17(1), 31-108.

Izquierdo, I., & Medina, J. H. (1993). Role of the amygdala, hippocampus and entorhinal cortex in memory consolidation and expression. *Brazilian journal of medical and biological research=Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 26(6), 573-589.

Jentsch, J. D., & Roth, R. H. (1999). The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 20(3), 201-225.

Kandel, E. R., & Schwartz, J. H. (1982). Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. *Science*, 218(4571), 433-443.

Kannangara, T. S., Eadie, B. D., Bostrom, C. A., Morch, K., Brocardo, P. S., & Christie, B. R. (2015). GluN2A^{-/-} mice lack bidirectional synaptic plasticity in the dentate gyrus and perform poorly on spatial pattern separation tasks. *Cerebral cortex*, 25(8), 2102-2113.

Kelly, A., & Stanley, C. A. (2001). Disorders of glutamate metabolism. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, 7(4), 287-295.

Kennard, J. T., Guévremont, D., Mason-Parker, S. E., Abraham, W. C., & Williams, J. M. (2009). Increased expression, but not postsynaptic localisation, of ionotropic glutamate receptors during the late-phase of long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *Neuropharmacology*, 56(1), 66-72.

Kiyama, Y., Manabe, T., Sakimura, K., Kawakami, F., Mori, H., & Mishina, M. (1998). Increased thresholds for long-term potentiation and contextual learning in mice lacking the NMDA-type glutamate receptor ε1 subunit. *Journal of Neuroscience*, 18(17), 6704-6712.

Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. *Pre-clinical models: Techniques and protocols*, 105-111.

Lau, C. G., & Zukin, R. S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6), 413-426.

Lehr, A. B., Kumar, A., Tetzlaff, C., Hafting, T., Fyhn, M., & Stöber, T. M. (2021). CA2 beyond social memory: Evidence for a fundamental role in hippocampal information processing. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 126, 398-412.

Lesca, G., Rudolf, G., Bruneau, N., Lozovaya, N., Labalme, A., Boutry-Kryza, N., ... & Szepetowski, P. (2013). GRIN2A mutations in acquired epileptic aphasia and related childhood focal epilepsies and encephalopathies with speech and language dysfunction. *Nature genetics*, 45(9), 1061-1066.

livonen, H., Nurminen, L., Harri, M., Tanila, H., & Puoliväli, J. (2003). Hypothermia in mice tested in Morris water maze. *Behavioural brain research*, 141(2), 207-213.

Mohn, A. R., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., & Koller, B. H. (1999). Mice with reduced NMDA

- receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*, 98(4), 427-436.
- Monaghan, D. T., Bridges, R. J., & Cotman, C. W. (1989). The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 29(1), 365-402.
- Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., & Seuberg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12(3), 529-540.
- Morris, R. G., Anderson, E., Lynch, G. S., & Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, 319(6056), 774-776.
- Morris, R. G. (2013). NMDA receptors and memory encoding. *Neuropharmacology*, 74, 32-40.
- Nakanishi, S., Nakajima, Y., Masu, M., Ueda, Y., Nakahara, K., Watanabe, D., ... & Okada, M. (1998). Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Research Reviews*, 26(2-3), 230-235.
- Ng, D., Pitcher, G. M., Szilard, R. K., Sertié, A., Kanisek, M., Clapcote, S. J., ... & McInnes, R. R. (2009). Neto1 is a novel CUB-domain NMDA receptor-interacting protein required for synaptic plasticity and learning. *PLoS biology*, 7(2), e1000041.
- Okuyama, T., Kitamura, T., Roy, D. S., Itohara, S., & Tonegawa, S. (2016). Ventral CA1 neurons store social memory. *Science*, 353(6307), 1536-1541.
- Packard, M. G., & Teather, L. A. (1997). Double dissociation of hippocampal and dorsal-striatal memory systems by posttraining intracerebral injections of 2-amino-5-phosphonopentanoic acid. *Behavioral neuroscience*, 111(3), 543.
- Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383-400.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier.
- Pin, J. P., & Duvoisin, R. (1995). The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology*, 34(1), 1-26.
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 3-33.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Katz, L. C., LaMantia, A. S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (2001). Circuits within the basal ganglia system. In *Neuroscience. 2nd edition*. Sinauer Associates.
- Reutlinger, C., Helbig, I., Gawelczyk, B., Subero, J. I. M., Tönnies, H., Muhle, H., ... & Caliebe, A. (2010). Deletions in 16p13 including GRIN2A in patients with intellectual disability, various dysmorphic features, and seizure disorders of the rolandic region. *Epilepsia*, 51(9), 1870-1873.
- Sans, N., Petralia, R. S., Wang, Y. X., Blahos, J., Hell, J. W., & Wenthold, R. J. (2000). A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *Journal of Neuroscience*, 20(3), 1260-1271.
- Sanz-Clemente, A., Nicoll, R. A., & Roche, K. W. (2013). Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *The Neuroscientist*, 19(1), 62-75.
- Seuberg, P. H., Burnashev, N., Köhr, G., Kuner, T., Sprengel, R., & Monyer, H. (1995, January). The NMDA receptor channel: molecular design of a coincidence detector. In *Proceedings of the*

1993 Laurentian Hormone Conference (pp. 19-34). Academic Press.

Seeburg, P. H., Higuchi, M., & Sprengel, R. (1998). RNA editing of brain glutamate receptor channels: mechanism and physiology. *Brain Research Reviews*, 26(2-3), 217-229.

Sepulveda, F. J., Bustos, F. J., Inostroza, E., Zúñiga, F. A., Neve, R. L., Montecino, M., & Van Zundert, B. (2010). Differential roles of NMDA receptor subtypes NR2A and NR2B in dendritic branch development and requirement of RasGRF1. *Journal of neurophysiology*, 103(4), 1758-1770.

Shimazaki, T., Kaku, A., & Chaki, S. (2010). D-Serine and a glycine transporter-1 inhibitor enhance social memory in rats. *Psychopharmacology*, 209, 263-270.

Shimizu, E., Tang, Y. P., Rampon, C., & Tsien, J. Z. (2000). NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. *Science*, 290(5494), 1170-1174.

Shipton, O. A., & Paulsen, O. (2014). GluN2A and GluN2B subunit-containing NMDA receptors in hippocampal plasticity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1633), 20130163.

Sprengel, R., Suchanek, B., Amico, C., Brusa, R., Burnashev, N., Rozov, A., ... & Seeburg, P. H. (1998). Importance of the intracellular domain of NR2 subunits for NMDA receptor function in vivo. *Cell*, 92(2), 279-289.

Stevenson, E. L., & Caldwell, H. K. (2014). Lesions to the CA 2 region of the hippocampus impair social memory in mice. *European Journal of Neuroscience*, 40(9), 3294-3301.

Steward, O., Coulibaly, A. P., Metcalfe, M., Dam, J. M., & Yee, K. M. (2021). AAV vectors accumulate in the pineal gland after injections into the brain or spinal cord. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 23, 406-417.

Subramaniyan, S., Hajali, V., Scherf, T., Sase, S. J., Sialana, F. J., Gröger, M., ... & Lubec, G. (2015). Hippocampal receptor complexes paralleling LTP reinforcement in the spatial memory holeboard test in the rat. *Behavioural Brain Research*, 283, 162-174.

Sun, Y. Y., Cai, W., Yu, J., Liu, S. S., Zhuo, M., Li, B. M., & Zhang, X. H. (2016). Surface expression of hippocampal NMDA GluN2B receptors regulated by fear conditioning determines its contribution to memory consolidation in adult rats. *Scientific reports*, 6(1), 30743.

Thor, D. H., & Holloway, W. R. (1982). Social memory of the male laboratory rat. *Journal of comparative and physiological psychology*, 96(6), 1000.

Tsien, J. Z., Huerta, P. T., & Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell*, 87(7), 1327-1338.

Tzakis, N., & Holahan, M. R. (2019). Social memory and the role of the hippocampal CA2 region. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 13, 233.

Vogel-Ciernia, A., & Wood, M. A. (2014). Examining object location and object recognition memory in mice. *Current protocols in neuroscience*, 69(1), 8-31.

Yang, J., Ma, Q., Dincheva, I., Giza, J., Jing, D., Marinic, T., ... & Hempstead, B. L. (2021). SorCS2 is required for social memory and trafficking of the NMDA receptor. *Molecular psychiatry*, 26(3), 927-940.

Yamamoto, H., Kamegaya, E., Hagino, Y., Takamatsu, Y., Sawada, W., Matsuzawa, M., ... & Ikeda, K. (2017). Loss of GluN2D subunit results in social recognition deficit, social stress, 5-HT2C receptor dysfunction, and anhedonia in mice. *Neuropharmacology*, 112, 188-197.

Yang, M., Silverman, J. L., & Crawley, J. N. (2011). Automated three-chambered social

approach task for mice. *Current protocols in neuroscience*, 56(1), 8-26.

Yashiro, K., & Philpot, B. D. (2008). Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*, 55(7), 1081-1094.