



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Implementación de la restitución de la proteína SAPAP3 en las neuronas de las vías estriatales de los ganglios basales

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Lic. Juan Carlos Escotto Ramírez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Francisco Torres Quiroz  
[Instituto de Fisiología Celular](#)

Dr. Oscar Vladimir Orduña Trujillo  
[Facultad de Psicología](#)

Ciudad de México, abril, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Índice

Agradecimientos académicos .....	3
Agradecimientos personales.....	4
Índice de abreviaturas .....	5
Resumen.....	6
<i>Para mi madre:</i> .....	7
Introducción .....	8
Antecedentes.....	9
Compulsiones en el Trastorno Obsesivo Compulsivo (TOC) .....	9
El acicalado excesivo como modelo de conducta compulsiva.....	10
Modelo Sapap3-KO como modelo de TOC .....	10
<b>Los sub-circuitos del estriado: un núcleo implicado en la generación del TOC.....</b>	<b>13</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>16</b>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>17</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>18</b>
Animales y caracterización genotípica .....	18
Obtención del virus AAV5-Ef1 $\alpha$ -DIO-HA-Sapap3 para su expresión en células de manera Cre-dependiente.....	19
Cirugía estereotáxica para la inyección del vector viral AAV-DIO-HA-Sapap3.....	21
Inmunofluorescencia para detección del flag HA unida a la secuencia de Sapap3.....	21
Resultados .....	23
Discusión .....	31
Conclusiones .....	34
Perspectivas .....	34
Información complementaria.....	35
Bibliografía .....	38

## Agradecimientos académicos

Para el desarrollo de la presente el alumno recibió la beca por parte del CONACyT: CVU 10245367. Y el apoyo financiero a los proyectos del laboratorio por parte de CONACyT ciencia básica 220412, Fronteras de la Ciencia CONACyT 2022 and 2019/154039, PAPIIT-UNAM IA200815, IN226517, IN203420 además de la beca Marcos Moshinsky.

Al Dr. Fatuel Tecuapetla Aguilar del laboratorio de Sub-circuitos neuronales BL-202 del IFC-UNAM, por sus enseñanzas, confianza y apoyo a lo largo de este proyecto. Me ha mostrado un lado de las neurociencias que alimenta mi curiosidad y motivación.

Al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín del laboratorio de sub-circuitos neuronales BL-202 del IFC-UNAM, por su asesoría y colaboración en el mantenimiento, reproducción, genotipificación de los ratones transgénicos la optimización de las cirugías estereotáxicas y la extracción de la secuencia HA-Sapap3 utilizada para la creación del plásmido utilizado en este trabajo. Por toda su enseñanza, paciencia y apoyo en el avance y conclusión del proyecto, así como por su gran contribución en mi crecimiento académico.

Al Dr. Francisco Torres Quiroz y al Dr. Óscar Vladimir Orduña Trujillo: por la revisión de este trabajo, así como sus críticas constructivas que alimentaron mi formación académica.

Al Ingeniero Galván Lobato Aurey y al Ingeniero Manuel Ortinez Benavidez por su apoyo técnico.

A la Mvz. Cllaudia Rivera Cerecedo y el Mvz. Héctor Malagón Rivera y a la Unidad de Bioterio del IFC: sin sus constancias, entrenamiento y apoyo nada en el proyecto hubiera sido posible.

A mis compañeros del laboratorio BL-202. En especial a la Dra. Kathia Itzel Ramírez Armenta por implementar la sepa Sapa3-KO y doble transgénico; y al Dr. Rubén Darío Contreras López por su orientación académica y apoyo en cada duda.

#### Agradecimientos personales

A mis hermanos Arturo y Emmanuel: ustedes dos son mis grandes amores y espero esto sirva como una pequeña muestra de lo que se puede hacer por alcanzar una meta. Los amo.

A mis amigos Rebeca, Francisco, José Antonio, Jorge Armadillo, Jorge Ortega, Alberto Calva y Erick Solís: las pláticas con ustedes me mantuvieron a flote en cada pequeño paso por esta maestría.

A mi abuela Patricia Beltrán: gran mujer, tremendo ser humano con una mente extraordinaria. Te amo.

A Sofía Vaquero: un gran amor que se convirtió en una gran amistad. Gracias por escucharme en todo momento y darme ánimos en tu muy peculiar estilo.

Nuevamente: a los olvidados que son muchos para recordarlos.

## Índice de abreviaturas

AP	Anteroposteior
CG	Corteza cingulada
COF	Corteza Orbitofrontal
CPF	Corteza Prefrontal
D1	Receptor a dopamina tipo 1
DV	Dorsoventral
GPI	Globo pálido interno
HA	Hemaglutinina
KO	Knockout
M2	Corteza Motora secundaria
ML	Mediolateral
SAPAP3	Proteína de unión SAP3/PSD-95 3
SNpr	Sustancia nigra pars reticulata
STN	Núcleo subtalámico
TEC	Tomografía por Emisión de Positrones
TOC	Trastorno Obsesivo-Compulsivo
WT	Wild-Type

## Resumen

El trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) se caracteriza por presentar compulsiones, definidas como conductas repetitivas que afectan la calidad de vida de los sujetos. Para estudiar la generación de las compulsiones, en este estudio se utilizó el modelo de ratón deficiente de la proteína SAPAP3 (Sapap3-KO). SAPAP3 tiene como función acoplar a la proteína PSD-95 a la membrana celular; a su vez, PSD-95 permite anclar a la membrana a los receptores NMDA y AMPA. La expresión de la proteína SAPAP3 sucede en mayor medida en el estriado en comparación a otras estructuras cerebrales y cuando no se expresa SAPAP3, como es el caso de los ratones Sapap3-KO, los animales presentan una conducta tipo compulsiva llamada acicalado excesivo. El modelo Sapap3-KO permite el estudio de los mecanismos subyacentes a algunas compulsiones de tipo motor. Se han caracterizado dos vías en el estriado: la directa e indirecta. La hipótesis más común sugiere que la primera promueve la actividad, mientras que la segunda la inhibe; aunque recientemente se ha cuestionado esta visión (Cui 2013). La restitución de la proteína en el estriado permite preguntar si la presencia de la SAPAP3 en una u otra vía afecta la expresión del acicalado excesivo. Los resultados preliminares de este trabajo indican que la restitución de Sapap3 en la vía indirecta aumenta el acicalado excesivo; mientras que su restitución en la vía directa muestra una tendencia a disminuirlo. Estos resultados suman al entendimiento de la configuración del estriado sobre la presencia de compulsiones de tipo motor.

Para futuros trabajos, planteamos la restitución de la proteína SAPAP3 en diferentes etapas del desarrollo y en ambas vías, además de su evaluación en conductas repetitivas aprendidas.

*Para mi madre:  
Ojalá este trabajo valiera alguno de tus sacrificios.*

*Te amor y admiro.*



## Introducción

Desde el punto de vista clínico, las compulsiones son precedidas por pensamientos recurrentes, urgentes e involuntarios que producen ansiedad; todo esto en conjunto entran en la categoría de obsesiones. Para detener la presencia de las obsesiones se llevan a cabo conductas repetitivas, ritualísticas, secuenciales y desadaptativas llamadas compulsiones (Denys, 2011). Tanto las obsesiones como las compulsiones son dos elementos que convergen en el trastorno obsesivo-compulsivo (TOC) (Asociación Estadounidense de Psiquiatría, 2013), que afecta al 1% de la población mundial (Franklin & Foa, 2011) y entre el 1-5% de la población mexicana (Salud, 2016).

Para aproximarnos al estudio de las compulsiones, en este estudio, utilizamos el modelo de ratón Sapap3-KO. Estos ratones presentan acicalado excesivo que les produce cicatrices en el rostro y cuerpo, observando que la restitución de Sapap3 en el estriado les disminuye el acicalado excesivo (Welch, 2006). El estriado está constituido por dos vías de proyección: la vía directa e indirecta. Cada una expresa diferentes receptores de dopamina: la vía directa receptores D1, mientras que la indirecta D2. Esto nos permite preguntar: ¿se lograrán ver efectos similares a los reportados por Welch si la restitución se realiza de manera específica en cada una de las vías de manera independiente? La hipótesis más utilizada es que ambas vías contribuyen de manera opuesta al movimiento: la vía directa promoviendo el movimiento y la indirecta inhibiéndolo (Gerfen, 2000; Kravitz, 2012). Esta idea nos hace suponer que la restitución de SAPAP3 en la vía directa facilitará el acicalado excesivo, mientras la restitución en la vía indirecta lo decrementará en los ratones Sapap3-KO. Por otro lado, hay trabajos que hablan de una cooperación entre ambas vías en el momento de realizar tareas particulares: como seleccionar el programa motor adecuado para realizar una tarea específica (Peak y Balleine, 2019; Cui, 2013). Esto nos hace suponer que no será suficiente la restitución de SAPAP3 en las vías independientes para afectar el acicalamiento excesivo. Para poner a prueba estas hipótesis desarrollamos una estrategia para la expresión de SAPAP3 en las vías específicas del estriado de ratones Sapap3-KO.

## Antecedentes

Para poder abordar el tema de la restitución de la proteína SAPAP3 en el estriado y sus efectos sobre la generación de compulsiones, usando el acicalamiento excesivo como modelo, en esta sección se abordará qué son las compulsiones y su relación con el trastorno obsesivo-compulsivo, así como su relación con el estriado.

### Compulsiones en el Trastorno Obsesivo Compulsivo (TOC)

El tener conductas repetitivas, secuenciales y ritualistas puede empezar como acciones para conseguir objetivos particulares que, con el reforzamiento continuo, se vuelven habituales. Se hipotetiza que, en pacientes con TOC, existe alteraciones entre el aprendizaje *goal-directed* y la formación de hábitos creando obsesiones que sólo pueden ser atenuadas con las compulsiones observadas en el trastorno (Gillan, 2015).

Las acciones guiadas por objetivos se asocian al modelo basado en evidencia (*model-based*), mientras que las acciones habituales se asocian al modelo libre (*model-free*) (Robbins, Vaghi & Banca, 2019). En el modelo basado en evidencia se generan estrategias para resolver problemas de forma prospectiva, fundamentadas en el conocimiento del conjunto de experiencias y el entorno. Mientras que, en el modelo libre, las acciones que fueron recompensadas se repiten con mayor probabilidad (Gillan, 2016). Cuando se usa el modelo basado en evidencia se exploran las alternativas del ambiente para solucionar un problema (conducta explorativa); mientras que en el modelo libre se explota lo aprendido (conducta explotativa) y se repite sin discreción (Cohen, 2007).

Se sabe que cuando no tenemos información previa para resolver un problema, los humanos tendemos a usar el modelo libre y, según vamos acumulando información, pasamos al modelo *goal-directed* (Robbins et. al., 2019). En el caso de personas diagnosticadas con TOC, este cambio no se lleva a cabo de forma natural y sólo es posible cuando se brinda la información de manera explícita (Mia, 2020).

### El acicalado excesivo como modelo de conducta compulsiva

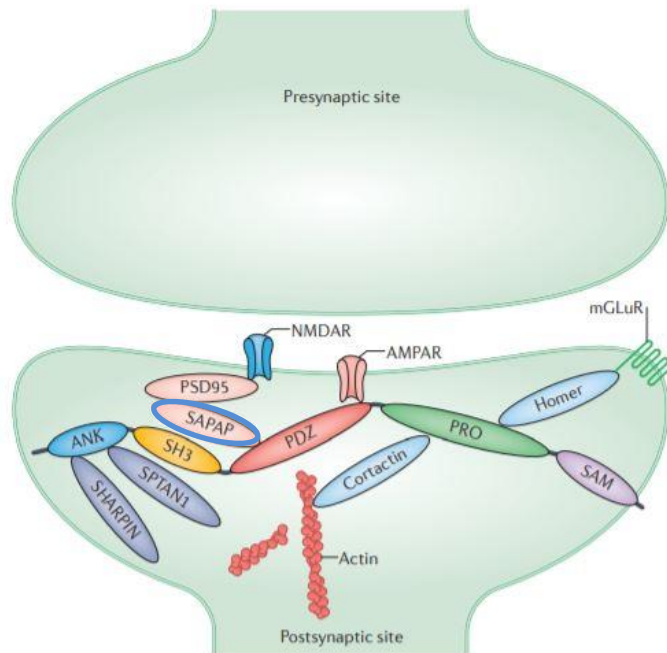
Los modelos animales se aproximan al estudio del TOC a través de la generación de conductas tipo compulsivas ya sea con fármacos, estimulación optogenética o modificaciones genéticas (Veenstra-Vanderweele, 2017; Ahmari, 2013). Se han usado fármacos agonistas de los receptores dopaminérgicos, como el quinpirol, y modelos conductuales en busca de conductas que se asemejan a las compulsiones en humanos (Szechtman, 2001; Szechtman, 2017). La mayoría de estos trabajos logran aproximarse a un primer análisis de las conductas compulsivas en animales; aunque en algunos casos probar la participación de las mismas regiones cerebrales involucradas en los humanos es difícil. Incluso la utilización de los fármacos comunes en el tratamiento del TOC suele no tener efectos. La correcta caracterización de las conductas compulsivas es, en general, el principal problema.

Los modelos genéticos han sido una herramienta valiosa en la generación de modelos animales capaces de resolver las limitantes descritas.

### Modelo Sapap3-KO como modelo de TOC

El modelo más utilizado en la aproximación al estudio de TOC es el ratón Sapap3-KO (Albelda & Joel, 2012). Estos ratones presentan acicalado excesivo que les causa heridas profundas en el rostro y un aumento en las conductas que reportan ansiedad.

La proteína SAPAP3 es una isoforma de la proteína SAPAP que se describió por primera vez a mediados de los años noventa del siglo pasado. Es una proteína intracelular encargada de anclar y movilizar a PSD-95 (proteína de anclaje a membrana), cuya función es regular la presencia de receptores de glutamato en la célula (**Figura 1**). Restringir la expresión de SAPAP impide el transporte de PSD-95 a la parte interna de la membrana celular donde tiene su función (Satoh, 2002; Hata, 1997). SAPAP cuenta con cuatro isoformas: SAPAP1, SAPAP2, SAPAP3 y SAPAP4 con una similitud del 50% entre ellas (Satoh, 2002). Todas se expresan en el cerebro con pequeñas diferencias según el núcleo estudiado, en particular la isoforma SAPAP3 se expresa con mayor presencia en el estriado (Welch, 2004).



**Figura 1. Localización de la proteína SAPAP.** Esquema extraído de Monteiro y Feng (2017), donde se observa a la proteína SAPAP (óvalo azul con naranja) unida a la proteína PSD-95 misma que permite anclar a los receptores glutamatérgicos NMDA y AMPA a la membrana post-sináptica. PSD-95: Proteína de Densidad Postsináptica-95; NMDAR: Receptor de N-metil de Aspartato; AMPAR: receptor del  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolo-propinico; SH3: Shank-3; PDZ: disco de dominios de interacción con las proteínas de asociación SAP90/PSD-95; ANK: dominio repetido de ankirina N-terminal; SPTAN1: proteínas no eritrocíticas 1; PRO: dominios ricos en prolina; mGLuR: receptores metabotrópicos de glutamato.

A los ratones Sapap3-KO se les agrega un casete de resistencia a neomicina en el exón 3 donde se encuentra el gen encargado de expresar a la proteína Sapap3 (**Figura 3A**). Al inhibir la expresión de esta isoforma, los ratones presentan acicalado excesivo (Welch, 2007). Siguiendo la relación de la actividad en la corteza orbitofrontal (COF) y el estriado en humanos, la estimulación optogénica de los axones provenientes de la COF al estriado, en animales Sapap3-KO, mostró una disminución en el acicalado excesivo (Burguière, 2013). Probablemente debido a que las señales que la COF envía al estriado se encuentren disminuidas; mientras que las entradas de la corteza motora secundaria (M2) están incrementadas (Corbit, 2019). Recientemente, se han documentado cambios morfológicos en las neuronas de los ratones Sapap3-KO, observando una disminución en el área de los axones cortico-estriatales que inervan al estriado asociativo, mismo que comprende al estriado dorsal (Schreiweis, 2021). El estriado dorsal tiene un papel importante en

el aprendizaje asociativo y el aprendizaje *goal-directed* (Yin, 2003), lo que podría explicar los problemas de aprendizaje en los animales Sapap3-KO.

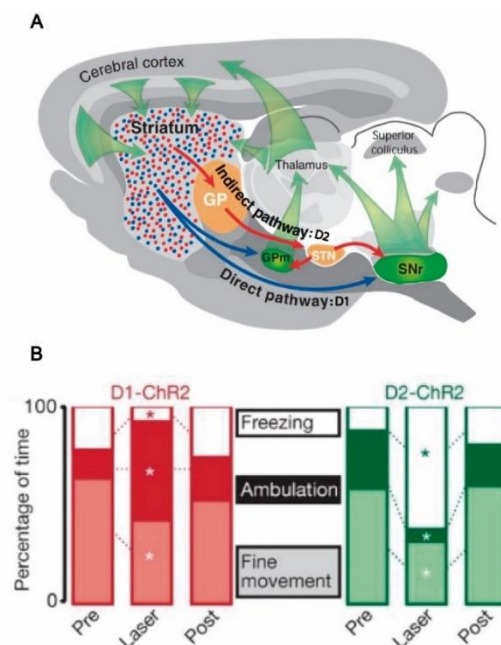
Los ratones Sapap3-KO tienen déficits en el aprendizaje que se asemejan a déficits de los humanos con TOC. Los ratones Sapap3-KO son capaces de discriminar entre dos diferentes estímulos en una tarea de condicionamiento pavloviano; pero si se aplica un aprendizaje reverso el cambio de regla no es adoptado adecuadamente (Van den Boom, 2018). Al igual que los humanos con TOC, los ratones Sapap3-KO tienen problemas para aprender un cambio de regla (Denys et al., 2020), probablemente debido a dificultades para cambiar entre el aprendizaje *goal-directed* y el habitual (Ehmer, 2020; Hadjas, 2019).

En el modelo Sapap3-KO el acicalado exacerbado se considera una conducta compulsiva, utilizándose como modelo animal de TOC; administrar fluoxetina, fármaco común en el tratamiento del TOC en humanos, disminuye el acicalado excesivo en este modelo (Welch, 2007). Otros modelos genéticos también presentan acicalado excesivo con el inconveniente de expresar efectos secundarios no relacionados con el TOC (Albelda y Joel, 2012). El modelo más cercano y parecido al ratón Sapap3-KO es el modelo Slitrk-5 que presenta varias similitudes con el Sapap3: se expresa en mayor medida en el estriado, afecta a los receptores glutamatérgicos, produce acicalado excesivo y tiene reacciones positivas cuando se les administra fluoxetina (Song y Glatt, 2016). Sin embargo, los estudios para conocer más acerca de las características neurobiológicas del modelo son escasas, lo que lo hace menos ventajoso para el estudio del TOC.

El restituir Sapap3 en el estriado (con 8 microinyecciones a diferentes niveles en el eje dorsoventral con un lentovirus) en animales Sapap3-KO con 10 días de vida, disminuye el acicalado excesivo y las conductas de ansiedad (Welch, 2007). En los ratones Mecp2-KO, mismos en los que se impide la expresión de una proteína encargada de la expresión de Sapap3, además de presentar acicalado excesivo, también presentan menor tamaño y peso. (Mahgoub, 2016). Ambos estudios restituyeron la proteína SAPAP3 de manera general en el estriado sin distinguir entre los diferentes tipos celulares que componen lo componen.

## Los sub-circuitos del estriado: un núcleo implicado en la generación del TOC

En el humano, el núcleo caudado y el putamen están vinculados con el TOC (Williams and Eskandar, 2006); ambos núcleos se relacionan con el control del movimiento, el aprendizaje asociativo y el aprendizaje guiado por objetivos/consecuencias (Bergstrom, 2020; Wood and Ahmari, 2015). Estas funciones se han estudiado en su homólogo en ratones: el estriado. En la organización funcional del estriado se identifican dos diferentes vías que reciben entradas sinápticas de la corteza, las cuales influyen la actividad del tálamo y, posteriormente, de regreso a la corteza (**Figura 2**). El estriado está conformado por neuronas espinosas medianas –mismas que componen el 90% de la población neuronal de este núcleo- las cuales se subdividen en dos vías: neuronas de la vía directa y neuronas de la vía indirecta (**Figura 2A**) (Gittis y Kreitzer, 2011). Las células de cada vía se caracterizan por el tipo de receptor dopaminérgico que expresan. En el caso de las neuronas de la vía directa se encuentra el receptor a dopamina tipo D1, estas neuronas proyectan a la *sustancia nigra pars reticulata* (SNpr) y al globo pálido segmento interno (GPi) que mandan proyecciones de salida al tálamo (Gerfen, 2006). Por otra parte, en la vía indirecta se encuentran receptores tipo D2 a dopamina, estas neuronas proyectan al globo pálido segmento externo, el cual, a su vez, proyecta al núcleo subtalámico, influenciando a la SNpr y al GPi (Gerfen, 2006).



**Figura 2. En el estriado hay dos vías de proyección y su activación tiene efectos opuestos sobre el desplazamiento**

- A) Esquema tomado de Gerfen (2006), donde se observa un corte sagital del cerebro de un ratón, ilustrando las dos vías del estriado: la directa expresando receptores D1 y la indirecta expresando receptores D2. GP: globo pálido; STN: núcleo subtalámico; GPM: globo pálido segmento interno; SNr: sustancia nigra pars reticulata.
- B) Experimento realizado por Kravitz et al. (2010), donde comprobó que al estimular con optogenética a la vía directa la ambulación aumenta; mientras que al activar en la vía indirecta aumenta la inmovilidad (freezing).

Se ha caracterizado la función de cada una de las vías y se propone que la vía directa se encarga de iniciar la actividad motora, mientras que la indirecta la inhibe (Hikosaka, 2000; Macpherson et al., 2014). Así lo han demostrado estudios donde la estimulación optogenética de cada vía en el estriado dorsomedial causa un aumento en el desplazamiento de roedores cuando se activa a las neuronas de la vía directa y una disminución cuando se activa a las neuronas de la vía indirecta (Kravitz, 2010; **Figura 2B**). Un modelo alternativo propone que ambas vías trabajan de manera cooperativa para la realización de acciones particulares (Peak y Balleine, 2019). Experimentos han comprobado que bajo tareas donde los ratones deben rotar la cabeza a la izquierda o derecha para recibir una recompensa, la actividad de las neuronas en ambas vías se activa (Cui, 2013), sugiriendo un trabajo conjunto entre ambas vías para lograr objetivos particulares.

Estudios con tomografía por emisión de positrones (TEP) han permitido relacionar zonas en el cerebro con la presencia del TOC. En específico, tanto la corteza orbitofrontal (COF) como el núcleo caudado presentan anomalías en el metabolismo de pacientes con TOC (Baxter, 1987); incluso si los pacientes solo presentan conductas compulsivas debido a daño cerebral, las mismas regiones cerebrales presentan una actividad alterada (Leplante, 1987). Experimentos en modelos animales, en ratones donde se estimula la región ventral de la COF o sus proyecciones axonales en el estriado ventro-medial, producen la conducta compulsiva del acicalado excesivo (Ahmari, 2013). Estos datos clínicos como los hallazgos en modelos animales apuntan a una relación entre la presencia de compulsiones y el estriado. Además de la COF, otras regiones corticales han sido relacionadas a la generación de compulsiones tales como la corteza prefrontal

(CPF) y la corteza cingulada (CG) (Saxena et al., 2009; Graybiel y Rauch, 2000). Aunque la evidencia actual describe la forma en la que los ganglios basales se comunican a lo largo de los diferentes núcleos que lo conforman, no hay información suficiente para explicar la generación de las conductas compulsivas con la vía directa o indirecta. Recientemente el grupo en el que se desarrolló esta tesis publicó un trabajo donde la inhibición optogenética de la vía indirecta en animales Sapap3-KO disminuye el acicalado excesivo (Ramírez-Armienta y Tecuapetla, 2021). El resultado por sí mismo no nos permite inferir la importancia de la proteína SAPAP3 en cada una de las vías para la generación del acicalado; sin embargo, sí nos permite deducir que su ausencia cambia la actividad de la vía indirecta. Este trabajo busca preguntar cómo la restitución de la proteína SAPAP3 en una u otra vía afecta el acicalado excesivo en el modelo Sapap3-KO.



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Las compulsiones son uno de los principales síntomas del TOC, este trastorno afecta la calidad de vida de las personas. Sabemos la relación del estriado en las compulsiones y recientemente se ha encontrado que la ausencia de la proteína SAPAP3 produce un animal con acicalado excesivo, lo cual se usa como modelo de para estudiar compulsiones. Dados los antecedentes actuales aún no se sabe si la restitución de la proteína SAPAP3 en el estriado de manera vía específica tiene consecuencias particulares. En el presente trabajo planteamos implementar una estrategia que nos permita restituir la proteína SAPAP3 de manera específica en las vías del estriado en animales dobles transgénicos. Para la vía directa utilizaremos ratones Sapap3-KO D1-Cre, debido a que las neuronas de la vía directa presentan en mayor medida receptores a dopamina de la familia D1. En el caso de la vía indirecta haremos uso de ratones Sapap3-KO A2A-Cre ya que el receptor a adenosina A<sub>2a</sub> se encuentra acoplado al receptor D2, presente únicamente en la vía indirecta. También creamos un vector viral capaz de restituir de manera Cre-dependiente la proteína SAPAP3. En conjunto, estas estrategias permitirán contestar la pregunta que se plantea a continuación.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Qué efectos tiene la restitución de Sapap3 en las vías directa o indirecta del estriado en ratones Sapap3-KO sobre el acicalado excesivo?

## **HIPÓTESIS**

La restitución de SAPAP3 en la vía directa incrementará el acicalado; mientras que su restitución en la vía indirecta lo extinguirá.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

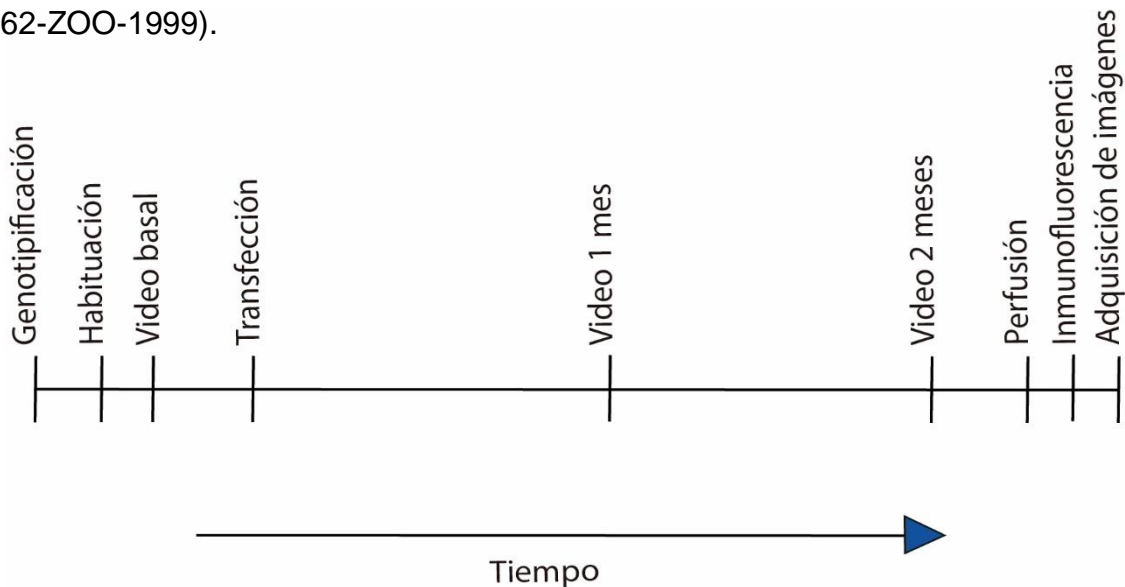
Restituir SAPAP3 de forma específica en la vía directa o indirecta del estriado en ratones Sapap3-KO.

### **Objetivos Particulares**

- Obtener una estrategia para la restitución de Sapap3 de manera Cre dependiente.
- Evaluar el restablecimiento de SAPAP3 de manera independiente en la vía directa e indirecta en la conducta de acicalamiento excesivo en animales Sapap3-KO.

## METODOLOGÍA

La unidad del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), aprobó todos los procedimientos para el cuidado y uso de animales de laboratorio (Protocolo número FT121-17). Este protocolo sigue la Norma Nacional para el uso de Animales (NOM-062-ZOO-1999).



Animales y caracterización genotípica. Una de las diferencias entre la vía directa e indirecta depende de los receptores a dopamina. En la vía directa se expresa el receptor de la familia tipo D1; en la indirecta el receptor de la familia D2 acoplado al receptor adenosina  $A_{2a}$  (Greenwood, 2019; Schwarschild, 2006). Para controlar la restitución de la proteína SAPAP3 en las vías específicas del estriado, se utilizaron ratones macho y hembras de entre 2-4 meses de edad provenientes de la cruce de Sapap3-KO con C57BL/6, de la cruce de Sapap3-KO con A2A Cre o Sapap3-KO con D1 Cre. Originalmente los ratones Sapap3-KO y los animales Cre fueron obtenidos de la cruce de un ratón Sapap3-KO o Sapap3<sup>+/-</sup> con ratones A2A-Cre y D1-Cre respectivamente. Todos estos animales fueron generados en el bioterio del IFC, posterior a la adquisición del Sapap3-KO (Jackson #008733) y la donación de los ratones Cre por parte del Dr. Rui Costa (*Champalimaud Foundation*).

Los animales Cre expresan de forma constitutiva la enzima cre recombinasa. Este animal transgénico nos permitió expresar la enzima Cre en la vía directa o indirecta. El sistema Cre/loxP, consiste en secuencias de ADN loxP (locus de X-over- P1) que

flanquean una secuencia invertida de ADN. La enzima Cre reconoce los sitios loxP y gira la secuencia permitiendo su transcripción.

Para obtener el genotipo de los animales se tomaron muestras de tejido (cola) y se procesaron con la técnica de PCR siguiendo el protocolo Phire Animal Tissue Direct PCR Kit (Thermo scientific), 35 ciclos, a una temperatura de 72°C para la polimerización, en un gel de agarosa al 3%. Cebadores para la PCR Cre: Fwd CTA GGC CAG AGA ATT GAA AGATCT; Rev: GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATCATC. Cebadores para la PCR Sapap3-KO: Fwd: TTG ATT ACT TGG TTC; Rev: CCA GCT CTC GGA GCA CAG. Todos los animales fueron alojados bajo un ciclo de 12 h luz/oscuridad, con acceso *ad libitum* a agua y comida de acuerdo con el permiso CICUAL FTA121-17 aprobado por el IFC de la UNAM.

Obtención del virus AAV5-Ef1 $\alpha$ -DIO-HA-Sapap3 para su expresión en células de manera Cre-dependiente

Obtención de la secuencia Sapap3-HA. Con el objetivo de crear un vector viral capaz de restituir a la proteína SAPAP3, el laboratorio de la Dra. Lissa Monteggia donó el pAAV-hSyn-HA-SAPAP3 (**Figura 4A**). El plásmido se amplificó en células ultracompetentes JM109. Las células transformadas se cultivaron en un medio líquido con ampicilina para seleccionar las células que expresaran el plásmido y se recuperó el DNA plasmídico por centrifugación a 225 rpm por una hora a 37°C. Posteriormente, se realizó un cultivo en medio sólido (también con ampicilina, durante toda la noche). Se lisaron las células para recuperar el plásmido utilizando el protocolo por columnas de Qiagen. Se realizó un proceso de digestión para obtener la región de interés HA-Sapap3 para lo que se emplearon las enzimas de restricción EcoRV y SpeI. A través de un gel de agarosa se comprobó la recuperación de la región de interés HA-Sapap3 (2934 Kb) (**Figura 4B**).

Inserción de la secuencia HA-Sapap3 en un plásmido DIO. Ya que contamos con animales transgénicos capaces de expresar a la enzima cre-recombinasa en las dos vías del estriado, insertamos la secuencia HA-Sapap3 en un plásmido que permitiera la expresión de la proteína de manera Cre-dependiente. Se detectaron bases erróneas a través de la secuenciación del plásmido (Genscript) y se corrigieron por mutagénesis dirigida. Después, se obtuvo una secuencia correcta de HA-Sapap3 (similar a la reportada en Mahgoub, 2016). Posteriormente se procedió

a insertar esta secuencia en un segundo plásmido, este segundo plásmido fue el pAAV-Ef1a-DIO-eYFP (addgene #p27056), del cual se removió la región eYFP (588 pb) usando las enzimas NheI y AclI (Figura 4), para luego insertarle la secuencia HA-Sapap3, en el mismo sentido. Con esto se obtuvo el plásmido pAAV-Ef1a-DIO-HA-SAPAP3 (Figura 4A).

Ensayo de digestión del plásmido pAAV-DIO-HA-Sapap3. Se realizaron tres ensayos independientes de digestión con las enzimas Eco RI, Xho I y Sal I. En la tabla 1, 2 y 3 se pueden observar los sitios de corte de cada enzima junto al tamaño de los fragmentos resultantes (**Información suplementaria**). Se hizo un gel de agarosa al 0.7%. En los ensayos de Xho I y Sal I se utilizaron 2 µl de buffer NEB, 7 µl de H<sub>2</sub>O, 0.5 µl de la enzima y 1.5 µl del plásmido (Figura suplementaria 1). Para el ensayo de Eco RI se utilizó 1 µl de buffer para Eco RI, 7 µl de H<sub>2</sub>O, 0.5 µl de la enzima y 1.5 µl del plásmido (**Figura 4A y Figura suplementaria 1**).

Cultivos organotípicos para la expresión del plásmido pAAV-DIO-HA-Sapap3 Cre-dependiente. Para comprobar que el plásmido generado expresara a la proteína SAPAP3 de manera Cre-dependiente, se utilizaron cultivos organotípicos de hipocampo de ratones Emx1 Cre. Los cultivos se obtienen a partir de la extracción del cerebro de animales con 10 días de nacidos. Los ratones Emx1-Cre expresan la proteína cre recombinasa en función de la expresión de la proteína Emx1, misma que se traduce durante el desarrollo de los ratones en el hipocampo y corteza. El cerebro se monta en un vibratomo sumergido en PBS 0.1 M y se obtienen cortes de 350 micras. Los cortes se mantuvieron en medio de cultivo MEM (Invitrogen) suplementado con suero de caballo inactivado al 20%, GlutaMAX 1 mM (Invitrogen), D-glucosa 27 mM, HEPES 30 mM, NaHCO<sub>3</sub> 6 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, ácido ascórbico 25% e insulina 10 mg/ml, a un pH 7.3 y una osmoralidad de 300-310 mOsm. Los cultivos se mantuvieron a 37°C a una atmósfera saturada de vapor de agua con O<sub>2</sub> 95% y CO<sub>2</sub> 5% de 8 a 12 días, cambiando el medio cada dos días.

Transfección balística del plásmido pAAV-DIO-HA-Sapap3. Los cultivos organotípicos fueron transfectados usando el método balístico de transfección Helios gene gun (Bio-Rad). El principio básico de esta técnica es cubrir partículas de oro de 1.6 µm de diámetro (Bio-Rad) con ADN (100 µg) del plásmido

pAAV-DIO-HA-SAPAP3. Las partículas de oro se introducen directamente a la rebanada utilizando helio a una presión de 180-200 psi.

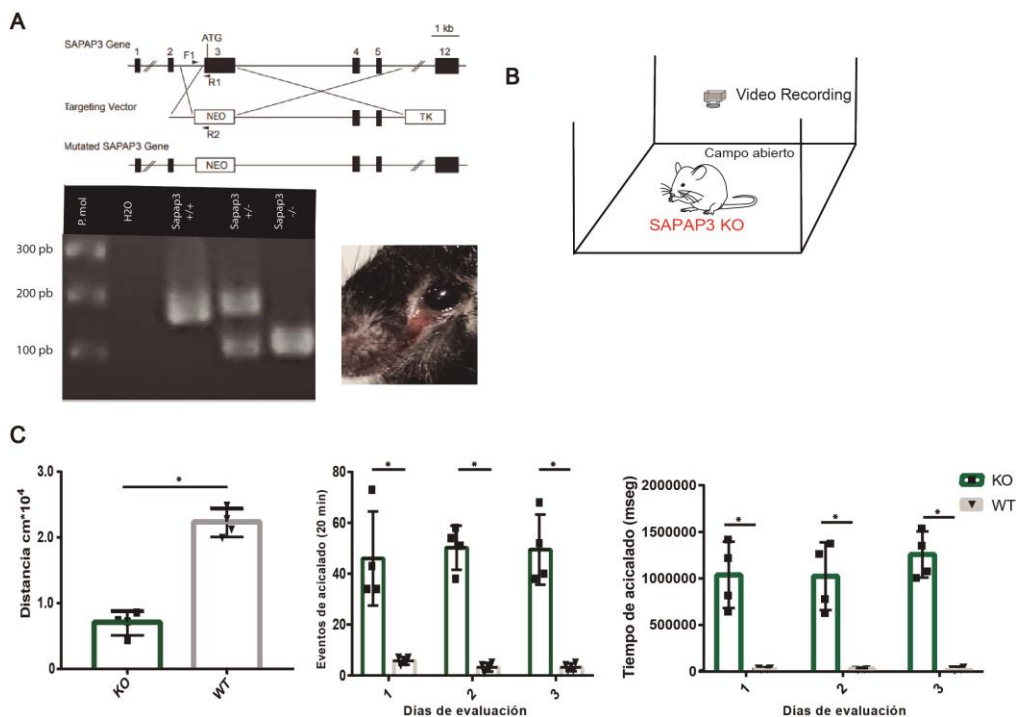
Cirugía estereotáxica para la inyección del vector viral AAV-DIO-HA-Sapap3. En otra serie de experimentos, los animales se anestesiaron con isoflurano al 1% mezclado con oxígeno (1 l/min). La región de interés para la inyección del vector viral fue el estriado dorsomedial: coordenadas anteroposteriores a Bregma (AP) +0.5 mm, mediolateral (ML) 2.0 mm y dorsoventral (DV) -2.2 (Paxinos, 2001). Se inyectó el vector viral AAV5-HA-Sapap3 a una velocidad de TITER 9.2 nl/5 s hasta completar un volumen total de 1000 nl, con ayuda de un nanoinyector (Nanoyect II, Drummond Scientific) y una micropipeta de vidrio con punta de 30  $\mu$ m. La pipeta se mantuvo en el sitio de inyección durante al menos 10 minutos para permitir la difusión del vector. Se utilizó el vector viral AAV-DIO-eYFP y AAV-hSyn-eYFP para los grupos control. Los animales permanecieron en el área de cirugía 2 días para su recuperación y después fueron trasladados al vivario del IFC.

Inmunofluorescencia para detección del flag HA unida a la secuencia de Sapap3. Los cerebros fueron extraídos de los animales transfectados dos meses después de la cirugía con el método de perfusión. El tejido se almacenó en PFA al 4% p.H 7.4 por un día. Después se hicieron cortes coronales de 100 micras de grosor con vibratomo (Vibratome series 1000), y las rebanadas se almacenaron en pozos con PB al 0.1 M p.H 7.4. Todas las muestras pasaron por tres lavados de 5 minutos en PB 0.1 M. Se permeabilizó la muestra con una solución de Tritón X-100 al 0.3% en PB 0.1 M durante 10 minutos. El bloqueó se hizo con 10% BSA, 0.3% de Tritón X-100 en PB 0.1 M durante 40 minutos. Se tomaron 5  $\mu$ l del anticuerpo primario HA anti-rabbit (#3724, Cell Signaling Technology) y se mezcló en 500  $\mu$ l de PB 0.1 M, usando una dilución final de 1:1000. Se incubó la muestra por 48 horas a temperatura ambiente con agitación constante. Pasado ese tiempo, se hicieron cinco lavados de 5 minutos con PB 0.1 M. El protocolo continuó con la adición del anticuerpo secundario Alexa 488 anti-goat (#A27034, Thermo Fisher), dejando el tejido sumergido en 200  $\mu$ l durante 2 horas a temperatura ambiente. Por último, se hicieron cinco lavados de 5 minutos en PB 0.1 M y el tejido se montó en portaobjetos con medio de montaje (Mowiol). Las muestras se analizaron en el microscopio confocal LSM700 (10x, láser 488 nm).

Medición de actividad motora para comprobar los cambios en el acicalado. Los ratones fueron colocados en un campo abierto (30x30 cm) y videograbados con ayuda de dos cámaras colocadas en dos ángulos diferentes: cenital y nadir. Los animales se separaron en cajas individuales 3 días antes de la primera sesión, alojándolos en el vivario del área de neurociencias del IFC. Posteriormente se colocaron en el cuarto del campo abierto por 20 minutos para su habituación (Figura 3B). Las sesiones duraron 20 minutos y se realizaron por 3 días consecutivos; el procedimiento se repitió en la línea base (LB), al mes (1 mes) y a los dos meses (2 meses). El acicalado se midió a mano. Para obtener el desplazamiento, se utilizó el programa Bonsai (versión 2.6.3, Goncalo Lopes) para tener las coordenadas x y y del animal y así definir el centroide. Las coordenadas resultantes fueron procesadas en Matlab (R20202a) para conocer la distancia en pixeles del centroide cuadro por cuadro.

## Resultados

En este trabajo usamos animales Sapap3-KO los cuales fueron originalmente creados reemplazando el exón 3 con un casete de resistencia a neomicina, para interrumpir la transcripción del gen Sapap3 (Welch, 2006). Se comprobó la generación de ratones Sapap3-KO con una PCR donde los animales Sapap3-KO presentan el caset de neomicina (**Figura 3A**). Estos mismos ratones presentaron el fenotipo reportado por otros autores: heridas faciales debido al acicalado excesivo (inserto en **Figura3A**), una disminución en la distancia recorrida (**Figura 3C-izquierda**, U de Mann Whitney,  $p= 0.028$ ), aumento del acicalado en comparación a ratones WT (**Figura 3C-panel de en medio**, prueba U de Mann Whitney,  $p= 0.026$ ) y un mayor tiempo acicalándose (**Figura 3C-derecha**; prueba U de Mann Whitney,  $p < 0.05$ ).

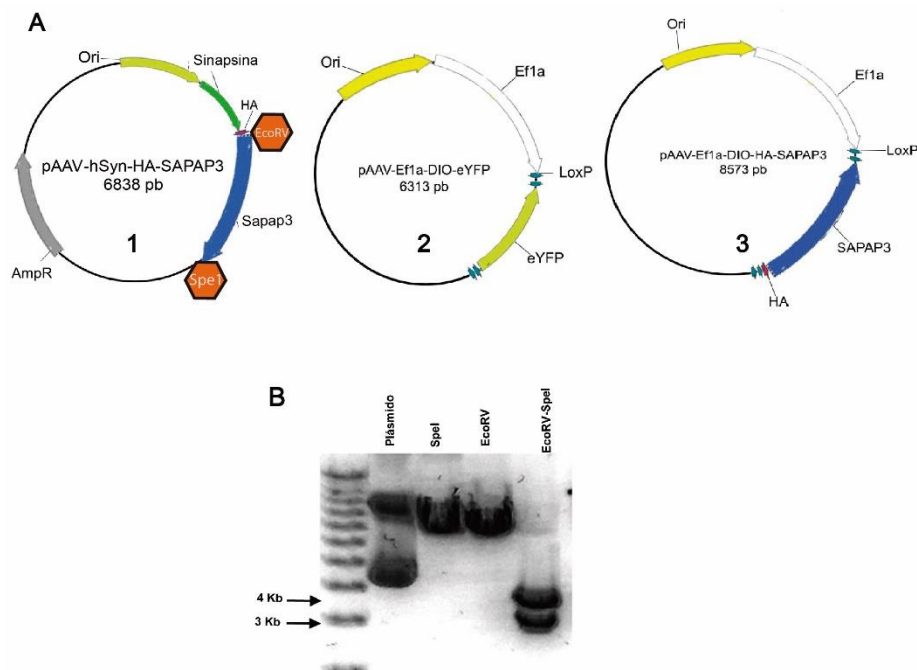


**Figura 3. Modelo Sapap3-KO utilizado en este estudio.**

- El exón 3, donde se halla el gen Sapap3, es reemplazado por un casete de resistencia a neomicina para impedir la transcripción del gen Sapap3. Esquema extraído y modificado de Welch et. al 2006. Abajo, genotipificación de ratones Sapap3-KO y las heridas generadas en un animal representativo.
- Esquema del campo abierto utilizado para videoregistrar el acicalado en los ratones WT y Sapap3-KO.
- Comparación de distancia recorrida, eventos de acicalado y tiempo entre animales WT y Sapap3-KO. WT: n= 4; Sapap3-KO: n= 4; \*  $p > 0.05$ , test U de Mann-Whitney.



Para determinar si la restitución de SAPAP3 en vías específicas del estriado afectan el acicalado, elegimos la crear un vector viral para restituir a la proteína SAPAP3 en ambas vías del estriado de manera Cre-dependiente en ratones Sapap3-KO. El primer paso para la creación del vector fue generar un plásmido con la secuencia Sapap3 capaz de expresarse de manera Cre-dependiente. Para ello utilizamos el plásmido pAAV-hSyn-HA-Sapap3 donado por el laboratorio de la Dra. Lissa Monteggia (**Figura 4A-1**). Se extrajo la secuencia HA-Sapap3 con las enzimas de restricción Spa-I y Eco-RV (**Figura 4B**). De un segundo plásmido pAAV-Ef1a-DIO-eYFP, con enzimas de restricción, se quitó la secuencia eYFP y se integró la secuencia HA-Sapap3 (**Figura 4A-2 y 3**).

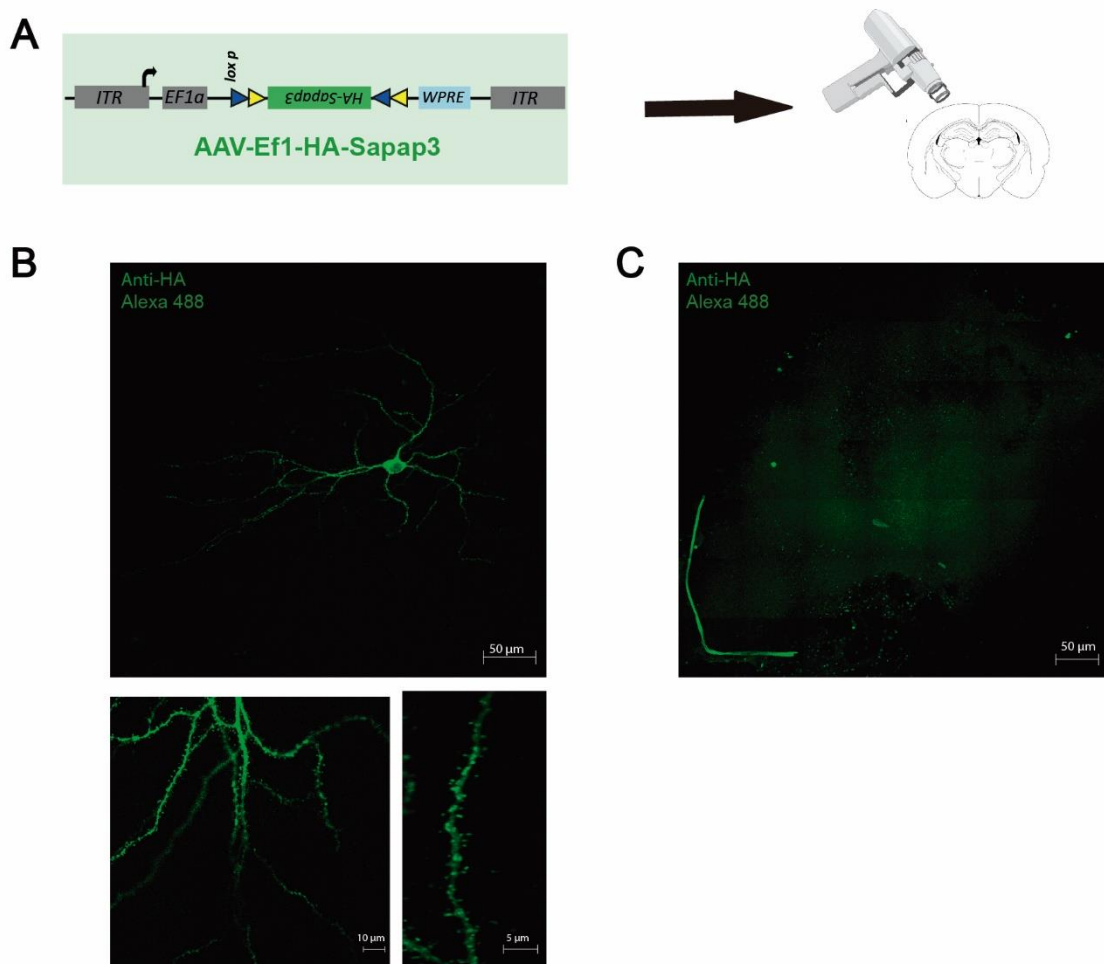


**Figura 4. Creación del plásmido pAAV-Ef1 $\alpha$ -DIO-HA-Sapap3**

- A) 1: mapa del plásmido pAAV-hSyn-HA-Sapap3 donado por el Dra. Lissa Monteggia.  
 2: plásmido pAAV-Ef1-DIO-eYFP del que se quitó eYFP para incorporar la secuencia de HA-Sapap3.  
 3: plásmido final pAAV-Ef1 $\alpha$ -HA-Sapap3 utilizado en la creación del vector viral para la restitución de la proteína SAPAP3 de manera Cre-dependiente.  
 B) Ensayo con las enzimas de restricción para obtener la secuencia HA-Sapap3 del plásmido original.

Antes de enviar el plásmido final a Addgene para la creación del vector viral que nos permitiera la restitución de la proteína SAPAP3, se comprobó la expresión del plásmido HA-Sapap3 de manera Cre-dependiente. Realizamos un ensayo con cultivos organotípicos en rebanadas de hipocampo de animales Emx1-Cre a las

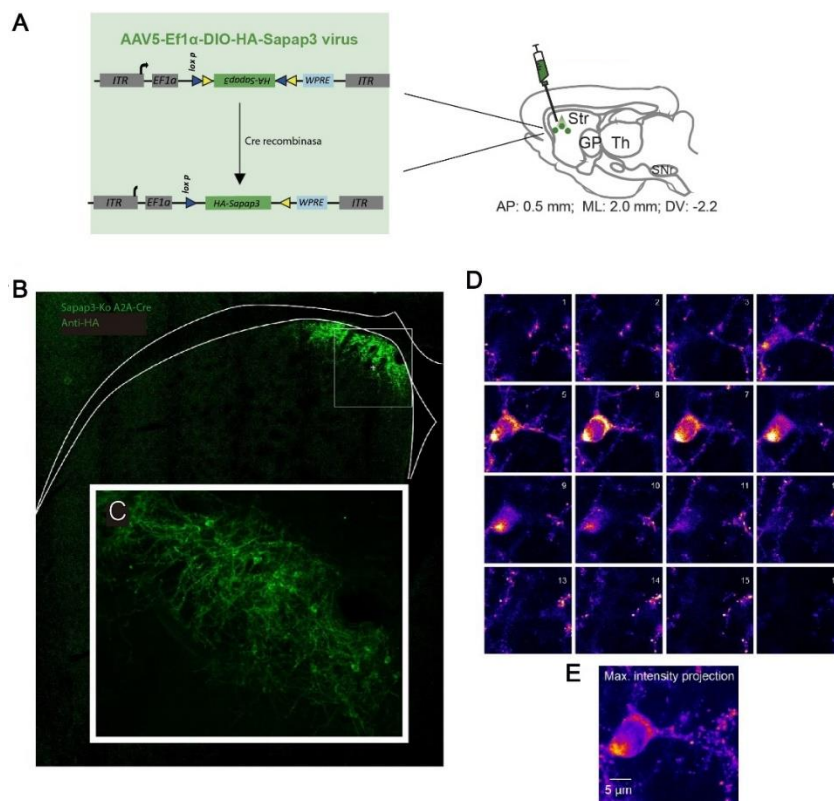
cuales se les transfectó el plásmido pAAV-Ef1 $\alpha$ -DIO-HA-Sapap3 (**Figura 5A**). Posterior a la transfección del plásmido, se hizo una inmunofluorescencia usando el anticuerpo primario HA anti-conejo y el cual fue revelado con el anticuerpo secundario Alexa 488. Se tomaron fotografías con un microscopio confocal de las muestras donde se observaron neuronas hipocampales con marca anti-HA, tanto en el soma como en las espinas dendríticas (**Figura 5B**). Como control negativo, se utilizaron secciones de cerebro de animales WT, las cuales pasaron por el mismo procedimiento y no presentaron células con marca (Figura 5C). Esto permitió concluir la efectividad y expresión dependiente de Cre del plásmido construido.



**Figura 5. Expresión Cre-dependiente del plásmido pAAV-Ef1 $\alpha$ -HA-Sapap3**

- Secuencia del plásmido a probar en cultivos organotípicos para corroborar la expresión Cre-dependiente en rebanadas hipocampales de ratones Emx1-Cre.
- Arriba: fotomicrografía con microscopio confocal donde se observa una neurona expresando HA-SAPAP3 en verde (Alexa 488). Abajo: dendritas y espinas dendríticas que expresan HA-Sapap3.
- Rebana de ratón Emx1 sin Cre (control negativo) sin ninguna neurona con la marca HA-Sapap3.

Una vez obtenido el vector viral se comprobó su expresión en un animal Sapap3-KO A2A-Cre de dos meses de edad. Con ayuda de un esterotáxico se inyectó 1  $\mu$ l del vector AAV5-Ef $\alpha$ 1-DIO-HA-Sapap3 en el estriado medial (**Figura 6A**). Un mes después de la cirugía los animales fueron perfundidos y el cerebro sometido a una inmunofluorescencia como se describe en el método. En color verde se muestra la marca anti-HA que sugiere la expresión de la proteína HA-Sapap3 a partir del vector viral (HA no se expresa en ratones de manera endógena). Como en los cultivos organotípicos, el soma de las neuronas y las espinas dendríticas presentan la marca de interés (**Figura 6C-E**). Este experimento comprobó la funcionalidad del vector AAV5-Ef $\alpha$ 1-DIO-HA-Sapap3 para expresar a la proteína Sapap3 de manera Cre-dependiente en ratones Sapap3-KO.



**Figura 6. Expresión de la proteína Sapap3 de manera Cre-dependiente por medio del vector viral construido.**

- A) Esquema y coordenadas de la transducción para restituir a la proteína Sapap3 en el estriado.
- B) Fotomicrografía de una rebanada coronal de un ratón Sapap3-KO A2A-Cre. En verde se observa la marca anti-HA que indica la expresión del vector AAV5-Ef $\alpha$ 1-DIO-HA-Sapap3.
- C) El recuadro muestra la región ampliada del estriado con marca anti-HA mostrada en B. Se pueden observar somas de neuronas con la marca anti-HA.
- D) Micrografías seriales en el eje z de una neurona del estriado. Los colores indican cantidad de fluorescencia, entre más blanco mayor de la marca anti-HA.
- E) Proyección en z de 16 planos focales de D

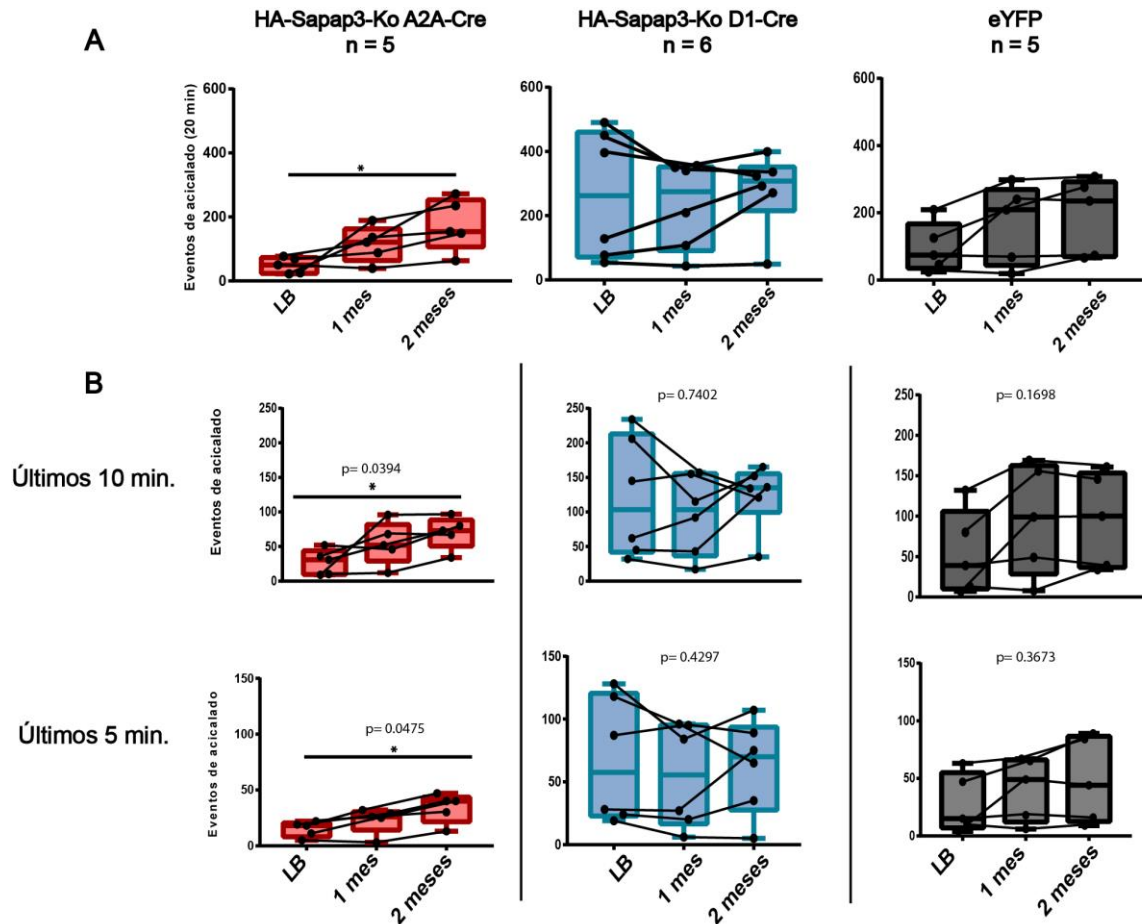
Con este resultado se pudo continuar con el segundo objetivo del estudio: medir si hay cambios en el acicalado excesivo de animales Sapap3-KO después de restituir la proteína Sapap3 en las vías específicas del estriado.

Para medir los cambios en la distancia recorrida, el acicalado excesivo y tiempo de acicalado, los ratones se colocaron en un campo abierto por 20 minutos y se les videograbó (los animales fueron previamente aislados en cajas individuales en el vivarium por 3 días). Se crearon tres grupos: Sapap3-KO A2A-Cre + HA-Sapap3 (n= 5), Sapap3-KO D1-Cre + HA-Sapap3 (n=6), Sapap3-KO Cre + eYFP (n=5). Cada grupo fue videograbado 3 días consecutivos en 3 diferentes momentos: línea base, 1 y 2 meses después de la inyección del vector viral para expresar HA-Sapap3 o solo eYFP en el caso del grupo control.

Tras la inyección del vector viral, los ratones Sapap3-KO A2A-Cre aumentaron los eventos de acicalado de forma significativa al comparar la línea base (LB) con 1 y 2 meses después de la infección con el vector viral (LB mediana, min, max = 50, 22, 77; 1 mes = 121, 39, 189; 2 meses = 154, 63, 272;  $p= 0.0085$ , prueba de Friedman; **Figura 7A**). Al analizar a los animales el grupo Sapap3-KO D1-Cre + HA-Sapap3 no se observaron cambios (LB mediana, min, máx= 236.5, 54, 490; 1 mes = 223, 43, 356; 2 meses = 329.5, 49, 399;  $p= 0.5705$ , prueba de Friedman, **Figura 7A**, panel de en medio). Tampoco se observaron diferencias al expresar solo la proteína eYFP en el grupo control (LB mediana, min, máx = 46, 24, 209; 1 mes= 68, 19, 298; 2 meses = 73, 66, 308;  $p= 0.3673$ , prueba de Friedman; **Figura 7A**, panel derecho), sugiriendo que la expresión *per se* de la proteína por la transfección viral en el cerebro no afecta los eventos de acicalado de los ratones Sapap3-KO. Por el contrario, la restitución de la proteína SAPAP3 de manera específica sí aumentó el acicalado excesivo a los dos meses.

Se piensa que en los primeros minutos en el campo abierto tienen una mayor influencia en la conducta de los animales por la novedad. Para ver si el acicalado varía de acuerdo con momento en que se mide el acicalado, se tomaron los últimos 10 y 5 minutos de los videos y se contabilizó el número de eventos de acicalado. Al igual que en el tiempo total, el acicalado aumentó de manera significativa en el grupo Sapap3-KO A2A-Cre + HA-Sapap3 en los últimos 10 minutos ( $p= 0.0394$ , prueba de Friedman) y 5 minutos ( $p= 0.0085$ , prueba de Friedman) (**Figura 7B**). Este efecto

no se observó en el grupo Sapap3-KO D1-Cre + HA-Sapap3 (**Figura 7B**, panel de 10 minutos:  $p=0.7402$ , prueba de Friedman; panel de 5 min:  $p= 0.4297$ , cajas azules), ni en el grupo control eYFP (**Figura 7B**, panel de 10 minutos:  $p= 0.1698$ . prueba de Friedman; panel de 5 min:  $p= 0.3673$ , prueba de Friedman, cajas grises).

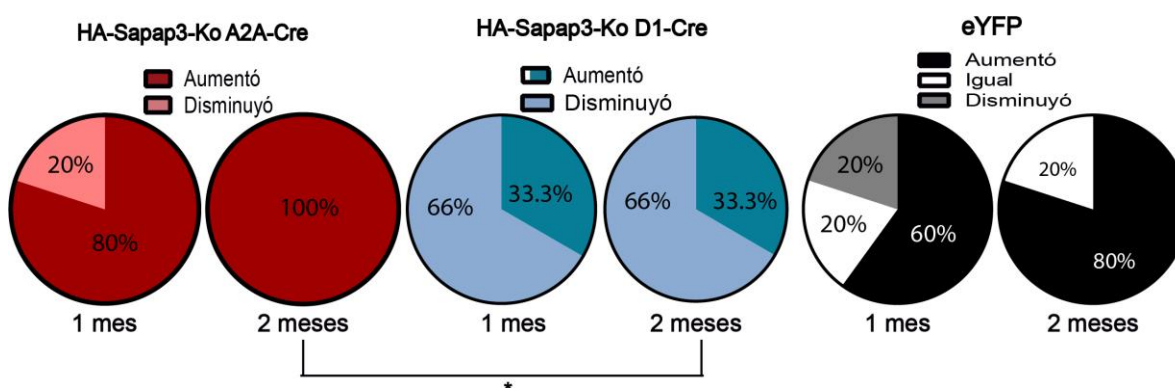


**Figura 7. Aumento de eventos de acicalado cuando se restituye Sapap3 en la vía indirecta**

- A) Eventos de acicalado contabilizados en 20 minutos con tres diferentes mediciones: línea base (LB), 1 mes después de la infección (1 mes) y 2 meses después de la infección (2 meses). En rojo, ratones HA-Sapap3 A2A-Cre donde se aprecia un aumento significativo en los eventos de acicalado 2 meses después de la infección ( $p=0.023$ ); En azul, ratones HA-Sapap3 D1-Cre con una tendencia a la baja en el número total de evento de acicalado. En negro, grupo control eYFP sin cambios significativos en los eventos de acicalado a lo largo del tiempo.
- B) Eventos de acicalado contabilizados en los últimos 10 minutos y últimos 5 minutos. El aumento en los eventos de acicalado de los ratones con la restitución de la proteína SAPAP3 en la vía indirecta (en rojo) se mantiene. La tendencia a la baja en los eventos de acicalado de los ratones D1 se hace más marcada sin ser significativa. Los ratones eYFP no cambian.

También se contempló la proporción de animales que presentaron disminución o aumento en el acicalado en los tres diferentes grupos a lo largo de los 2 meses. Para esto comparamos el número de animales que subieron, bajaron o no cambiaban los eventos de acicalado normalizado a la línea base. Los resultados se

muestran como porcentaje de cambio en la **Figura 8**. La **Figura 8** muestra el porcentaje de cambio de los animales Sapap3-KO A2A-Cre+HA-Sapap3, Sapap3-KO D1-Cre+HA-Sapap3 y Sapap3-KO Cre eYFP en los 20 minutos de campo abierto, 1 y 2 meses después de la transducción viral. Para comprobar si había diferencias estadísticamente significativas entre los grupos utilizamos la prueba  $\chi^2$ . El grupo Sapap3-KO A2A-Cre+HA-Sapap3 en su totalidad aumentó el acicalado a los 2 meses de la infección en comparación con el grupo Sapap3-KO D1-Cre+HA-Sapap3 ( $\chi^2= 5.28$ ,  $p= 0.0221$ ). El grupo control también presentó un aumento del 60% en el acicalado al mes y 80% a los dos meses, sin ser significativo cuando se comparó con cualquiera de los otros dos grupos. Cabe destacar que hay una tendencia cuando se compara al grupo HA-Sapap3-KO D1-Cre vs eYFP a los dos meses ( $\chi^2= 5.6$ ,  $p= 0.0601$ ).

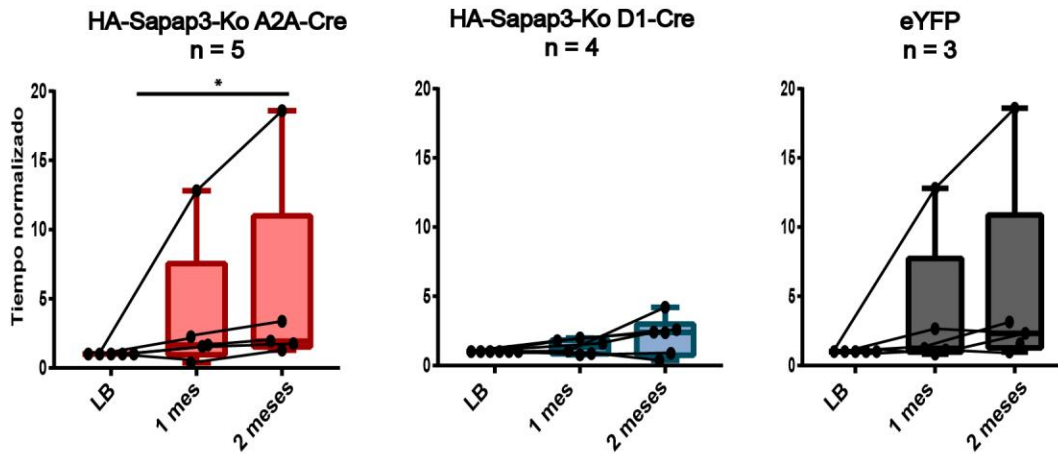


**Figura 8. Aumento de eventos de acicalado cuando se restituye Sapap3 en la vía indirecta**

- A) Porcentaje normalizado de cambios del acicalado en 20 minutos de campo abierto 1 y 2 meses después de la infección. A los 2 meses de infección el grupo HA-Sapap3-Ko A2A-Cre en su totalidad (100%) aumentó el acicalado y es significativamente diferente al grupo HA-Sapap3-Ko D1-Cre en el mismo periodo ( $p= 0.0143$ ).

Otra variable medida fue el tiempo que los diferentes grupos pasaron acicalándose (**Figura 9**). Para tener una mejor comparación de los cambios en el tiempo de acicalado, se normalizó el tiempo neto a la línea base. Como resultado encontramos que el grupo Sapap3-KO A2A-Cre+HA-Sapap3 incrementó su tiempo de acicalado de forma progresiva desde la primera medición hasta la última ( $p= 0.0085$ , test de Friedman). Ni el grupo Sapap3-KO D1-Cre+HA-Sapap3 ni el grupo eYFP mostraron cambios en el tiempo de acicalado excepto por un animal en cada uno de estos grupos (HA-Sapap3-KO D1-Cre:  $p= 0.4297$ ; eYFP:  $p= 0.3673$ , test de

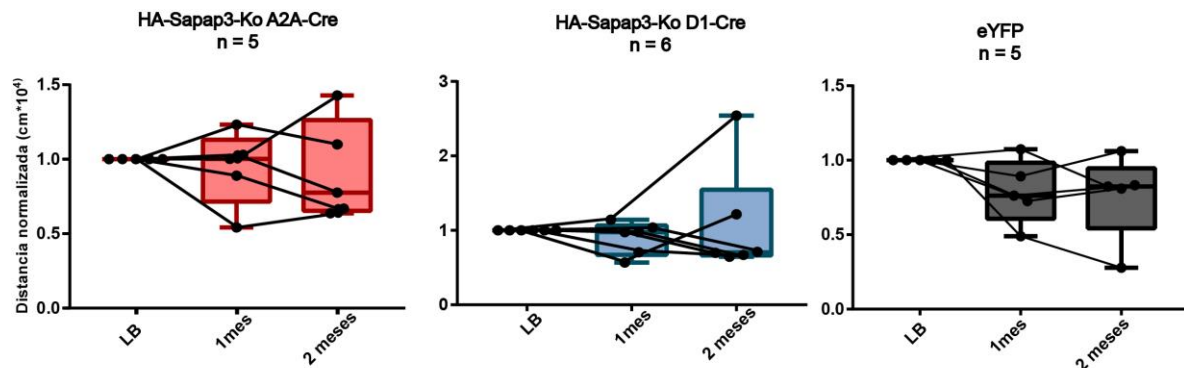
Friedman). Los cambios en el tiempo de acicalado registrados en el grupo Sapap3-KO A2A-Cre+HA-Sapap3 mostraron que la restitución de la proteína Sapap3 en la vía indirecta produce un incremento en el número de eventos de acicalado y también en el tiempo haciendo esta conducta.



**Figura 9. La restitución de Sapap3 en la vía indirecta incrementa el tiempo de acicalado**

Tiempo de acicalado normalizado a la línea base (LB). El grupo HA-Sapap3-KO A2A-Cre (rojo) incrementó el tiempo de acicalado a los 2 meses de restituir la proteína Sapap3 en la vía indirecta.

Por último, no se encontraron cambios en la distancia recorrida en ninguno de los tres grupos a lo largo del tiempo. Esto permite inferir que los cambios observados en el acicalado son sobre el acicalado y no sobre la conducta motora en general. (HA-Sapap3-KO A2A:  $p=0.9537$ ; HA-Sapap3-KO D1:  $p=0.5701$ ; eYFP:  $p=0.3673$ , prueba de Friedman; **Figura 10**).



**Figura 10. La distancia recorrida no cambia después de la infección del virus AAV5-Efa1-DIO-HA-Sapap3.**

Distancia recorrida normalizada a la línea base (LB). Ninguno de los grupos registró cambios en la distancia recorrida después de la inyección del vector viral a lo largo del tiempo (HA-Sapap3-KO A2A:  $p=0.9537$ ; HA-Sapap3-KO D1:  $p=0.2731$ ; eYFP:  $p=0.1821$ , prueba de Friedman).

## Discusión

Dos estudios han restituido la proteína SAPAP3 en el estriado logrando disminuir las conductas características (acicalado y ansiedad) reportadas en este modelo de compulsiones (Welch, 2006; Mahgoub, 2016). En ambos trabajos la restitución de la proteína se hizo en el estriado en general, sin contemplar la organización de este núcleo. Como se ha descrito, el estriado se compone de las vías directa e indirecta: la primera promueve la actividad mientras que la segunda la inhibe (Hikosaka, 2000; Macpherson et al., 2014). Al eliminar la proteína SAPAP3, la excitabilidad del estriado se ve comprometida (Welch, 2007) y los ratones presentan acicalado excesivo, una conducta considerada de tipo compulsiva. En este trabajo partimos de la presencia de esta conducta para medir los cambios generados por la restitución de la proteína SAPAP3 en el estriado de manera vía específica. Hasta el momento, no hay trabajo que estudie el papel de SAPAP3 en el funcionamiento de cada una de las vías y su relación con el acicalado excesivo. Nuestro trabajo buscó, como objetivo general, generar una estrategia para la restitución de SAPAP3 de manera específica ya fuera en la vía directa o indirecta. Lograr implementar una estrategia así nos permitió preguntar si la ausencia o presencia de la proteína tenía efectos particulares en el acicalado, ya fuera en el aumento o reducción de éste de acuerdo con la vía donde la proteína fue restituida. Partimos de la hipótesis de que la función de cada una de las vías estriatales tiene diferentes efectos sobre el movimiento, por lo que habría diferentes efectos en el acicalado de los ratones Sapap3-KO si restituíamos la expresión de SAPAP3 de manera vía específica. La hipótesis que planteamos es que la restitución en la vía directa aumentaría el acicalado de los ratones Sapap3-KO debido a que ésta tiene implicaciones en el inicio de la actividad motora, mientras que la restitución en la vía indirecta produciría una disminución. Una hipótesis alterna sería que el funcionamiento balanceado de ambas vías es necesario para la realización de tareas específicas (Cui, 2013); de ser el caso, la restitución en una sola vía del estriado también afectaría el acicalado excesivo al romperse el balance.

La forma en la que nos aproximamos a la restitución de SAPAP3 fue creando un vector viral que expresa la secuencia genética Sapap3 en presencia de la



proteína Cre-recombinasa. Utilizamos animales dobles transgénicos que nos permitieran expresar el vector viral ya fuera en la vía directa o en la indirecta: Sapap3-KO D1 para la vía directa y Sapap3-KO A2A para la vía indirecta.

Los resultados presentados en este trabajo permiten obtener conclusiones preliminares sobre esta hipótesis. En primer lugar, contrario a lo esperado, la restitución en ratones Sapap3-KO A2A-Cre (vía indirecta) aumentó el acicalado de estos, mientras que la restitución en ratones Sapap3-KO D1-Cre (vía directa) no mostró cambios. Intragrupo ni en comparación con el grupo control (**Figura 7-9**). El grupo control, que consistió en inyección del virus AAV-hSyn-eYFP no mostró cambios, lo que nos permite inferir que la restitución de una proteína exógena no afecta el acicalado directamente, o sea que los efectos registrados en los grupos experimentales se deben a la restitución de SAPAP3.

El efecto de la restitución de la proteína en el estriado sea en la vía directa o indirecta no afectó la locomoción como muestra la **Figura 10**, por lo tanto, se puede concluir que la restitución de SAPAP3 en la vía indirecta, correspondiente al grupo Sapap3-KO A2A-Cre son directamente sobre el acicalado. Llama la atención que el grupo correspondiente a la restitución de SAPAP3 en la vía directa (Sapap3-KO D1-Cre) no cambió su acicalado. Una explicación es que la restitución de la proteína SAPAP3 en la vía directa podría tener algún efecto de freno sobre la expresión de acicalado excesivo; sin embargo, hacen falta más experimentos para poder concluir algo al respecto. Una pregunta que podemos hacer dado estos primeros resultados es: ¿será la vía indirecta la que tiene más importancia en la generación de la conducta compulsiva en este modelo?

Contemplamos que los cambios registrados quizás puedan ser más marcados si el tiempo de expresión fuese más prolongado o si se realiza la restitución de SAPAP3 en etapas más tempranas. Welch et al., 2007 esperó de 4-6 meses después de restituir la proteína SAPAP3, empezándola a expresar desde los 10 días de nacidos los animales para observar cambios en el acicalado excesivo. Para ver si el tiempo de expresión es una variable que afecte el acicalado o la etapa en que se restituye, en el futuro dejaremos un tiempo de expresión mayor y en grupos experimentales paralelos moveremos la etapa de restitución de SAPAP3 a

los 10 días de nacidos los animales donde se ha encontrado que la proteína todavía no se expresa en el estriado (Kindler y Bockers, 2004).

Otra posibilidad para explicar los resultados preliminares de este trabajo es que la restitución de la proteína SAPAP3 en la vía directa o indirecta no es suficiente para cambiar los niveles del acicalado a los encontrados en los animales WT, siendo necesaria la restitución en ambas vías de manera paralela. Esto debido a que diferentes experimentos han planteado que el balance entre ambas vías es necesario para la realización de las acciones (Cui, 2013; Tecuapetla, 2014). Aunque nuestros resultados sugieren que la restitución en la vía indirecta es suficiente para afectar el acicalamiento excesivo, en experimentos futuros restituiremos la proteína SAPAP3 en ambas vías al mismo tiempo para observar si hay cambios en la conducta de estos ratones. En un trabajo reciente del laboratorio donde se realizó esta tesis, se encontró que la inhibición de la actividad de las neuronas de la vía indirecta disminuye el acicalado excesivo en los ratones Sapap3-KO mientras que la inhibición conjunta de ambas vías lo incrementa (Ramírez-Armenta et al., 2021). Este resultado apoya lo que se encontró en este trabajo ya que pareciera que la vía indirecta es quien tiene algún protagonismo en la generación del acicalado excesivo, lo que, a su vez, empata con lo reportado por Welch en el 2007, donde restituir la proteína en todo el estriado disminuye el acicalado. ¿Será que la ausencia de SAPAP3 produce una mayor actividad de la vía indirecta sobre la vía directa produciendo un aumento en el acicalado? Por ahora, el hallazgo de que la restitución de SAPAP3 en la vía indirecta incrementó el acicalamiento excesivo (**Figura7**) sugiere que restituir SAPAP3 en esta vía no es lo mismo que decrementar su actividad motora; también sugiere que quizás la restitución de SAPAP3 en la vía indirecta disminuye la actividad general del estriado. Se requieren futuras investigaciones para discernir como la restitución de SAPAP3 afecta la actividad del estriado.

## Conclusiones

1. La estrategia de restitución de la proteína Sapap3 de manera Cre dependiente mostró ser exitosa.
2. La restitución de la proteína Sapap3 en las neuronas de la vía indirecta del estriado de animales Sapap3-KO, modelo de TOC, incrementa la presencia de acicalamiento excesivo (compulsiones) sin incrementar el desplazamiento general de los animales.

## Perspectivas

- Evaluar los cambios en el acicalado excesivo a lo largo de 6 meses con inyecciones virales de HA-Sapap3 en animales Sapap3-KO a los 2 versus los 10 días de nacidos.
- Evaluar el restituir la proteína Sapap3 en ambas vías simultáneamente de animales Sapap3-KO sobre el acicalado excesivo.
- Automatizar la detección del acicalado (con ayuda de JABBA)
- Evaluar el restituir la proteína Sapap3 sobre el aprendizaje de conductas repetitivas en ratones Sapap3-KO.
- Evaluar la restitución vía específica de los ratones Sapap3-KO en la actualización de la relación acción-consecuencia.

### Información complementaria

#	Finales	Coordenadas	Tamaño(pb)
1	Sal I-Sal I	1173-1177	8573

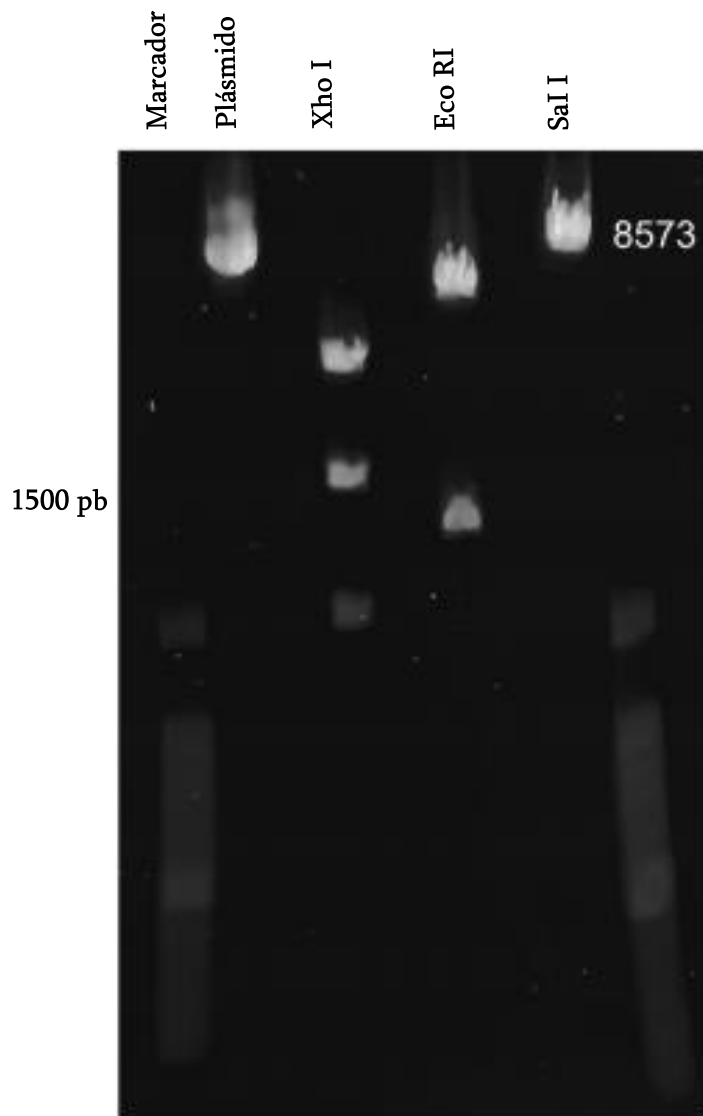
**Tabla 1.** Coordenas de corte de la enzima Sal.

#	Finales	Coordenadas	Tamaño(pb)
1	EcoRI-EcoRI	4677-2541	6438
2	EcoRI-EcoRI	2542-4676	2135

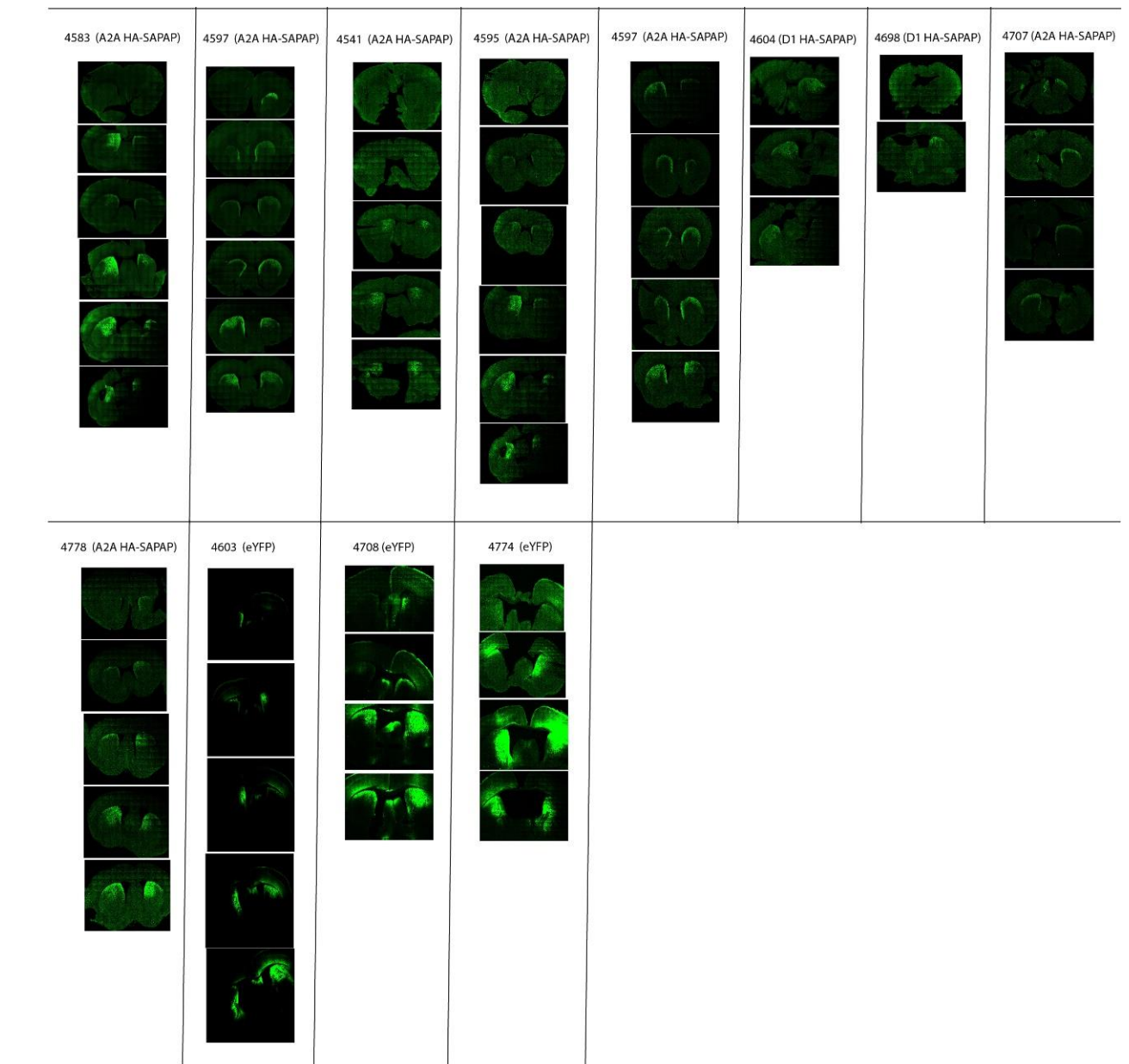
**Tabla 2.** Coordenadas de los cortes de la enzima EcoRI y fragmentos resultantes.

#	Finales	Coordenadas	Tamaño(pb)
1	XhoI-XhoI	5307-1196	4463
2	XhoI-XhoI	2719-5306	2588
3	XhoI-XhoI	1197-2718	1522

**Tabla 3.** Se muestran las coordenas de corte de la enzima XhoI y los fragmentos resultantes de la digestión.



**Figura suplementaria 1.** Ensayo de digestión las enzimas Eco RI, I y Sal I. Los carriles de izquierda a derecha: marcador de peso molecular, plásmido sin linearizar, Xho I, Eco RI y Sal I.



**Figura suplementaria 2.** Anatomía de los diferentes grupos experimentales.

## Bibliografía

Ahmari SE, Spellman T, Douglass NL, Kheirbek MA, Simpson HB, Deisseroth K, Gordon JA, Hen R. Repeated cortico-striatal stimulation generates persistent OCD-like behavior. *Science*. 2013 Jun 7;340(6137):1234-9. doi: 10.1126/science.1234733. PMID: 23744948; PMCID: PMC3954809.

Albelda N, Joel D. Current animal models of obsessive compulsive disorder: an update. *Neuroscience*. 2012 Jun 1;211:83-106. doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.08.070. Epub 2011 Sep 8. PMID: 21925243.

Asociación Estadounidense de Psiquiatría. *Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, 5ª ed.* Editorial Psiquiátrica Estadounidense, 2013.

Baxter LR Jr, Phelps ME, Mazziotta JC, Guze BH, Schwartz JM, Selin CE. Local cerebral glucose metabolic rates in obsessive-compulsive disorder. A comparison with rates in unipolar depression and in normal controls. *Arch Gen Psychiatry*. 1987 Mar;44(3):211-8. doi: 10.1001/archpsyc.1987.01800150017003. Erratum in: *Arch Gen Psychiatry* 1987 Sep;44(9):800. PMID: 3493749.

Bergstrom HC, Lieberman AG, Graybeal C, Lipkin AM, Holmes A. Dorsolateral striatum engagement during reversal learning. *Learn Mem*. 2020 Sep 15;27(10):418-422. doi: 10.1101/lm.051714.120. PMID: 32934094; PMCID: PMC7497112.

Burguière E, Monteiro P, Feng G, Graybiel AM. Optogenetic stimulation of lateral orbitofronto-striatal pathway suppresses compulsive behaviors. *Science*. 2013 Jun 7;340(6137):1243-6. doi: 10.1126/science.1232380. PMID: 23744950; PMCID: PMC3876800.

Cohen JD, McClure SM, Yu AJ. Should I stay or should I go? How the human brain manages the trade-off between exploitation and exploration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2007 May 29;362(1481):933-42. doi: 10.1098/rstb.2007.2098. PMID: 17395573; PMCID: PMC2430007.

Corbit VL, Manning EE, Gittis AH, Ahmari SE. Strengthened Inputs from Secondary Motor Cortex to Striatum in a Mouse Model of Compulsive Behavior. *J Neurosci*. 2019 Apr 10;39(15):2965-2975. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1728-18.2018. Epub 2019 Feb 8. PMID: 30737313; PMCID: PMC6462450.

Cui G, Jun SB, Jin X, Pham MD, Vogel SS, Lovinger DM, Costa RM. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature*. 2013 Feb 14;494(7436):238-42. doi: 10.1038/nature11846. Epub 2013 Jan 23. PMID: 23354054; PMCID: PMC4039389.

Ehmer I, Feenstra M, Willuhn I, Denys D. Instrumental learning in a mouse model for obsessive-compulsive disorder: Impaired habit formation in Sapap3 mutants. *Neurobiol Learn Mem*. 2020 Feb;168:107162. doi: 10.1016/j.nlm.2020.107162. Epub 2020 Jan 9. PMID: 31927083.

Fineberg NA, Chamberlain SR, Goudriaan AE, Stein DJ, Vanderschuren LJ, Gillan CM, Shekar S, Gorwood PA, Voon V, Morein-Zamir S, Denys D, Sahakian BJ, Moeller FG, Robbins TW, Potenza MN. New developments in human neurocognition: clinical, genetic, and brain imaging correlates of impulsivity and compulsivity. *CNS Spectr*. 2014 Feb;19(1):69-89. doi: 10.1017/S1092852913000801. PMID: 24512640; PMCID: PMC4113335.

Franklin ME, Foa EB. Treatment of obsessive-compulsive disorder. *Annu Rev Clin Psychol*. 2011;7:229-43. doi: 10.1146/annurev-clinpsy-032210-104533. PMID: 21443448.

Gerfen CR. Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson disease. *Nat Neurosci*. 2006 Feb;9(2):157-8. doi: 10.1038/nn0206-157. PMID: 16439979.

Gillan CM, Morein-Zamir S, Urcelay GP, Sule A, Voon V, Apergis-Schoute AM, Fineberg NA, Sahakian BJ, Robbins TW. Enhanced avoidance habits in obsessive-compulsive disorder. *Biol Psychiatry*. 2014 Apr 15;75(8):631-8. doi: 10.1016/j.biopsych.2013.02.002. Epub 2013 Mar 16. PMID: 23510580; PMCID: PMC3988923.



Gillan CM, Pappmeyer M, Morein-Zamir S, Sahakian BJ, Fineberg NA, Robbins TW, de Wit S. Disruption in the balance between goal-directed behavior and habit learning in obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry*. 2011 Jul;168(7):718-26. doi: 10.1176/appi.ajp.2011.10071062. Epub 2011 May 15. PMID: 21572165; PMCID: PMC3533260.

Gillan CM, Robbins TW, Sahakian BJ, van den Heuvel OA, van Wingen G. The role of habit in compulsivity. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2016 May;26(5):828-40. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.12.033. Epub 2015 Dec 29. PMID: 26774661; PMCID: PMC4894125.

Gittis AH, Leventhal DK, Fensterheim BA, Pettibone JR, Berke JD, Kreitzer AC. Selective inhibition of striatal fast-spiking interneurons causes dyskinesias. *J Neurosci*. 2011 Nov 2;31(44):15727-31. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3875-11.2011. PMID: 22049415; PMCID: PMC3226784.

Grover S, Nguyen JA, Viswanathan V, Reinhart RMG. High-frequency neuromodulation improves obsessive-compulsive behavior. *Nat Med*. 2021 Feb;27(2):232-238. doi: 10.1038/s41591-020-01173-w. Epub 2021 Jan 18. PMID: 33462447.

Graybiel AM, Rauch SL. Toward a neurobiology of obsessive-compulsive disorder. *Neuron*. 2000 Nov;28(2):343-7. doi: 10.1016/s0896-6273(00)00113-6. PMID: 11144344.

Greenwood BN. The role of dopamine in overcoming aversion with exercise. *Brain Res*. 2019 Jun 15;1713:102-108. doi: 10.1016/j.brainres.2018.08.030. Epub 2018 Aug 29. PMID: 30171838.

Kindler S, Rehbein M, Classen B, Richter D, Böckers TM. Distinct spatiotemporal expression of SAPAP transcripts in the developing rat brain: a novel dendritically localized mRNA. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004 Jul 5;126(1):14-21. doi: 10.1016/j.molbrainres.2004.03.014. PMID: 15207911.

Kravitz AV, Tye LD, Kreitzer AC. Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat Neurosci*. 2012 Jun;15(6):816-8. doi: 10.1038/nn.3100. PMID: 22544310; PMCID: PMC3410042.

Hadjas LC, Schartner MM, Cand J, Creed MC, Pascoli V, Lüscher C, Simmler LD. Projection-specific deficits in synaptic transmission in adult Sapap3-knockout mice. *Neuropsychopharmacology*. 2020 Nov;45(12):2020-2029. doi: 10.1038/s41386-020-0747-3. Epub 2020 Jun 25. PMID: 32585679; PMCID: PMC7547074.

Hadjas LC, Lüscher C, Simmler LD. Aberrant habit formation in the Sapap3-knockout mouse model of obsessive-compulsive disorder. *Sci Rep*. 2019 Aug 19;9(1):12061. doi: 10.1038/s41598-019-48637-9. PMID: 31427755; PMCID: PMC6700199.

Hikosaka O, Kim HF, Amita H, Yasuda M, Isoda M, Tachibana Y, Yoshida A. Direct and indirect pathways for choosing objects and actions. *Eur J Neurosci*. 2019 Mar;49(5):637-645. doi: 10.1111/ejn.13876. Epub 2018 Mar 25. PMID: 29473660; PMCID: PMC6107440.

Hikosaka O, Takikawa Y, Kawagoe R. Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiol Rev*. 2000 Jul;80(3):953-78. doi: 10.1152/physrev.2000.80.3.953. PMID: 10893428.

Maia AO, Costa R., Castro-Rodrigues P., Akam T., Snorasson I., Camacho M. Explicit knowledge of task structure is the primary determinant of human model-based action. *medRxiv*. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.09.06.20189241>doi: medRxiv preprint  
Macpherson T, Morita M, Hikida T. Striatal direct and indirect pathways control decision-making behavior. *Front Psychol*. 2014 Nov 12;5:1301. doi: 10.3389/fpsyg.2014.01301. PMID: 25429278; PMCID: PMC4228842.

Mahgoub M, Adachi M, Suzuki K, Liu X, Kavalali ET, Chahrour MH, Monteggia LM. MeCP2 and histone deacetylases 1 and 2 in dorsal striatum collectively suppress repetitive behaviors. *Nat Neurosci*. 2016 Nov;19(11):1506-1512. doi: 10.1038/nn.4395. Epub 2016 Sep 26. PMID: 27668390; PMCID: PMC5083208.

Monteiro P, Feng G. SHANK proteins: roles at the synapse and in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci*. 2017 Mar;18(3):147-157. doi: 10.1038/nrn.2016.183. Epub 2017 Feb 9. PMID: 28179641.

Paxinos, G., Franklin, K.B.J., 2001. The mouse brain in stereotaxic coordinates, second ed. Academic Press, San Diego.

Peak J, Hart G, Balleine BW. From learning to action: the integration of dorsal striatal input and output pathways in instrumental conditioning. *Eur J Neurosci.* 2019 Mar;49(5):658-671. doi: 10.1111/ejn.13964. Epub 2018 Jul 31. PMID: 29791051.

Robbins TW, Vaghi MM, Banca P. Obsessive-Compulsive Disorder: Puzzles and Prospects. *Neuron.* 2019 Apr 3;102(1):27-47. doi: 10.1016/j.neuron.2019.01.046. PMID: 30946823

Satoh K, Takeuchi M, Oda Y, Deguchi-Tawarada M, Sakamoto Y, Matsubara K, Nagasu T, Takai Y. Identification of activity-regulated proteins in the postsynaptic density fraction. *Genes Cells.* 2002 Feb;7(2):187-97. doi: 10.1046/j.1356-9597.2001.00505.x. PMID: 11895482.

Schwarzschild MA, Agnati L, Fuxe K, Chen JF, Morelli M. Targeting adenosine A2A receptors in Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 2006 Nov;29(11):647-54. doi: 10.1016/j.tins.2006.09.004. Epub 2006 Oct 9. PMID: 17030429.

Szechtman H, Eckert MJ, Tse WS, Boersma JT, Bonura CA, McClelland JZ, Culver KE, Eilam D. Compulsive checking behavior of quinpirole-sensitized rats as an animal model of Obsessive-Compulsive Disorder (OCD): form and control. *BMC Neurosci.* 2001;2:4. doi: 10.1186/1471-2202-2-4. Epub 2001 Apr 12. PMID: 11316464; PMCID: PMC31431.

Song M, Mathews CA, Stewart SE, Shmelkov SV, Mezey JG, Rodriguez-Flores JL, Rasmussen SA, Britton JC, Oh YS, Walkup JT, Lee FS, Glatt CE. Rare Synaptogenesis-Impairing Mutations in SLITRK5 Are Associated with Obsessive Compulsive Disorder. *PLoS One.* 2017 Jan 13;12(1):e0169994. doi: 10.1371/journal.pone.0169994. PMID: 28085938; PMCID: PMC5234816.

Szechtman H, Ahmari SE, Beninger RJ, Eilam D, Harvey BH, Edemann-Callesen H, Winter C. Obsessive-compulsive disorder: Insights from animal models. *Neurosci Biobehav Rev.* 2017 May;76(Pt B):254-279. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.04.019. Epub 2016 May 7. PMID: 27168347; PMCID: PMC5833926.

Takeuchi M, Hata Y, Hirao K, Toyoda A, Irie M, Takai Y. SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density. *J Biol Chem*. 1997 May 2;272(18):11943-51. doi: 10.1074/jbc.272.18.11943. PMID: 9115257.

Tecuapetla F, Matias S, Dugue GP, Mainen ZF, Costa RM. Balanced activity in basal ganglia projection pathways is critical for contraversive movements. *Nat Commun*. 2014 Jul 8;5:4315. doi: 10.1038/ncomms5315. PMID: 25002180; PMCID: PMC4102112.

van den Boom BJG, Mooij AH, Misevičiūtė I, Denys D, Willuhn I. Behavioral flexibility in a mouse model for obsessive-compulsive disorder: Impaired Pavlovian reversal learning in SAPAP3 mutants. *Genes Brain Behav*. 2019 Apr;18(4):e12557. doi: 10.1111/gbb.12557. Epub 2019 Feb 27. PMID: 30688005; PMCID: PMC6487954.

Welch JM, Wang D, Feng G. Differential mRNA expression and protein localization of the SAP90/PSD-95-associated proteins (SAPAPs) in the nervous system of the mouse. *J Comp Neurol*. 2004 Apr 19;472(1):24-39. doi: 10.1002/cne.20060. PMID: 15024750.

Welch JM, Lu J, Rodriguiz RM, Trotta NC, Peca J, Ding JD, Feliciano C, Chen M, Adams JP, Luo J, Dudek SM, Weinberg RJ, Calakos N, Wetsel WC, Feng G. Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. *Nature*. 2007 Aug 23;448(7156):894-900. doi: 10.1038/nature06104. PMID: 17713528; PMCID: PMC2442572.

Williams ZM, Eskandar EN. Selective enhancement of associative learning by microstimulation of the anterior caudate. *Nat Neurosci*. 2006 Apr;9(4):562-8. doi: 10.1038/nn1662. Epub 2006 Feb 26. PMID: 16501567.

Wood J, Ahmari SE. A Framework for Understanding the Emerging Role of Corticolimbic-Ventral Striatal Networks in OCD-Associated Repetitive Behaviors. *Front Syst Neurosci*. 2015 Dec 17;9:171. doi: 10.3389/fnsys.2015.00171. PMID: 26733823; PMCID: PMC4681810.

Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW. Lesions of dorsolateral striatum preserve outcome expectancy but disrupt habit formation in instrumental learning. *Eur J Neurosci*. 2004 Jan;19(1):181-9. doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03095.x. PMID: 14750976.

Zike I, Xu T, Hong N, Veenstra-VanderWeele J. Rodent models of obsessive compulsive disorder: Evaluating validity to interpret emerging neurobiology. *Neuroscience*. 2017 Mar 14;345:256-273. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.09.012. Epub 2016 Sep 16. PMID: 27646291; PMCID: PMC5458638.