

NEUROBIOLOGIA DE LA CONDUCTA MATERNAL

Aplicació d'un Vector pel Control Farmacogenètic de Neurons Oxitocinèrgiques

TREBALL DE FI DE GRAU DE BIOTECNOLOGIA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona, 17 de juny de 2019

Alumna: ALEJANDRA AMIGUET COMINS

Tutors: FERNANDO MARTÍNEZ GARCÍA

MANUELA BARNEO MUÑOZ

JAVIER CAPILLA LUQUE

ÍNDEX

DADES DEL CENTRE	1
1. RESUM, PARAULES CLAU I ABREVIACIONS	1
2. INTRODUCCIÓ.....	6
2.1 La conducta maternal en rosegadors.....	6
2.2 El cervell socio-sexual i l'oxitocina	7
2.3 <i>Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs</i>	8
3. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS.....	10
4. MATERIAL I MÈTODES	11
4.1 Vector víric	11
4.2 <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	11
4.3 Animals.....	12
4.4 Cirurgia estereotàxica	12
4.5 Perfusió i obtenció de seccions d'encèfal	14
4.6 Immunofluorescència.....	14
4.7 Immunohistoquímica	15
4.8 Anàlisi de la fluorescència	16
4.9 Anàlisi de la immunofluorescència	16
4.10 Anàlisi de la immunohistoquímica	17
5. RESULTATS.....	18
5.1 BLASTn.....	18
5.2 Comprovació de la injecció	18
5.3 Comprovació de l'especificitat	24
5.4 Anàlisi de la micròglia.....	25
6. DISCUSSIÓ	28
7. CONCLUSIONS	33
8. PERSPECTIVES DE FUTUR	34
AUTOAVALUACIÓ	34
AGRAÏMENTS.....	35
BIBLIOGRAFIA.....	36
Annex 1. Vector víric pAAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry.....	39
Annex 2. Coordenades de la cirurgia estereotàxica.....	40
Annex 3. Gen de l'oxitocina murina	41

DADES DEL CENTRE

He realitzat les Pràctiques Externes i el Treball de Fi de Grau al grup de recerca de Neuroanatomia Funcional (NeuroFun, grup 278) de la Universitat Jaume I, av. Vicent Sos Baynat s/n 12071 Castelló de la Plana, Espanya. Les principals línies d'investigació de NeuroFun se centren en la neurobiologia del comportament social en rosegadors, els quals estan mediatos en gran mesura per feromones. A més, és un grup associat a la Unitat Predepartamental de la Facultat de Ciències de la Salut, i és mixt entre la Universitat Jaume I i la Universitat de València. Aquest projecte ha estat finançat amb fons públics pel *Ministerio de Economía y Competitividad* (BFU2016-77691-C2-1-P i C2-2-P), la Generalitat Valenciana (PROMETEO2016/076) i la Universitat Jaume I (UII-B2016-45).

1. RESUM, PARAULES CLAU I ABREVIACIONS

Resum

La neurobiologia de la maternitat permet entendre la conducta maternal, de gran importància per a la supervivència i el neurodesenvolupament de les cries, i les seves alteracions patològiques. Les conductes socials, inclosa la maternal, estan controlades per un circuit neural conegut com a cervell socio-sexual on el nonapèptid oxitocina (OT) actua modulant-les. Al laboratori de Neuroanatomia Funcional investiguen la neuroendocrinologia de la conducta maternal en ratolins donat que aquests rosegadors mostren moltes similituds amb els humans.

Per entendre el paper de l'OT en la conducta maternal, pretenem inhibir les cèl·lules oxitocinèrgiques (OTèrgiques) *in vivo* amb el vector víric AAV2/1-mOXT-hM4D(Gi)-mCherry-WPRE que indueix l'expressió d'un DREADD (*Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs*) sota el promotor del gen de l'OT. El receptor DREADD és sensible a la droga *clozapine-N-oxide* (CNO), de forma que sota el seu efecte, les cèl·lules OTèrgiques infectades són inhibides selectivament. Pretenem analitzar l'efecte d'aquesta inhibició en la conducta maternal de les femelles. Aquest treball vol posar a punt aquesta tecnologia farmacogenètica abans de començar els experiments conductuals.

Amb aquest objectiu, hem administrat estereotàxicament el vector a l'àrea preòptica de femelles de ratolí, on es situen les neurones OTèrgiques. Algunes injeccions han donat una expressió elevada de la proteïna reportera mCherry, codificada pel vector, en nombroses neurones del lloc d'injecció. L'expressió de mCherry però no és específica de les cèl·lules OT al lloc d'injecció, pel que recomanem una disminució del títol víric de 4 ordres de magnitud, fins a 10^{10} còpies de genoma/mL (GC/mL).

D'altra banda, l'expressió de proteïnes alienes al ratolí (hM4D(Gi) i mCherry) podria desencadenar una activació del sistema immune amb neuroinflamació associada a l'aparició de micròglia reactiva al lloc d'injecció. L'ús del marcador específic Iba1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*) ens ha permès descartar aquesta possibilitat fins i tot en injeccions massives del vector víric.

Aquest treball ha permès proposar mesures per millorar la precisió i repetibilitat de l'estereotàxia i per guanyar especificitat en l'expressió del DREADD en cèl·lules OTèrgiques.

Paraules clau

Neurobiotecnologia, oxitocina (OT), conducta maternal, vector víric, cervell socio-sexual i *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs* (DREADD).

Abstract

Maternal neurobiology allows to understand maternal behaviour, which is very important for the survival and the neurodevelopment of the offspring, and their pathology disorders. Social behaviour, including the maternal one, is controlled by a neural circuit known as socio-sexual brain network (SBN) where the nonapeptide oxytocin (OT) is a regulator. The laboratory of Neuroanatomia Funcional is investigating the neuroendocrinology of maternal behaviour in mice considering that rodents are very similar to humans.

To understand the role of OT in maternal behaviour, we would like to inhibit oxytocinergic (OTergic) cells in vivo using the viral vector AAV2/1-mOXT-hM4D(Gi)-mCherry-WPRE, which induce the expression of DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) controlled by OT promoter. The DREADD

receptor is sensitive to the drug clozapine-N-oxide (CNO), which administration causes the selective inhibition of OTergic cells. We would like to analyse the effect of that inhibition on the maternal behaviour. This work aims to perfectionate this pharmacogenetic technique before the beginning of the behavioural experiments.

We have administrated the vector stereotaxically in the preoptic area of female mice, where neurons OTergic are localized. Some injections drove to a high expression of the reporter protein mCherry, which is codified in the vector, in many neurons at the injection place. However, the expression of mCherry is not specific from OT cells at the injection place, so we recommend reducing the viral title until 10^{10} genome copies/mL (GC/mL).

On the other hand, the expression of foreign proteins in mice (hM4D(Gi) and mCherry) could activate the immune system with neuroinflammation and the turn up of the microglial cells in the injection place. Since we have used massive injections of the viral vector, we rejected this possibility by using the specific microglial marker Iba1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1).

Here it is shown some proposals to improve the precision and repeatability in the stereotaxic surgery and to gain specificity in the DREADD expression in OTergic cells.

Keywords

Neurobiotechnology, oxytocin (OT), maternal behaviour, viral vector, socio-sexual brain network (SBN) and Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs (DREADD).

Abreviacions

A-C	Antero-posterior
AC/ADP	Comissura anterior/àrea preòptica anterodorsal
Acb	Nucli <i>accumbens</i>
AH	Nucli anterior
AAV	Adeno-associat
BLASTn	<i>Basic local alignment search tool</i> de nucleòtids
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BST	<i>Bed nucleus of stria terminalis</i>
CNO	<i>Clozapine-N-oxide</i>
Congento	<i>Consortium for Genetically Tractable Organisms</i>
DAB	Diaminobencidina
DREADD	<i>Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs</i>
D-V	Dorso-ventral
<i>E-value</i>	Valor esperat
FDA	Dextranamina marcada amb fluoresceïna
GC	Còpies de genoma
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GPCR	Receptor muscarínic de proteïna G
H ₂ O ₂	Peròxid d'hidrogen
Iba1	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
IP	Via intraperitoneal
LPO	Àrea preòptica lateral
LS	Septum lateral
Me	Amígdala medial
M-L	Medio-lateral
MPA	Àrea preòptica medial
NaBH ₄	Borohidrur de sodi
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NRS	<i>Normal rabbit serum</i>

ON	<i>Overnight</i>
OT	Oxitocina
OTèrgiques	Oxitocinèrgiques
OTR	Receptor d'oxitocina
P	Profunditat
Pa	Paraventricular
PAG	Substància gris periaqüeductal
PaPo	Nucli paraventricular hipotalàmic, part posterior
PBS	Fosfat salí
PFA	Paraformaldehid
ROI	<i>Region of interest</i>
SBN	<i>Socio-sexual brain network</i>
SN	Sistema nerviós
SNC	Sistema nerviós central
SO	Supraòptic
TB	Tampó tris
TBS	Tampó salí tris
VMH	Nucli hipotalàmic ventromedial
VSc	Via subcutània

2. INTRODUCCIÓ

El comportament parental es podria definir com la resposta d'un membre d'una espècie front a un individu immadur per augmentar la probabilitat de sobreviure fins la maduresa (Dulac, O'Connell and Wu, 2014). Aquest comportament és necessari per a la salut (física i mental) ja que influirà en la maduració del sistema nerviós (SN), i inclou tant el maternal com el paternal. Està descrit en un gran nombre d'espècies de vertebrats i invertebrats però la majoria de treballs se concentren en mamífers. Algunes espècies de rosegadors i primats mostren comportament parental adreçat fins i tot a individus que no són els seus fills biològics, el que es coneix com a comportament alopatal. En la major part dels mamífers, el comportament parental es podria dir que és exclusivament maternal perquè és la mare qui desenvolupa el procés de gestació i alletament. Per aquest motiu, la majoria dels estudis sobre la conducta parental se centren en la conducta maternal (Dulac, O'Connell and Wu, 2014; Numan and Insel, 2003).

2.1 La conducta maternal en rosegadors

D'entre els mamífers, el comportament maternal ha estat molt més estudiat i caracteritzat en rosegadors, sobretot rates i ratolins. Les femelles de rosegadors desenvolupen dos tipus de comportament maternal després del part, el dirigit a les cries i el no dirigit a les cries (Figura 1). El comportament dirigit a les cries inclou el seu manteniment al niu, l'alletament, la neteja i cobrir-les per mantenir la temperatura. D'altra banda, el comportament no dirigit a les cries es refereix a la construcció del niu i la defensa de les cries front a possibles intrusos (agressió maternal).

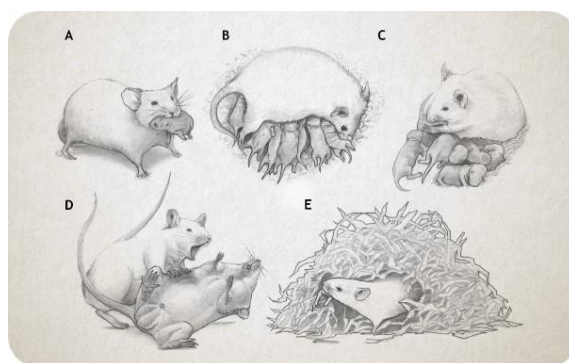


Figura 1. Comportament maternal. Comportament dirigit a les cries: transport de les cries al niu (A), alletament i manteniment de la temperatura corporal de les cries (B) i neteja de les cries (C). Comportament no dirigit a les cries: agressió maternal (D) i construcció del niu (E). (Imatge de Hugo Salais López, @metazoaestudio).

A les rates, les femelles verges tendeixen a evitar les cries alienes mentre que les mares mostren cura immediata de cries tant pròpies com no pròpies. Aquest fet demostra que les hormones associades a la gestació, el part i la lactància promouen un efecte facilitador de la conducta maternal mitjançant la seva acció sobre el sistema nerviós central (SNC). Per aquest motiu, l'estudi de la fisiologia de la conducta maternal requereix d'una aproximació neuroendocrinològica. Al ratolí, per contra, les femelles verges mostren una conducta maternal quasi espontània (Martín-Sánchez, Valera-Marín, *et al.*, 2015; Martín-Sánchez, McLean, *et al.*, 2015), fent aquesta espècie un model més semblant als humans per a l'estudi de la neuroendocrinologia de la conducta maternal. No obstant, aquest fet suggereix que la conducta maternal als ratolins és en part independent dels factors endocrins relacionats amb la gestació. Tot i així, al ratolí hi ha evidències que els aspectes motivacionals de l'atenció a les cries són també dependents d'hormones (Salais-López, 2017). Per aquests motius, el laboratori de Neuroanatomia Funcional de la Universitat Jaume I està utilitzant el ratolí com a model per analitzar la neuroendocrinologia de la conducta maternal. Altres raons que fan avantatjós el ratolí per la recerca d'aquest tema és el coneixement en profunditat del seu cervell, la fisiologia endocrina i la seqüenciació del seu genoma que ha permès generar moltes línies de ratolins modificats genèticament. D'aquesta manera, es poden adquirir animals modificats per estudiar el paper de determinats gens i els seus productes en el comportament. El coneixement del genoma del ratolí també ha permès utilitzar altres ferramentes biotecnològiques. Per exemple, en els últims anys s'han dissenyat nombrosos vectors vírics per alterar l'expressió gènica de poblacions neuronals concretes, en un àrea i un temps específic, i analitzar en detall la neuroanatomia funcional de diverses conductes.

2.2 El cervell socio-sexual i l'oxitocina

La conducta maternal s'engloba dins del que es coneix com a conductes socials, les que permeten que un individu es relacioni amb individus de la mateixa espècie. Aquests comportaments socials inclouen: a) el comportament sexual, que permet relacionar dos individus adults de diferent sexe per obtenir descendència; b) el comportament agonístic que enfronta a dos individus adults, normalment mascles que lluiten pel territori, els recursos o la parella, resultant en l'agressió; c) comportament afiliatiu com

a relació no competitiva entre individus adults, més comú entre femelles; d) conducta parental (maternal i paternal). Totes aquestes conductes estan controlades per un circuit específic del SNC conegut com cervell socio-sexual (*Socio-sexual Brain Network*, SBN). El SBN està format per un grup de centres cerebrals profusament interconnectats recíprocament que inclouen l'amígdala medial (Me), el septum lateral (LS), l'àrea preòptica medial de l'hipotàlem (MPA), el nucli anterior (AH) i paraventricular (Pa) de l'hipotàlem, el nucli hipotalàmic ventromedial (VMH) i parts de la substància gris periaqüeductal (PAG) del mesencèfal. Tots aquests centres presenten una elevada expressió de receptors d'hormones, fet que explica la relació entre les hormones i els comportaments socials (Newman, 1999). Una altra característica del SBN és que és la principal diana dels sistemes nonapeptidèrgics del cervell, sistemes neurals que expressen les neurohormones oxitocina (OT) i vasopressina.

L'OT és més coneguda com a hormona inductora de les contraccions del part i l'ejecció de la llet, però també ha sigut considerada un neurotransmissor clau en la modulació de les conductes socials, inclosa la conducta maternal. L'OT es sintetitza com un prepropèptid juntament amb la proteïna transportadora neurofisina que alhora també és important per emmagatzemar la pròpia OT en grànuls neurosecretors a l'interior de neurones. Les poblacions neuronals que produeixen OT es situen als nuclis neurosecretors Pa, supraòptic (SO) i als coneguts com a nuclis accessoris de l'hipotàlem (Otero-García *et al.*, 2016). Els camps terminals on l'OT és alliberada se situen entre d'altres a tots els nuclis del SBN. El receptor d'aquest neuropèptid o OTR és un receptor associat a proteïnes G del tipus Gq (Olazábal, 2018; Mitre *et al.*, 2017).

2.3 Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs

Com hem esmentat anteriorment, els ratolins són susceptibles a ser modificats genèticament. La tecnologia farmacogenètica *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs* (DREADD) consisteix en la modificació de receptors muscarínics de proteïnes G (GPCRs) per tal de modular l'activitat cel·lular mitjançant l'administració d'un lligant químic específic. Més en concret, els DREADDs han perdut l'afinitat pel lligant endogen (acetilcolina) i l'han guanyat per concentracions de l'ordre nanomolar (nM) d'un lligant farmacològic (sintètic). A més, no presenten una activitat constitutiva detectable. Aquests receptors modificats són expressats en la membrana plasmàtica i

permeten una regulació reversible i específica de l'activitat neuronal *in vivo* dels ratolins degut a que utilitzen les mateixes vies de senyalització intracel·lular que els GPCRs endògens. Hi ha dissenyats diversos DREADDs que depenent del tipus de proteïna G que portin associada (Gq, Gs i Gi) seran excitadors o inhibidors neuronals. En general, els DREADDs més utilitzats són l'excitador hM3Dq i l'inhibidor hM4Di (Figura 2). Ambdós tipus de dissenys presenten una cinètica similar en resposta a la droga específica, el *clozapine-N-oxide* (CNO). En rebre l'administració de CNO, la proteïna Gq s'unirà al DREADD excitador hM3Dq que activarà les neurones mitjançant la despolarització de les membranes (tancament dels canals de potassi). En el cas del DREADD inhibidor hM4Di, la unió de la proteïna Gi donarà lloc a la hiperpolarització de les membranes (obertura dels canals de potassi). L'expressió *in vivo* dels DREADDs es pot aconseguir mitjançant dues estratègies: injecció estereotàxica d'un vector víric que codifiqui DREADD i/o generació de línies de ratolí transgèniques que expressin DREADD en subpoblacions de neurones específiques. En l'estratègia del vector víric solen utilitzar-se dissenys adeno-associats (AAV) ja que presenten tropisme pel SNC, baixa immunogenicitat i no causen mutagènesi insercional. En neurociència, els serotips més utilitzats són l'1, 2, 5, 6, 8 i 9 però cal vigilar el tipus neuronal d'interès ja que l'afinitat, la transducció i la capacitat de difusió varia (1-4 difusió limitada i 5-9 difusió més llunyana) (Krashes *et al.*, 2011; Aldrin-Kirk and Björklund, 2019).

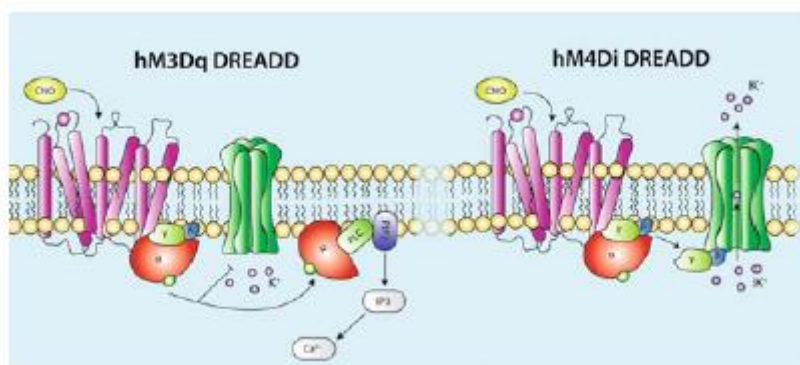


Figura 2. *Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs* (DREADD). Modificació de receptors muscarínics de proteïnes G (GPCRs). En la part esquerra es mostra el DREADD excitador hM3Dq i en la part dreta es representa el DREADD inhibidor hM4Di, en ambdós casos responen a la droga específica *clozapine-N-oxide* (CNO). (Imatge de Aldrin-Kirk and Björklund, 2019).

El laboratori de Neuroanatomia Funcional de la Universitat Jaume I va encomanar a l'Institut *Champalimaud for the Unknown* de Lisboa la producció d'un vector víric AAV que sota el promotor de l'OT codifica un DREADD inhibidor per neurones

oxitocinèrgiques (OTèrgiques). El vector víric codifica per a una proteïna fluorescent de la família de les *Green Fluorescent Protein* (GFP) anomenada mCherry que permet monitoritzar l'expressió del receptor. L'ús d'aquesta eina biotecnològica permetria inhibir específicament les cèl·lules OT positives per posteriorment poder estudiar la conducta maternal de les femelles de ratolí. Per aquest motiu, el primer pas de l'experiment consisteix en comprovar si el vector víric adquirit és específic de neurones OTèrgiques i que la seva administració a la regió desitjada no desencadena una reacció immunològica.

3. HIPÒTESI DE TREBALL I OBJECTIUS

3.1 Hipòtesi de treball

Per correlacionar la conducta maternal amb l'activitat de les neurones OTèrgiques, es pretén inactivar selectivament aquestes cèl·lules mitjançant l'ús d'un vector víric. El primer pas d'aquest experiment és comprovar que l'expressió del vector víric AAV2/1-mOXT-hM4D(Gi)-mCherry-WPRE està restringida a les cèl·lules que produeixen OT (cèl·lules OT positives).

3.2 Objectius

Per testar aquesta hipòtesi es volen assolir els següents objectius:

1. Comprovar la capacitat infectiva del vector víric AAV2/1-mOXT-hM4D(Gi)-mCherry-WPRE quan és injectat estereotàxicament en un nucli de l'hipotàlem preòptic/anterior conegut com a comissura anterior/àrea preòptica anterodorsal (AC/ADP) de femelles de ratolí CD1 adultes.
2. Verificar l'especificitat del vector víric AAV2/1-mOXT-hM4D(Gi)-mCherry-WPRE quan és injectat estereotàxicament en l'AC/ADP de femelles de ratolí CD1 adultes.
3. Veure si proteïnes alienes al ratolí (codificades al vector DREADD) causen una reacció glial, que reflectís una resposta immune innata. El procés inflamatori associat a aquesta resposta immune podria afectar a la funció neuronal del lloc d'injecció, fent inespecífica l'acció del vector víric DREADD independentment de l'ús de la droga CNO.

4. MATERIAL I MÈTODES

4.1 Vector víric

El vector víric AAV que codifica DREADD, AAV2/1-mOXT-hM4D(Gi)-mCherry-WPRE, ha sigut produït per *Congento (Consortium for Genetically Tractable Organisms)*, una *spin-off* de l'Institut *Champalimaud for the Unknown* de Lisboa. Aquest constructe víric està basat en un disseny previ ja comercialitzat (pAAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry; addgene, plasmid #44361) (Annex 1). En concret, el disseny utilitzat a l'experiment expressa un GPCR inhibidor fusionat a mCherry que permet inhibir cèl·lules si s'administra la droga específica del DREADD, en aquest cas, el CNO. A més, aquest vector víric té substituït el promotor de la sinapsina humana per 1kb *upstream* de l'exó 1 del gen de l'OT de ratolí (Figura 3), el qual està comprovat que indueix l'expressió de les cèl·lules OTèrgiques (Fields *et al.*, 2012). El vector víric es va rebre en gel sec a un títol de 2.74×10^{14} còpies de genoma/mL (GC/mL) i es va congelar a -20°C . Més tard, es van fer alíquotes que es van congelar a -80°C .

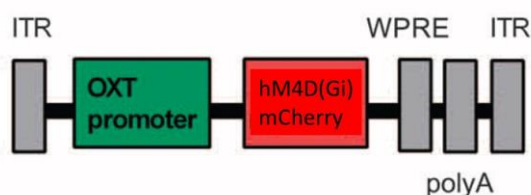


Figura 3. Esquema representatiu del vector víric utilitzat per expressar els receptors muscarínics de proteïnes G (GPCRs) modificats en neurones OTèrgiques. El disseny del vector comprèn: repeticions terminals invertides (*inverted terminal repeat*, ITR); promotor de l'oxitocina (*OXT promoter*); GPCR inhibidor fusionat a mCherry (hM4D(Gi)-mCherry); element regulador posttranscripcional del virus de l'hepatitis en marmotes (*woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element*, WPRE); cua de polyA (polyA). (Figura modificada de Peñarikano *et al.*, 2015).

4.2 Basic Local Alignment Search Tool

Per comprovar que no hi ha cap seqüència al genoma del ratolí que presenti alguna similitud amb la regió del promotor de l'OT (1kb *upstream* de l'exó 1 del gen) present al constructe víric, es va realitzar un *Basic Local Alignment Search Tool* de nucleòtids (BLASTn). Per aquest motiu, es va utilitzar l'eina bioinformàtica del BLAST, proporcionada pel *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov), que cerca similituds en seqüències realitzant alineaments entre una seqüència d'interès (*query*) i una base de dades de nucleòtids, en aquest cas ha sigut de genòmic i transcrit de ratolí (*Mouse Genomic + Transcript*). Vam triar el

programa *High similar sequences (megablast)* que busca seqüències amb més d'un 95% de semblança.

Per tal d'obtenir la seqüència del promotor de l'OT (*query*) es van consultar les bases de dades NCBI i *Ensembl* (www.ensembl.org). L'OT murina (*oxytocin, mus musculus*) es troba al cromosoma 2 i conté tres exons (posicions 130576173-130576329; 130576591-130576792 i 130576877-130577054) (Annex 3). La zona d'interès es va restringir des de la localització 130575173 fins a 130576173 (-1kb fins a l'inici de l'exó 1).

4.3 Animals

Es van utilitzar femelles adultes de la soca de ratolí SWISS *Mouse* o CD1 que pesaven aproximadament 45g. Aquesta soca és de color albi i no endogàmica, i és molt utilitzada en recerca biomèdica. A més, és una soca que es caracteritza per ser dòcil i mostrar un comportament maternal fort (Janvier Labs, 2019). Els animals es van obtenir de la casa comercial *Janvier Labs (Janvier-Europe, Le Genest Saint Isle, France)* i es van estabular en caixes al Servei d'Experimentació Animal de la Universitat Jaume I en cicles de 12 hores de llum (8:00-20:00) i 12 hores de foscor (20:00-8:00), a temperatura i humitat constants (21-22°C, 50% HR) i amb menjar i aigua *ad libitum*. Els animals van ser tractats d'acord amb el Reial Decret RD-53/2013, i el procediment experimental del projecte va ser aprovat per la Comissió Deontològica de la Universitat Jaume I i autoritzat per la Generalitat Valenciana (2017/VSC/PEA/00124). A més, es va seguir el "Principi de les 3 R's" (Reducció, Refinament i Reemplaçament) descrit per Russell i Burch en 1959.

4.4 Cirurgia estereotàxica

Els ratolins es van anestesiari utilitzant la cambra d'inducció d'isofluorà (Vetflurane 250 mL; Alvet, 091VN100550) al 3'5% amb una saturació d'oxigen a 1'2L/min. A continuació, es van col·locar en l'aparell estereotàxic i es va administrar l'analgèsia de buprenorfina (Buprenodale 0'3mg/mL 10mL; Alvet, 000626; injectant 3µL/g de pes corporal d'una dilució 1/50 en salí) i l'anti-mucus Atropina (Atropine B Braun 1mg/mL; B. Braun, 8470008968299; injectant 2'5µL/g de pes corporal d'una dilució 1/50 en salí) per inhibir les glàndules salivals i mucoses, ambdós via subcutània (VSc). La

temperatura corporal es va mantenir gràcies a l'ús d'una manta tèrmica, i la dosi d'isofluorà (Vetflurane 250 mL; Alvet, 091VN100550) es va baixar al 2'5% mentre es feia passar el flux per una mascareta connectada a l'aparell estereotàxic. A més, es va aplicar l'ungüent oftalmològic (Lubrithal 10g; Alvet, 016031329) per prevenir la dessecació de la còrnia. Es van ajustar les barres maxil·lars per evitar que el cap de l'animal estigués inclinat, es va desinfectar amb etanol 70% i es va afaitar el pèl. Seguidament, es va tallar l'àrea a operar per deixar el crani al descobert i es van evitar hemorràgies amb material hemostàtic (Espongostan flim; Takeda, 84700032444428). Per assegurar que el crani estava pla, es va mesurar la profunditat dels punts de referència a l'encèfal Bregma i Lambda (Figura 4), i es va ajustar la inclinació fins que la diferència entre ambdós va ser menor de 0'1mm. Per tal d'injectar a l'AC/ADP sense passar per feixos fibrosos que podrien afectar a la direcció o integritat del capil·lar, es va optar per entrar en un angle de 34°. Les coordenades necessàries van ser consultades a l'Atlas *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (Paxinos and Keith B.J., 1997), i van ser les següents: antero-posterior (A-P) Bregma -2'70mm, medio-lateral (M-L) Bregma -0'15mm i dorso-ventral (D-V) Bregma -4'48mm (Annex 2). Amb les coordenades A-P i M-L, es va assenyalar el punt on després es va fer el forat d'entrada.

Per a injectar la solució del vector víric sense causar lesions cerebrals, es van utilitzar capil·lars estirats prèviament amb un estirador de pipetes fins obtenir micropipetes amb una punta de 25µm de diàmetre. Les micropipetes es van segellar amb silicona i una vegada assecades es van omplir amb oli mineral mitjançant una xeringa Hamilton (Hamilton, syringe 75N, 5µL,PT2, 26S GA). A continuació, es va carregar aproximadament 1'5µL de la solució del vector víric per la punta de la micropipeta. Després, es va canviar el braç de l'estereotàxic pel braç de l'injector amb el sistema capil·lar-xeringa. Es va canviar l'angle (34°) i es va entrar a l'encèfal a una profunditat (P) de -5'40mm, que amb aquest angle dona la coordenada D-V (Annex 2). L'injector (*KDS 310 Plus Nano Legacy Syringe Pump*) es va utilitzar tant per a carregar el vector com per a injectar-lo. Es va seleccionar el programa d'injecció desitjat (0'4µL a un flux de 0'03µL/min) i es va procedir a la injecció unilateral, és a dir, en un sol hemisferi. Finalment, es va tancar la ferida amb adhesiu tòpic (Histoacryl blue 0'5 mL; Alvet, 0511050044). Passades 18-24 hores, es va tornar a administrar analgèsia.

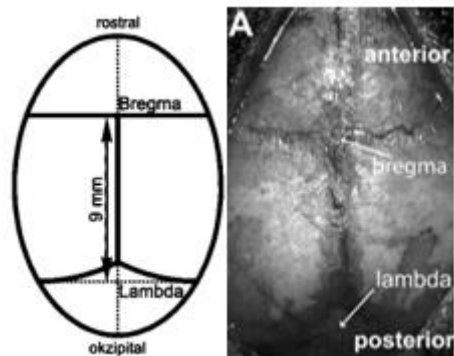


Figura 4. Bregma i Lambda a l'encèfal d'un ratolí. Punts de referència utilitzats en estereotàxia.

4.5 Perfusió i obtenció de seccions d'encèfal

Les femelles es van perfondre de 7 a 28 dies després de la injecció. Es van anestesiari via intraperitoneal (IP) amb una sobredosi de pentobarbital sòdic (Doletal; injectant 4µL/g de pes corporal). La perfusió es va portar a terme fent una punció cardíaca en el ventricle esquerre i alliberant el circuit a nivell de l'aurícula dreta. Primer es va passar solució salina (NaCl 0'9%) durant 4 minuts i es va seguir per 15 minuts de la solució fixadora de paraformaldehid (PFA) 4% en 0'1M de fosfat, pH 7'4, i a un flux de 5'5mL/min, en ambdós casos. Els encèfals van ser extrets dels cranis i postfixats *overnight* (ON) a 4°C amb la solució postfixadora de PFA 4% en 0'1M de fosfat. Passat aquest temps, es va reemplaçar el PFA 4% en 0'1M de fosfat per la solució crioprotectora de sacarosa 30% (en 0'01M de fosfat salí, PBS, pH 7'6) fins que es van enfonsar aproximadament passades 48 hores. Seguidament, els encèfals es van tallar frontalment a un gruix de 40µm utilitzant el micròtom de congelació (Leica SM2000R). En concret, es van obtenir 5 sèries paral·leles frontals (F1-F5) que van ser congelades en sacarosa 30% (en 0'01M de PBS, pH 7'6) per després poder realitzar altres tècniques com immunofluorescència i immunohistoquímica.

4.6 Immunofluorescència

Es van utilitzar tècniques d'immunofluorescència en les sèries F2 dels animals per detectar la colocalització del vector víric i les cèl·lules OT positives. Aquesta observació va ser possible gràcies a l'expressió per part del vector de la proteïna mCherry (proteïna reportera del DREADD) que emet fluorescència ($\lambda_{ex}587nm$ i $\lambda_{em}610nm$). Per a detectar les cèl·lules OT positives es va utilitzar un anticòs primari anti-oxitocina (fet en ratolí) que alhora es va acoblar amb l'anticòs secundari anti-IgG de ratolí (fet en

cabra) conjugat amb el fluorocrom *Cascade Blue* ($\lambda_{ex}403nm$ i $\lambda_{em}420nm$). Es va fer servir una sèrie paral·lela de cada femella de ratolí per realitzar la immunofluorescència. Les seccions es van incubar seqüencialment a temperatura ambient i en agitació (190rpm) amb (1) 5mL de borohidrur de sodi ($NaBH_4$) 1% en 0'05M tampó salí tris (TBS) a pH 7'6 durant 30 minuts i en obscuritat per tal de bloquejar l'autofluorescència; (2) *Normal Goat Serum* (NGS) 4%, i 0,3% Triton X-100 en TBS durant 1 hora; (3) l'anticòs primari, dilució indicada a la Taula 1 en NGS 4%, 0,3% Triton X-100 en TBS durant 1 hora i després 48 hores a 4°C; (4) l'anticòs secundari, dilució indicada a la Taula 1 en 0'3% de Triton X-100 en TBS, durant 90 minuts i a temperatura ambient. Es van fer rentats utilitzant TBS (excepte entre els passos 2 i 3). Finalment, els talls es van esbandir en tampó tris (TB), es van ordenar de rostral a caudal a sobre d'un portaobjectes amb TB-gelatina i es va cobrir utilitzant medi de muntatge Fluoromount (Millipore, 345789-20ML).

Taula 1. Anticossos i dilucions utilitzades en la immunofluorescència.

Anticòs	Dilució
Primari (reutilitzat). <i>Mouse anti-Oxytocin; Harold Gainer, clone PS60.</i>	1:250
Secundari. <i>Cascade Blue goat anti-mouse IgG; Invitrogen, C962, lot 51146A; en glicerol.</i>	1:250

4.7 Immunohistoquímica

Es van realitzar tècniques immunohistoquímiques permanents en les sèries F3 dels animals per comprovar si la injecció del vector víric havia provocat una reacció glial al teixit. Per aquesta tasca, es va utilitzar l'anticòs Iba1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*) que s'expressa en la micròglia. Les seccions es van incubar seqüencialment a temperatura ambient i en agitació (190rpm) amb (1) 1% de peròxid d'hidrogen (H_2O_2) en TBS, pH 7'6 durant 30 minuts per inhibir les peroxidases endògenes; (2) *Normal Rabbit Serum* (RNS) 4%, *Bovine Serum Albumin* (BSA) 2% i 0'3% Triton X-100 en TBS durant 1 hora; (3) l'anticòs primari, dilució indicada a la Taula 2 en RNS 2%, BSA 2% i 0,3% Triton X-100 en TBS ON; (4) l'anticòs secundari biotinilat, dilució indicada a la Taula 2 en RNS 2%, BSA 2% i 0'3% Triton X-100 en TBS durant 2 hores; (5) complex

avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC HRP Kit; Vector Labs, PK-6200) en TBS durant 90 minuts. Es van fer rentats utilitzant TBS (3x15 minuts) després dels passos 1, 3, 4 i 5, i abans de fer el revelat histològic, es va rentar amb TB (2x10 minuts). La detecció histoquímica de l'activitat peroxidasa es va fer amb una incubació en H₂O₂ 0'1% i diaminobencidina (DAB) 0'025% en TB durant aproximadament 15 minuts. Els talls es van esbandir en TB i es van ordenar de rostral a caudal a sobre d'un portaobjectes amb TB-gelatina. Finalment, es van deshidratar utilitzant banys d'etanol 96% (5 minuts), etanol pur (5 minuts) i xilè (2x10 minuts) i es va cobrir utilitzant medi de muntatge DPX (Scharlau, DP00500500).

Taula 2. Anticossos i dilucions utilitzades en la immunohistoquímica.

Anticòs	Dilució
Primari (reutilitzat). <i>Goat anti-IBA1; Abcam, ab5076</i>	1:500
Secundari. <i>Biotinilated rabbit anti-goat; Vector, BA-1000</i>	1:250
Terciari. <i>Vectastain Elite ABC HRP Kit; Vector Labs, PK-6200.</i>	-

4.8 Anàlisi de la fluorescència

La fluorescència pròpia de la proteïna reportera mCherry es va observar amb el microscopi de fluorescència invertit (Olympus BX61, càmera Leica DFC550). Es va utilitzar el filtre TRITC (vermell, $\lambda_{530-550\text{nm}}$) per tal de comprovar si hi havia injecció. Les imatges necessàries per tindre el tall complet es van prendre amb el programa LAS Core utilitzant l'objectiu de 4x i es van unir amb el programa ImageJ (imagej.nih.gov). Es van obtenir detalls de les injeccions amb els objectius de 10x i 20x.

4.9 Anàlisi de la immunofluorescència

La immunofluorescència es va observar amb el microscopi confocal invertit (Leica SP8 *Confocal Laser Scanning*). Es van utilitzar els làsers 405 (*Cascade Blue*, $\lambda_{em}410-430\text{nm}$), 488 (dextranamina marcada amb fluoresceïna, FDA, $\lambda_{em}500-540\text{nm}$) i 561 (mCherry, $\lambda_{em}590-630\text{nm}$). Les seccions d'interès es van prendre amb el programa LAS X fent un *stack* d'imatges cada 4 μm de profunditat en un format d'imatge de 512x512 píxels amb els objectius de 5x i 20x. Els *stacks* van ser processats per tal d'obtenir la màxima projecció amb el programa d'anàlisi d'imatges ImageJ (imagej.nih.gov). Primer, es va

restringir una regió d'interès (*Region of Interest, ROI*) al voltant de l'àrea de la injecció en el canal vermell (Figura 5C). Després, es van comptar les cèl·lules OTèrgiques (blaves) contingudes en aquesta regió (Figura 5D). Finalment, es van comptar les cèl·lules que apareixien en ambdós canals (colocalització del vector DREADD amb les cèl·lules OTèrgiques).

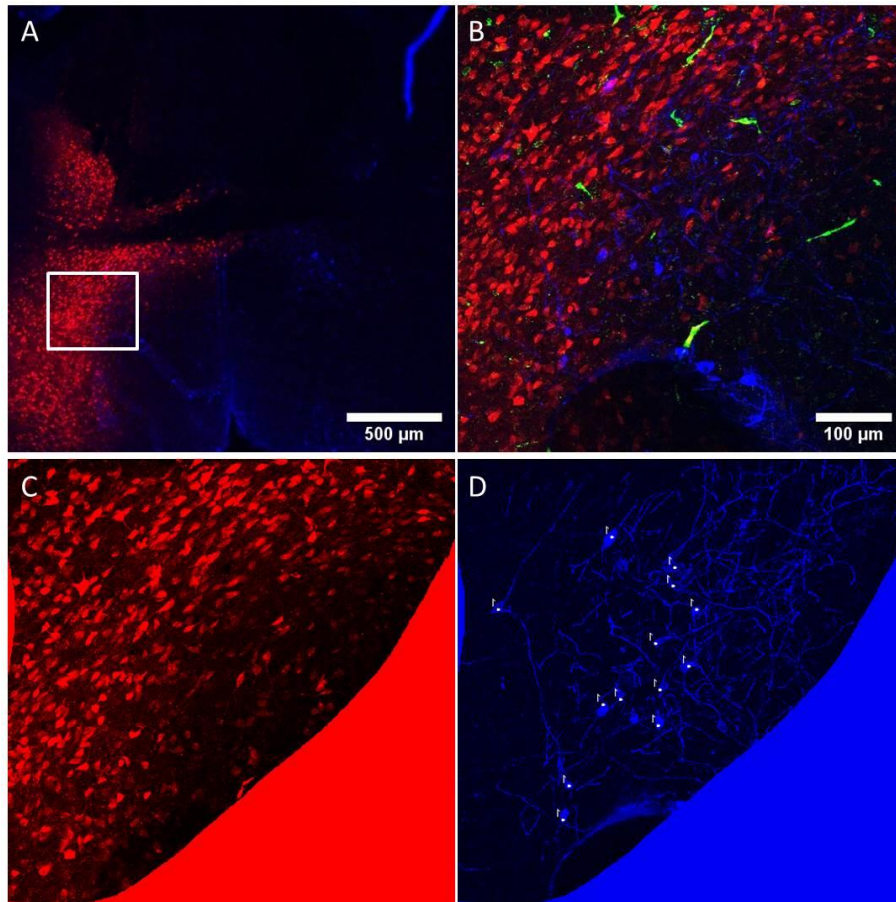


Figura 5. Processat de les imatges per l'anàlisi de la immunofluorescència. Imatge a pocs augments on es veu el lloc d'injecció (vermell) i les cèl·lules OTèrgiques (blau) (A). Detall de la màxima projecció del requadre de la imatge anterior a 200x en els tres canals activats (B). Regió d'interès (ROI) seleccionada al voltant de l'àrea de la injecció (C). Comptatge de cèl·lules OTèrgiques dintre del ROI (D).

4.10 Anàlisi de la immunohistoquímica

La immunohistoquímica permanent es va observar amb el microscopi òptic (Leica DM750, càmera Leica DFC450C), i es van obtenir imatges de les seccions d'interès amb el programa Las Core per comprovar si hi havia micròglia activada al teixit. La majoria de les imatges es van prendre amb l'objectiu de 4x i alguns detalls amb els objectius de 10x, 20x i 40x.

5. RESULTATS

5.1 BLASTn

El BLASTn ha mostrat que el valor esperat (*E-value*), relacionat amb el nombre d'alineaments previstos amb la mateixa puntuació que esperariem trobar, és 0 (Figura 6). Aquest resultat indica que la similitud entre la *query* i la base de dades no és deguda a l'atzar i, per tant, que el promotor inserit al constructe víric AAV2/1-mOXT-hM4D(Gi)-mCherry-WPRE és específic d'una regió del cromosoma 2 del ratolí on es troba el gen de l'OT. Més en concret, el primer alineament correspon a la regió genòmica *upstream* a l'exó 1 del gen de l'OT. El segon alineament es correspon a un missatger hipotètic també de l'OT (Annex 3).

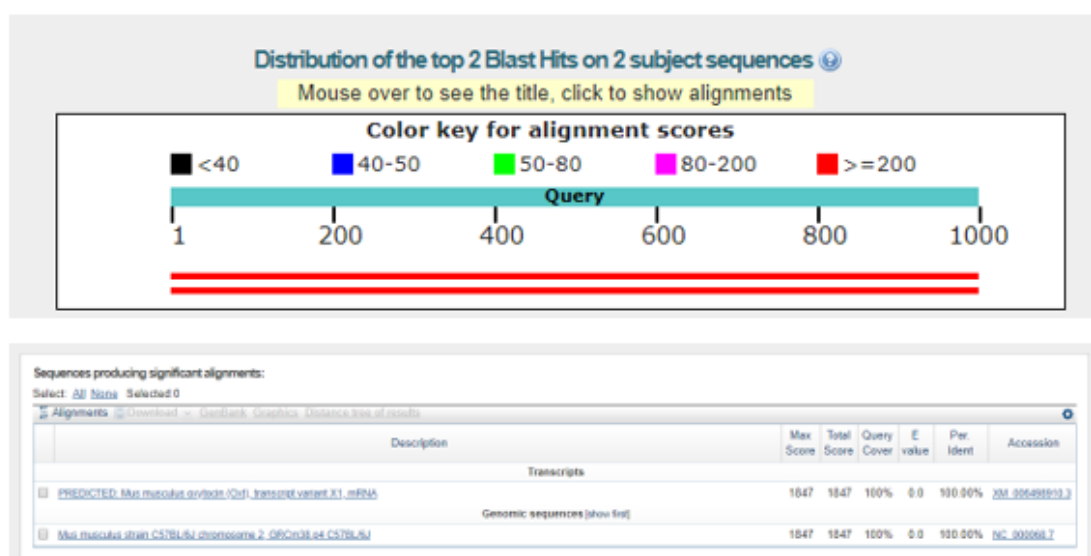


Figura 6. Resultats del BLASTn entre el promotor de l'OT murina i les bases de dades de genòmic i transcrit de ratolí. Alineament i puntuacions obtingudes amb l'eina bioinformàtica BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

5.2 Comprovació de la injecció

El resultat de la injecció es va poder comprovar gràcies a l'expressió de la proteïna fluorescent mCherry codificada pel vector. No va ser possible observar la injecció en les quatre primeres cirurgies estereotàxiques (M1947-M1950, 7 dies de supervivència) possiblement per la dificultat en la càrrega de la micropipeta amb la solució del vector víric. Per millorar aquesta part del procediment, vam barrejar el vector víric amb FDA, 1:1. Aquesta barreja és de color verdós, facilitant la manipulació i la injecció estereotàxica i, a més, permet comprovar que la solució ha entrat al teixit cerebral al

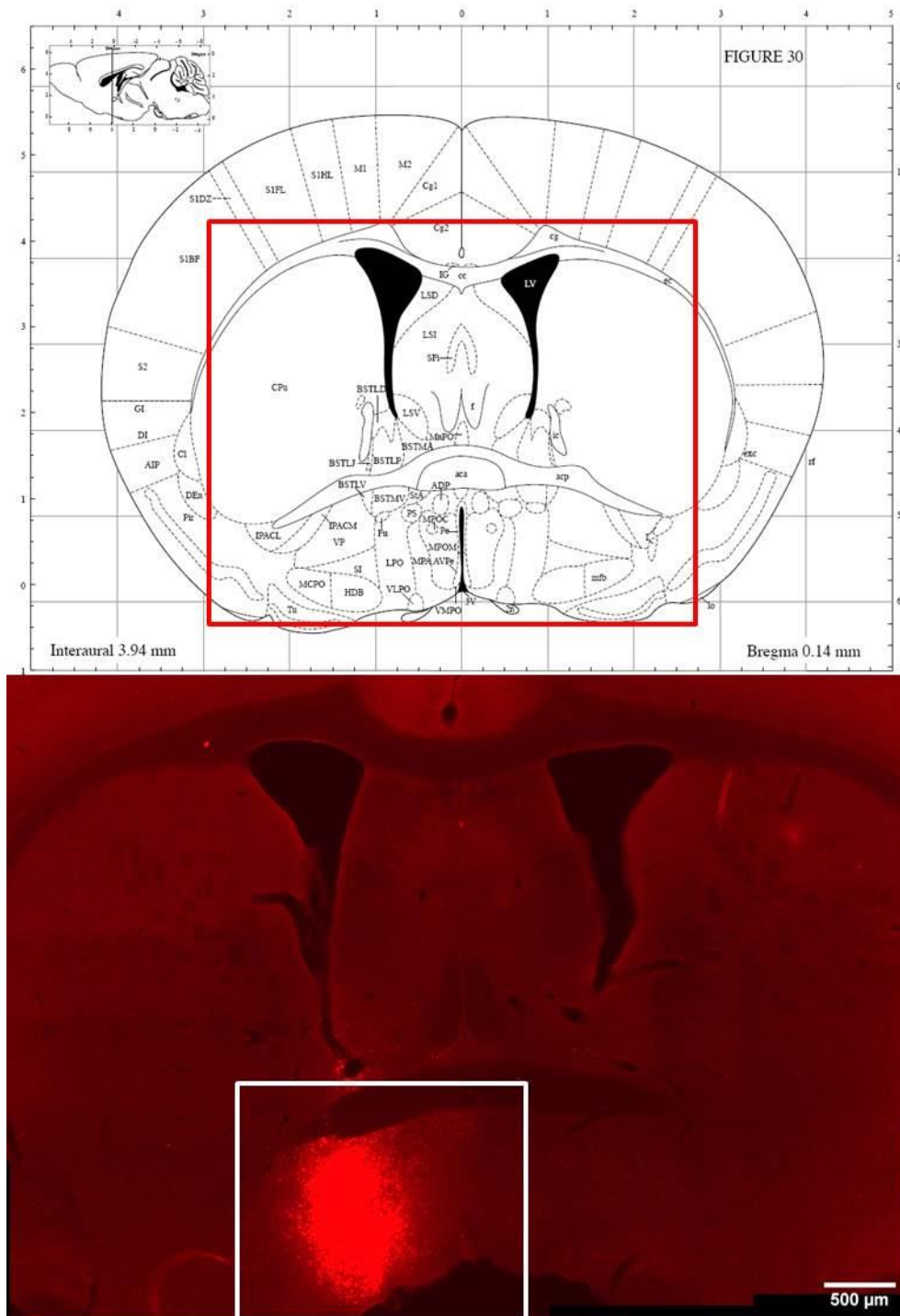


Figura 8. Injecció al nivell Bregma +0'14mm. Imatge de microscòpia de fluorescència i esquema de referència de l'Atlas (Paxinos and Keith B.J., 1997) on s'ha trobat expressió de la proteïna reportera mCherry, present al vector víric. Reconstrucció de totes les imatges necessàries per captar el tall complet, escala gràfica de 500μm.

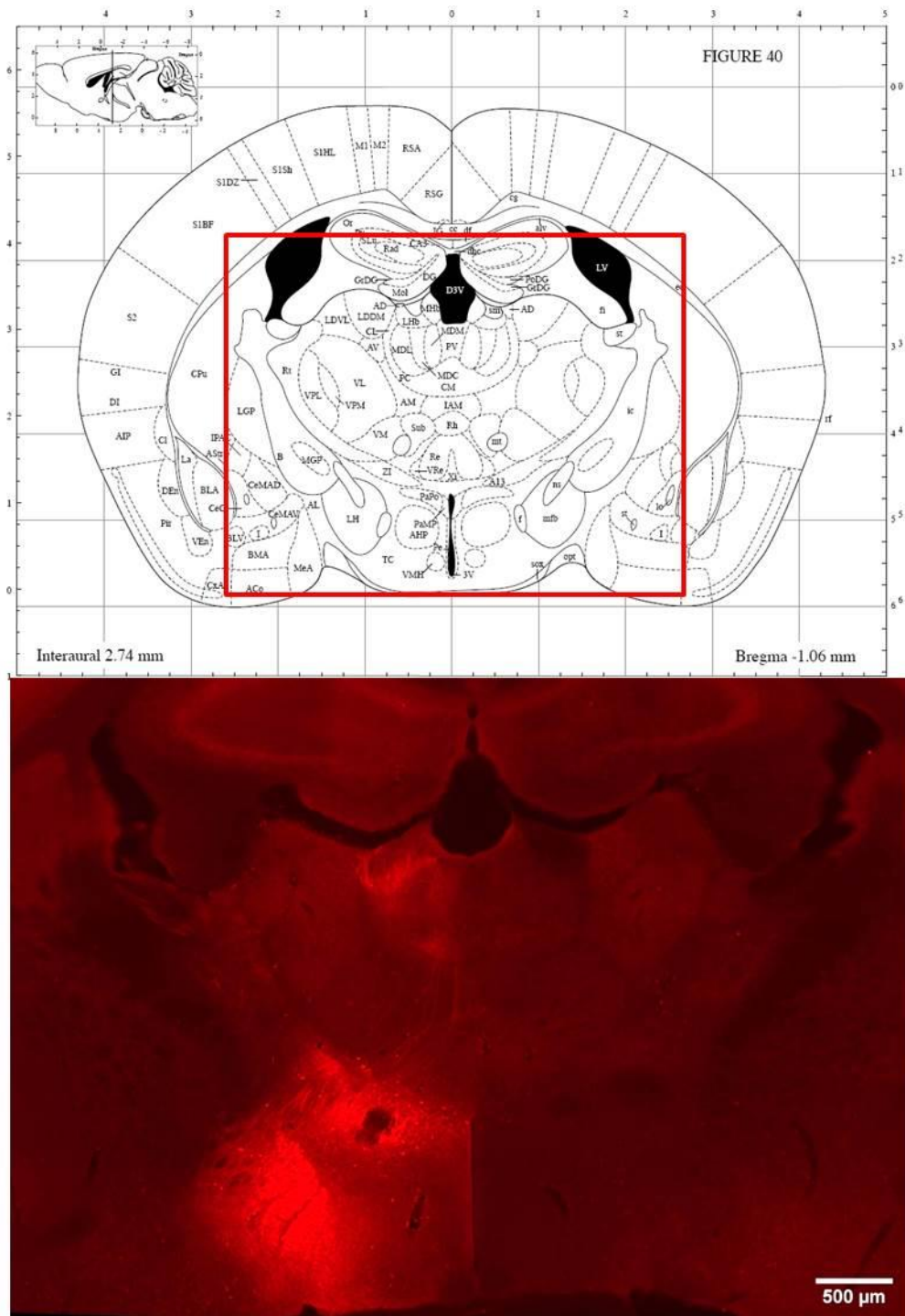


Figura 11. Injecció al nivell Bregma -1'06mm. Imatge de microscòpia de fluorescència i esquema de referència de l'Atlas (Paxinos and Keith B.J., 1997) on s'ha trobat expressió de la proteïna reportera mCherry, present al vector víric. Reconstrucció de totes les imatges necessàries per captar el tall complet, escala gràfica de 500µm.

A pocs augments es pot observar el lloc d'injecció (Figures 7-11) però a majors augments es pot veure que l'expressió de mCherry queda continguda en el citoplasma de les cèl·lules (Figura 12) i en ocasions en forma d'acumulacions granulars, probablement vesícules de transport.

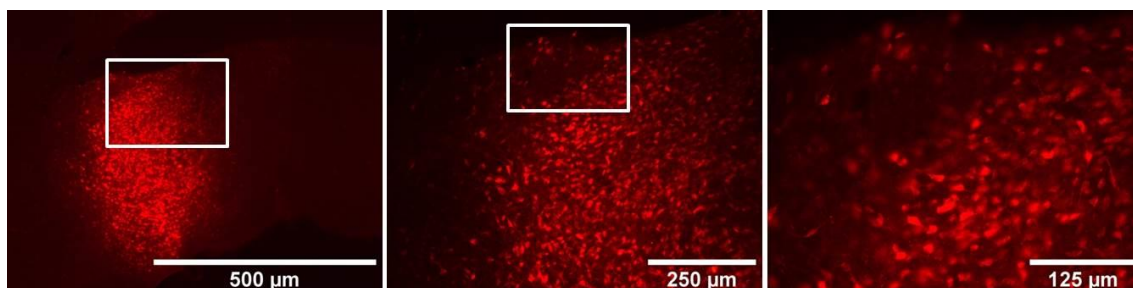


Figura 12. Detall del nivell Bregma +0'14mm. Imatges a diferents augments on es poden apreciar les cèl·lules marcades. Escala gràfica de 500µm, 250µm i 125µm.

5.3 Comprovació de l'especificitat

Una vegada comprovat que es va aconseguir injecció del vector víric, es va passar a verificar l'especificitat. Per això, es va utilitzar una sèrie de talls frontals on es va realitzar la detecció d'OT amb immunofluorescència emprant com a fluoròfor el *Cascade Blue*. D'aquesta manera, amb microscòpia confocal es va poder comprovar si hi havia colocalització de la proteïna mCherry (codificada pel vector, senyal vermell) amb l'OT marcada (*Cascade Blue*, senyal blau). La Taula 3 mostra el comptatge de cèl·lules OT positives dintre del lloc d'injecció així com també les OT positives que van ser infectades pel vector (mCherry positives). Tal i com es pot observar a la Taula 3, no totes les cèl·lules OT positives van captar el vector víric. El resultat indica que aproximadament un 17% de les cèl·lules OT expressaven mCherry. Això indica que, en les condicions experimentals emprades, el vector víric no sols s'expressa a una part de les cèl·lules OT sinó també a cèl·lules que no són OTèrgiques.

Taula 3. Colocalització al lloc d'injecció de cèl·lules oxitocina positives (OT+) i OT+ i mCherry+.

Bregma	Nucli	OT+	OT+ i mCherry+
+0'38mm	-	0	-
+0'14mm	-	0	-
-0'10mm	BST	2	1
-0'10mm	AC/ADP	13	1
-0'46mm	Pa	14	2
-1'06mm	PaPo	12	3

5.4 Anàlisi de la micròglia

Després d'haver comprovat la injecció, també es va voler veure si l'administració del vector víric i, per tant, l'expressió de proteïnes alienes al ratolí per les neurones infectades produïa una resposta del sistema immune que es traduïa en una activació de la micròglia. Per a dur a terme aquesta tasca es va utilitzar l'anticòs anti-Iba1, el qual augmenta la seva expressió com a conseqüència de l'activació de la micròglia durant la inflamació (micròglia reactiva). Aquesta micròglia activada es pot diferenciar fàcilment de la no activada per mostrar una morfologia més ramificada i una major densitat de marcatge Iba1 (Figura 13).

En el nostre cas, vam poder observar zones amb micròglia activada en l'escorça de l'hemisferi injectat, coincidint en el lloc d'entrada de la micropipeta en la cirurgia (Figura 13). Aquest resultat indica un procés inflamatori degut a la lesió superficial causada durant la cirurgia i valida l'ús de Iba1 com a marcadore d'inflamació.

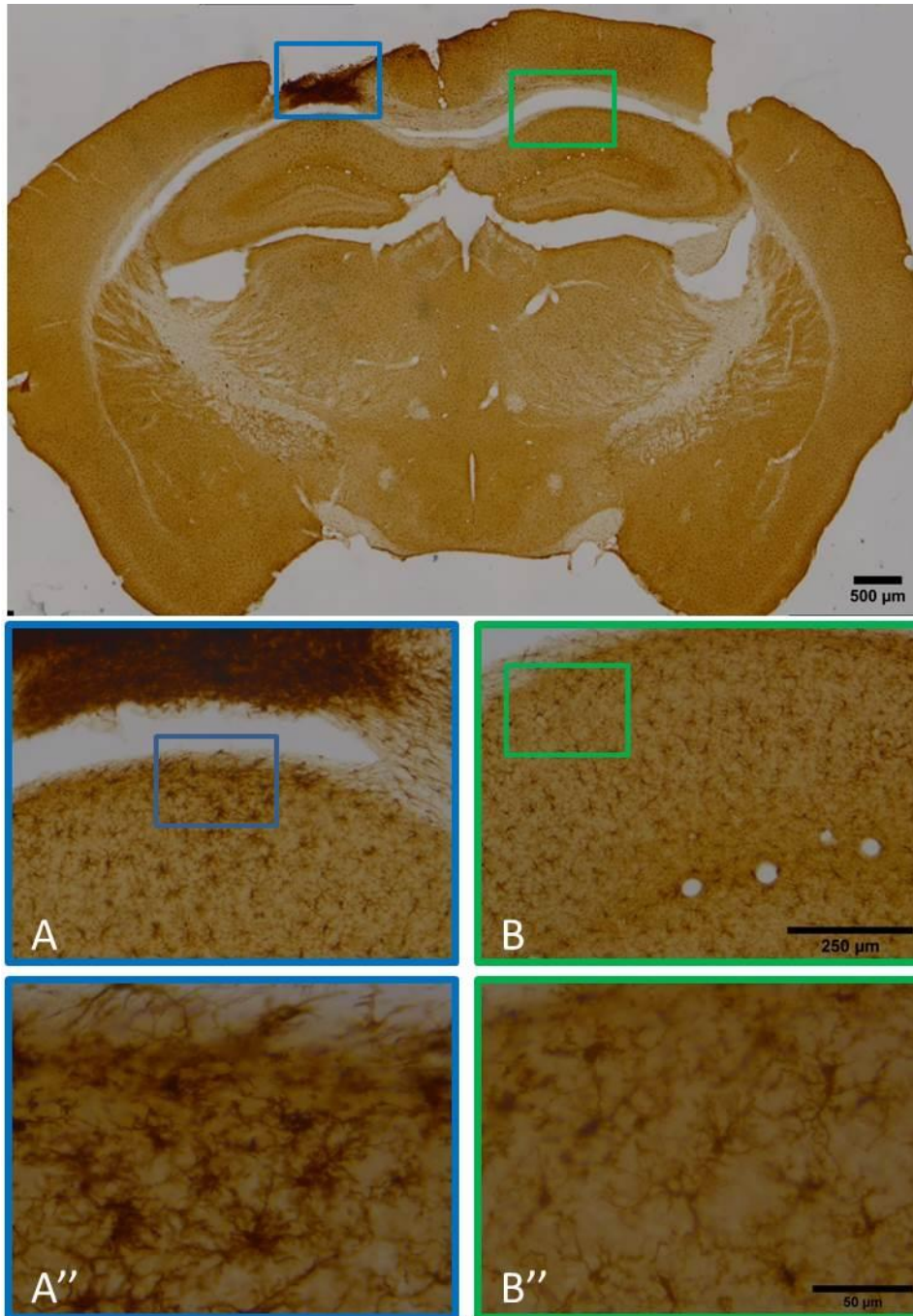


Figura 13. Immunohistoquímica per a comprovar activació de la micròglia (Iba1). Reconstrucció de totes les imatges necessàries per captar el tall complet. Es pot veure l'entrada de la micropipeta en l'escorça esquerra, escala gràfica de 500μm. Es diferencia molt bé la micròglia reactiva (Iba1) deguda a la injecció al comparar-ho amb l'hemisferi contralateral. **Detall de la immunohistoquímica per a comprovar activació de la micròglia (Iba1).** Ampliació de les regions ressaltades en la imatge anterior on es pot veure la micròglia reactiva (blau, A) en comparació a la no activada (verd, B). Escala gràfica de 250μm en A i B i 50μm en A'' i B''.

La comparació entre el lloc d'injecció i la localització equivalent en l'hemisferi contralateral ens permet comprovar si la presència del vector víric provoca reacció

inflamatòria. Tal i com mostra la Figura 14, l'aspecte del teixit entre ambdós hemisferis és semblant, fet que no suggereix l'activació de la micròglia.

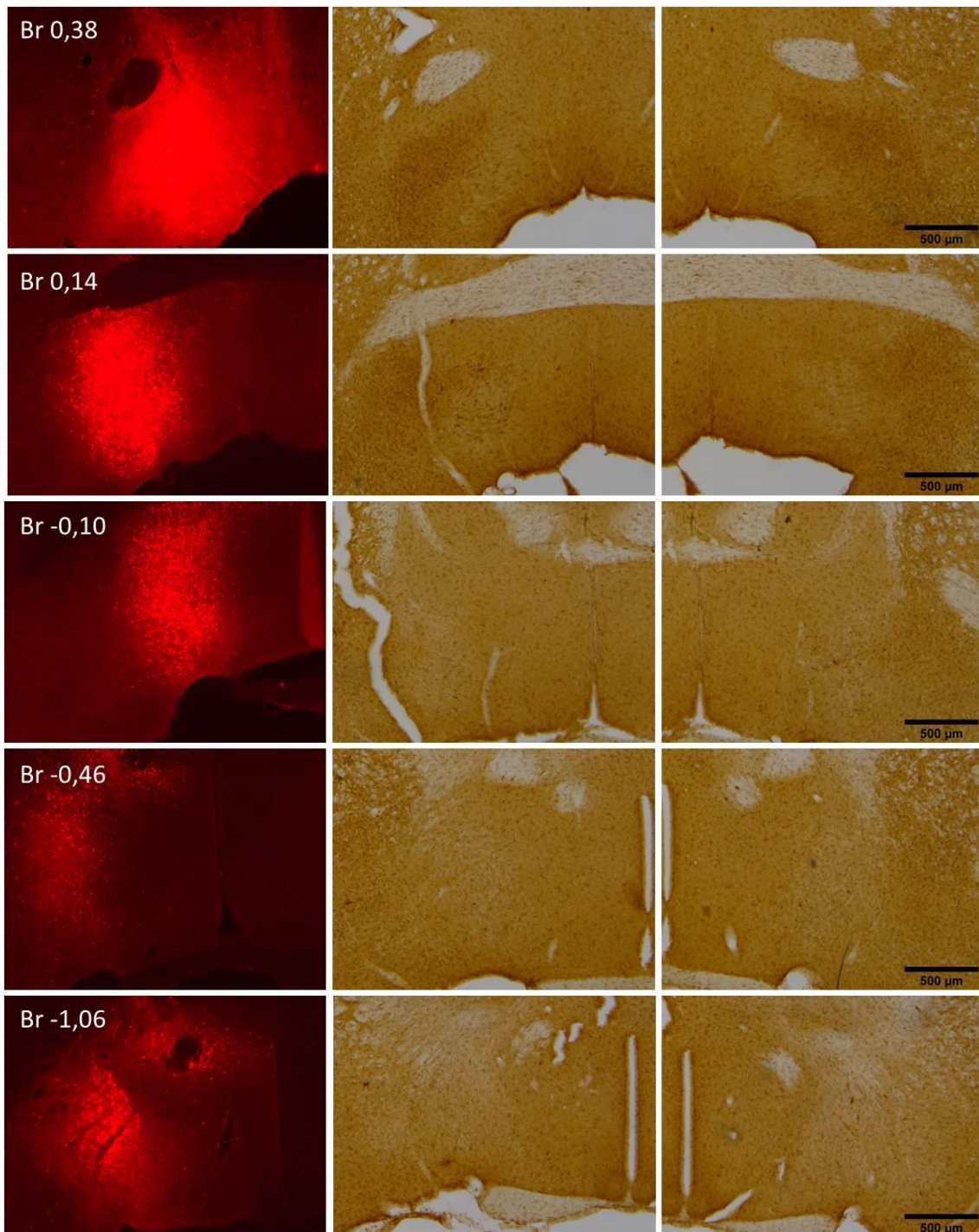


Figura 14. Lloc d'injecció i immunohistoquímica per a comprovar reactivitat de la micròglia (Iba1) en els nuclis injectats. Imatges representatives dels mateixos nivells de Bregma on es va trobar expressió de mCherry en ambdós hemisferis: injectat (imatges centrals) i contralateral (imatges a la dreta). Escala gràfica de 500μm.

6. DISCUSSIÓ

L'ús d'aquest vector víric com a ferramenta biotecnològica permetrà analitzar el paper de les cèl·lules OT positives en la conducta social i, especialment, en la conducta maternal. Amb la tecnologia DREADD, es pretenen inhibir selectivament les neurones OTèrgiques que es troben concretament en l'AC/ADP per tal de comprovar com aquesta població cel·lular influeix en el comportament maternal (Bosch, 2013).

En la major part dels models sobre les bases neuroendocrines de la conducta maternal es considera que l'OT té un paper més rellevant que si es tractés d'una hormona, actuant en molts llocs del SNC (Numan and Insel, 2003). Les idees més recents (Numan and Woodside, 2010; Numan and Young, 2016) plantegen que l'acció central de l'OT és fonamentalment sinàptica, suggerint que el nucli Pa és la principal font d'aferències OTèrgiques dels circuits implicats en el control de la conducta maternal (Figura 15).

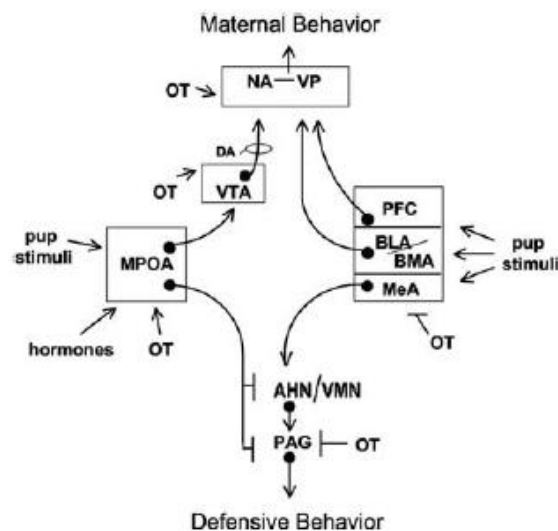


Figura 15. Circuit neural regulador de certs aspectes de la conducta maternal. L'oxitocina (OT) actua en diversos nuclis promovent respostes maternals. Les connexions que acaben en una fletxa són activadores i les que acaben en una barra són inhibidores dels comportaments maternals. (Imatge de Numan and Woodside, 2010).

Les dades anatòmiques i neuroquímiques més recents (Otero-García *et al.*, 2016) per contra suggereixen que les cèl·lules OT de l'àrea preòptica, que conformen el nucli AC/ADP, serien una font important d'innervació nonapeptidèrgica del nucli *accumbens* (Acb) i l'amígdala central. Aquestes innervacions podrien mitjançar la influència de l'OT en la motivació maternal incrementant-la i, a l'hora, disminuint la por i l'ansietat. L'ús de la tecnologia DREADD permetria testar aquesta hipòtesi ja que inhibiria

específicament les cèl·lules OTèrgiques de l'àrea de l'AC/ADP durant un temps concret i comprovar l'efecte en diversos aspectes de la conducta maternal (ansietat i motivació).

Un exemple directament relacionat amb la baixa ansietat típica d'aquest període és l'agressió maternal o defensa del niu. Quan un individu adult s'acosta al niu d'una femella lactant, aquesta l'ataca amb una agressivitat que ni tan sols mostren els mascles en l'agressió territorial, fins i tot si el mascle és gran i intimidant. Hi ha moltes evidències que apunten que aquesta conducta depèn estrictament de l'acció central de l'OT (Bosch, 2013). Per tant, esperaríem que la inhibició de les cèl·lules OT de l'AC/ADP mitjançant DREADD-CNO en femelles lactants disminuís aquesta conducta agressiva front a intrusos. Aquest fet s'avaluaria amb un test estàndard d'agressió maternal, on s'introdueix un mascle en la caixa de la mare en els primers dies postpart.

D'altra banda, durant la lactància, les femelles mostren una motivació especial per les cries. Això es tradueix en que, si les cries són desplaçades fora del niu, les mares lactants fan més esforços per retornar-les-hi que les femelles que no són mares, les quals no estan disposades a fer-ho. Per tal d'analitzar aquesta motivació, al laboratori tenen dissenyat un test (*pup-retrieval* motivat) que consisteix en posar les cries en un racó de la caixa i darrere d'una barrera de 10cm d'alçada. Per retornar-les al niu, les femelles han d'agafar-les amb la boca i carregar-les escalant la barrera de tornada fins al niu. L'esforç físic que suposa només estan disposades a fer-lo les mares. La nostra hipòtesi de treball és que la inhibició de les cèl·lules OT mitjançant DREADD-CNO disminuiria la resposta de les mares en aquest test.

6.1 Administració estereotàxica i especificitat anatòmica de l'expressió del DREADD

En aquest disseny experimental hem d'aconseguir inhibir només les cèl·lules OT de la zona preòptica (AC/ADP). Aquesta especificitat anatòmica es pot assolir utilitzant una administració estereotàxica del vector víric molt precisa.

La cirurgia estereotàxica realitzada al llarg d'aquests mesos ha comportat algunes dificultats tècniques que han impedit obtenir injeccions en el lloc desitjat, l'AC/ADP. Tal i com es pot observar en les Figures 7-11, l'error en l'estereotàxia fonamentalment

ha sigut en la coordenada M-L. Per millorar l'estereotàxia, en lloc d'obrir el crani en un sol hemisferi (unilateralment, en l'hemisferi que anem a injectar), aquesta tècnica es corregirà en un futur trepanant un forat gran en la línia mitja per tal d'injectar bilateralment. D'aquesta manera, durant l'operació també podrem veure la fissura interhemisfèrica i prendre-la com a referència per a la mesura de la coordenada M-L, la qual cosa assegura una injecció més precisa.

En qualsevol cas, els resultats demostren com l'administració estereotàxica del vector víric a través de micropipetes permet aconseguir l'expressió del DREADD, la qual es pot monitoritzar gràcies a la proteïna reportera mCherry. En les primeres injeccions no vam observar senyal de mCherry però ignoràvem si es devia a que no s'expressava el vector o a la manca d'injecció per pèrdues o embussos al sistema d'injecció. Una modificació tècnica realitzada, que ha resultat molt valuosa, és l'addició de FDA a la barreja del vector víric. En cas de no trobar marcatge amb mCherry, aquesta millora ens permetria descartar que la injecció ha fallat degut a una possible pèrdua del sistema, no obtenint-se el senyal directe de color verdós i fluorescent al lloc injectat. Seguint aquesta millora vam aconseguir dues injeccions corresponents als animals M1951 i M1952.

Una altra millora que facilitaria la injecció controlada dels volums desitjats podria ser l'ús de micropipetes amb puntes de diàmetre més gros. En el nostre cas, s'han utilitzat micropipetes de 25µm de diàmetre però es podrien utilitzar puntes de 50µm de diàmetre, com es fa al treball de Peñagarikano et al., 2015, per disminuir la pressió de sortida en el moment de la injecció.

D'aquesta manera, esperem aconseguir injeccions de volums controlats del vector en la regió diana, l'AC/ADP, de forma repetible. La repetibilitat en aquest cas és fonamental ja que només es pot comprovar la ubicació i extensió del lloc d'injecció després de realitzar tots els test de conducta i perfondre l'animal.

6.2 Especificitat neuroquímica de l'expressió del DREADD

Una altra característica que ha de tindre el vector víric és que els gens que codifica han d'expressar-se només a les cèl·lules OTèrgiques de forma que l'administració de la droga CNO inhibeixi específicament les cèl·lules del lloc d'injecció amb aquest perfil

neuroquímic. Això s'aconsegueix dissenyant un vector on l'expressió del receptor inhibidor hM4D(Gi) estigui sota el control del promotor de l'OT.

Els resultats del BLASTn indiquen que cap altra seqüència en tot el genoma i transcriptoma del ratolí presenta homologia amb el promotor de l'OT. Per tant, l'expressió del DREADD i de mCherry hauria d'estar restringida només a les cèl·lules OT positives. No obstant, els nostres resultats mostren que moltes neurones que no són OTèrgiques també expressen mCherry. Aquest fet suggereix que l'expressió del vector no és específica, possiblement per un excés de partícules víriques al teixit. Seguint les recomanacions de la *spin-off Congento*, qui va produir aquest vector, vam utilitzar la mostra de vector víric sense diluir-la, resultant en un títol de 10^{14} GC/mL. Estudis similars on empraven vectors vírics tipus DREADD amb el mateix promotor utilitzaven títols de 10^{10} GC/mL (Peñagarikano et al., 2015) en ratolí i 10^{12} GC/mL (Fields et al., 2012) en rata. Això ens fa pensar que la manca d'especificitat seria deguda a l'elevat títol víric emprat. Per tant, en el futur proposem baixar el títol de la mostra de vector víric injectada per tal d'intentar que cada cèl·lula estigui infectada per un nombre baix d'AAV. D'aquesta manera, podríem disminuir la inespecificitat de l'expressió de hM4D(Gi) i de mCherry.

D'altra banda, els resultats dels estudis d'expressió de la proteïna reportera mCherry dins de la població de cèl·lules OT indiquen que no totes les cèl·lules analitzades van captar el vector. La immunofluorescència va mostrar que només el 17% de les neurones OTèrgiques presentaven colocalització amb el senyal vermell (mCherry). Aquest percentatge és baix comparat amb la resta de bibliografia consultada, on es detecta colocalització en aproximadament el 95% de les cèl·lules OT positives (Fields et al., 2012; Peñagarikano et al., 2015). Una de les raons més probables per explicar aquest fet és una falla en la tècnica estereotàxica. De fet, les injeccions obtingudes no es van trobar centrades al nucli desitjat (AC/ADP) sinó que van afectar a nuclis limítrofs d'aquest. Tal i com hem comentat anteriorment, la injecció va quedar lateral (Figures 7-11), en nuclis que no expressen OT. Les cèl·lules OT positives de l'AC/ADP es trobaven als voltants del lloc d'injecció, només unes poques dins dels límits d'aquest. D'entre aquestes, el percentatge de cèl·lules doblement marcades és del 17%. Podríem pensar que la major part de les cèl·lules OT es localitzaven massa lluny del centre de la

injecció com per a incorporar el vector víric en quantitats suficients i expressar una quantitat detectable al microscopi de la proteïna reportera mCherry.

Caldria afinar la cirurgia estereotàxica seguint les correccions anteriorment mencionades per veure si una vegada s'hagi aconseguit la injecció en l'AC/ADP es detecta un percentatge més elevat de colocalització OT-mCherry.

6.3 Activació de micròglia

L'expressió de proteïnes alienes al ratolí, com el receptor hM4D(Gi) i la proteïna fluorescent mCherry, podria provocar l'aparició de micròglia reactiva. Aquest fet és un indicador directe del desenvolupament d'una resposta immune innata en l'encèfal (Agustín-Pavón *et al.*, 2016) que pot anar associat a un procés inflamatori del parènquima nerviós de la zona injectada. Si això ocorregués, les neurones del lloc d'injecció podrien veure modificada la seva activitat basal i la seva reactivitat, independentment de que expressaren el vector víric i fins i tot amb independència de la presència o no de la droga específica del DREADD. Per tant, és necessari comprovar prèviament que no hi ha micròglia activada induïda per l'expressió de les proteïnes codificades pel vector víric.

Amb aquesta finalitat hem utilitzat el marcador Iba1 que es troba sobreexpressat en la micròglia activada, la qual revela una morfologia dendrítica més complexa que en les cèl·lules no activades. De fet, hem pogut observar una lesió en l'escorça de l'hemisferi injectat fruit de l'entrada de la micropipeta durant la cirurgia estereotàxica (Figura 13), tal i com també es va observar a l'estudi de Agustín-Pavón *et al.*, 2016. Comparant l'hemisferi injectat i el contralateral, s'aprecia que la immunoreactivitat de Iba1 obtinguda al nostre experiment revela la inflamació associada a aquesta petita lesió cortical. Aquest resultat valida l'ús de Iba1 per a la finalitat desitjada.

En aquest sentit, en el lloc d'injecció, els resultats de l'anàlisi de la micròglia no han mostrat diferències en l'aspecte del teixit si comparem l'hemisferi injectat i el contralateral a les dues setmanes postinjecció. Aquest resultat concorda amb l'obtingut a l'estudi de Aschauer, Kreuz and Rumpel, 2013 on la injecció de diferents tipus de serotips d'AAV (1, 2, 5, 6, 8 i 9) en l'encèfal de ratolí no va induir una resposta immune tres setmanes postinjecció en comparació a la resposta observada després de

l'administració de lipopolisacàrids. No obstant això, contrasta amb els estudis de Agustín-Pavón *et al.*, 2016 on es va provar quatre i sis setmanes postinjecció que l'expressió de proteïnes alienes era suficient per augmentar la immunoreactivitat de Iba1 en comparació a l'expressió de proteïnes pròpies de rosegadors, les quals no van mostrar micròglia activada.

Com a conclusió, no hem apreciat cap procés inflamatori després de la injecció del vector víric a títols de 10^{14} GC/mL que donen una expressió massiva i no específica de les proteïnes que codifica. Per tant és molt improbable que amb títols vírics reduïts que restringirien l'expressió a les poques cèl·lules OTèrgiques de l'AC/ADP, es produís cap procés inflamatori que pogués interferir amb els resultats de l'experiment DREADD per a l'estudi de la neurobiologia de la conducta maternal.

7. CONCLUSIONS

1. La injecció de $0.4\mu\text{L}$ de la mostra del vector víric AAV2/1-mOXT-hM4D(Gi)-mCherry-WPRE en la regió preòptica de l'hipotàlem de femelles de ratolí CD1 adultes és capaç d'induir l'expressió de mCherry a nivells alts i detectables amb el microscopi de fluorescència.
2. La tècnica estereotàxica ens permet restringir l'administració del vector víric a les regions desitjades. Amb aquest treball proposem millores tècniques per fer l'administració estereotàxica del vector víric més precisa i repetible.
3. En les condicions experimentals emprades, l'expressió de la proteïna reportera mCherry no es restringeix a la població neuronal oxitocinèrgica. Per fer l'expressió més específica, proposem baixar el títol víric a nivells de 10^{10} GC/mL.
4. L'expressió massiva de la proteïna mCherry i, per tant, de hM4D(Gi) a l'hipotàlem preòptic de femelles de ratolí CD1 adultes no provoca cap reacció inflamatòria detectable amb el marcador Iba1 a les dues setmanes de supervivència.

8. PERSPECTIVES DE FUTUR

Un cop assolida l'especificitat del vector víric i la tècnica de cirurgia estereotàxica estigui optimitzada, es seleccionaran dos grups de femelles verges de ratolí CD1, destinades a ser mares i verges respectivament. Cadascun d'aquests grups es dividirà alhora en dos subgrups, un grup control (sense injecció del vector víric o en un *locus* sense cèl·lules OTèrgiques, es poden aprofitar les errades de l'estereotàxia per tal de seguir el "Principi de les 3R's") i un d'experimental (amb injecció del vector víric).

Les femelles del grup experimental, es sotmetran a la cirurgia estereotàxica amb la injecció bilateral del vector víric en l'AC/ADP. Les femelles destinades a ser mares es ficaran a creuar. Passat el part, s'administrarà per via IP la droga específica del DREADD (CNO) o el vehicle (salí) en tots els grups i es faran tests de conducta maternal (*pup-retrieval* motivat i agressió maternal). Finalment, es perfondran els animals per tal d'estudiar els encèfals utilitzant tècniques immunohistològiques i poder correlacionar el comportament amb l'expressió del DREADD en la població diana (cèl·lules OT positives).

AUTOAVALUACIÓ

La realització de les Pràctiques Externes vinculades al Treball de Fi de Grau ha originat que per primera vegada m'enfrontés a un treball que tenia una gran part pràctica. Aquest fet ha sigut molt enriquidor ja que he pogut veure com és el dia a dia en un grup de recerca i contribuir a obtenir resultats. A més, he pogut guanyar destresa al laboratori i aprendre una mica sobre un camp que no havia estudiat durant el grau, la neurociència. Durant aquests mesos, he realitzat treball assistencial en totes aquelles tècniques on hi havia involucrada la manipulació d'animals experimentals degut a que no tinc l'acreditació competent per treballar amb animals de laboratori. No obstant, he pogut assistir al manteniment de la colònia, les cirurgies estereotàxiques i les perfusions dels ratolins. La meva feina activa ha estat restringida al processat histològic de mostres, és a dir, el tall dels encèfals amb el micròtom de congelació, l'ordenació dels talls, les tècniques d'immunofluorescència i immunohistoquímica i l'anàlisi de les imatges i les dades resultants. Per acabar, dir que els objectius plantejats al principi d'aquest treball s'han complert en gran mesura i també

m'agradaria recalcar que aquest només és el principi d'un projecte que seguirà partint d'aquests resultats com a base.

AGRAÏMENTS

M'agradaria dedicar-li unes paraules a les persones que m'han acompanyat durant aquests anys. En primer lloc, agrair a la meva família per donar-me l'oportunitat d'estudiar el que més em motivava i per tot el suport. No puc deixar de mencionar a ma mare, qui em va veure començar aquest camí i em cuida des del cel des de fa quasi tres anys. Gràcies per enviar-me forces cada dia, el món necessita científics i científiques que aturen aquestes injustícies.

Agrair també als meus amics, els quals encara em pregunten quasi cada vegada que ens veiem que què és la biotecnologia. Tampoc puc oblidar-me d'Albert, gràcies per fer d'aquest un any més fàcil i per saber escoltar-me sempre.

Per últim, valorar la formació rebuda per part del professorat de la Universitat Rovira i Virgili i, molt en especial, del grup de recerca NeuroFun de la Universitat Jaume I. Gràcies per acollir-me en les Pràctiques Externes i el Treball de Fi de Grau i fer-me sentir com una més. Menció especial als meus tutors Ferran i Manoli per contagiar-me la curiositat per la neurociència. Gràcies per la dedicació i tots els consells, sobretot per ajudar-me i guiar-me en l'elaboració d'aquest treball.

BIBLIOGRAFIA

Agustín-Pavón, C. *et al.* (2016) 'Deimmunization for gene therapy: host matching of synthetic zinc finger constructs enables long-term mutant Huntingtin repression in mice.', *Molecular neurodegeneration*, 11(1), p. 64.

Aldrin-Kirk, P. and Björklund, T. (2019) 'Practical Considerations for the Use of DREADD and Other Chemogenetic Receptors to Regulate Neuronal Activity in the Mammalian Brain', in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, pp. 59–87.

Aschauer, D. F., Kreuz, S. and Rumpel, S. (2013) 'Analysis of Transduction Efficiency, Tropism and Axonal Transport of AAV Serotypes 1, 2, 5, 6, 8 and 9 in the Mouse Brain', *PLOS ONE*. Edited by J. Qiu, 8(9), p. e76310.

Bosch, O. J. (2013) 'Maternal aggression in rodents: brain oxytocin and vasopressin mediate pup defence.', *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*. The Royal Society, 368(1631), p. 20130085.

Dulac, C., O'Connell, L. A. and Wu, Z. (2014) 'Neural control of maternal and paternal behaviors', *Science (New York, N.Y.)*. NIH Public Access, 345(6198), pp. 765–70.

Fields, R. L. *et al.* (2012) 'Cell-Type Specific Oxytocin Gene Expression from AAV Delivered Promoter Deletion Constructs into the Rat Supraoptic Nucleus in vivo', *PLOS ONE*. Edited by M. N. Nitabach. Public Library of Science, 7(2), p. e32085.

Janvier Labs (2019) *SWISS - JANVIER LABS*. Available at: <https://www.janvier-labs.com/rodent-research-models-services/research-models/per-species/outbred-mice/product/swiss.html> (Accessed: 19 April 2019).

Krashes, M. J. *et al.* (2011) 'Rapid, reversible activation of AgRP neurons drives feeding behavior in mice', *Journal of Clinical Investigation*, 121(4), pp. 1424–1428.

López, H. S. (2017) *Mapping the Action of Prolactin in the Mouse Brain. Sexual Dimorphism, Steroid Regulation and the Neuroendocrinology of Maternal Behaviour*. Universitat de València.

Martín-Sánchez, A. *et al.* (2015) 'From sexual attraction to maternal aggression: When pheromones change their behavioural significance', *Hormones and Behavior*, 68, pp. 65–76.

Martín-Sánchez, A. *et al.* (2015) 'Wired for motherhood: induction of maternal care but not maternal aggression in virgin female CD1 mice', *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9, p. 197.

Mitre, M. *et al.* (2017) 'Oxytocin Modulation of Neural Circuits', in: Springer, Cham, pp. 31–53.

Newman, S. W. (1999) 'The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network.', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877, pp. 242–57.

Numan, M. and Insel, T. R. (2003) *The neurobiology of parental behavior*. Springer.

Numan, M. and Woodside, B. (2010) 'Maternity: Neural Mechanisms, Motivational Processes, and Physiological Adaptations', *Behavioral Neuroscience*, 124(6), pp. 715–741.

Numan, M. and Young, L. J. (2016) 'Neural mechanisms of mother–infant bonding and pair bonding: Similarities, differences, and broader implications', *Hormones and Behavior*, 77, pp. 98–112.

Olazábal, D. E. (2018) 'Role of oxytocin in parental behaviour', *Journal of Neuroendocrinology*, 30(7), p. e12594.

Otero-García, M. *et al.* (2016) 'Distribution of oxytocin and co-localization with arginine vasopressin in the brain of mice', *Brain Structure and Function*, 221(7), pp. 3445–3473.

Paxinos, G. and Keith B.J., F. (1997) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd edn. Edited by Elsevier - Academic Press.

Peñagarikano, O. *et al.* (2015) 'Exogenous and evoked oxytocin restores social behavior in the *Cntnap2* mouse model of autism', *Science Translational Medicine*, 7(271), pp. 271ra8-271ra8.

Annex 1. Vector víric pAAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry

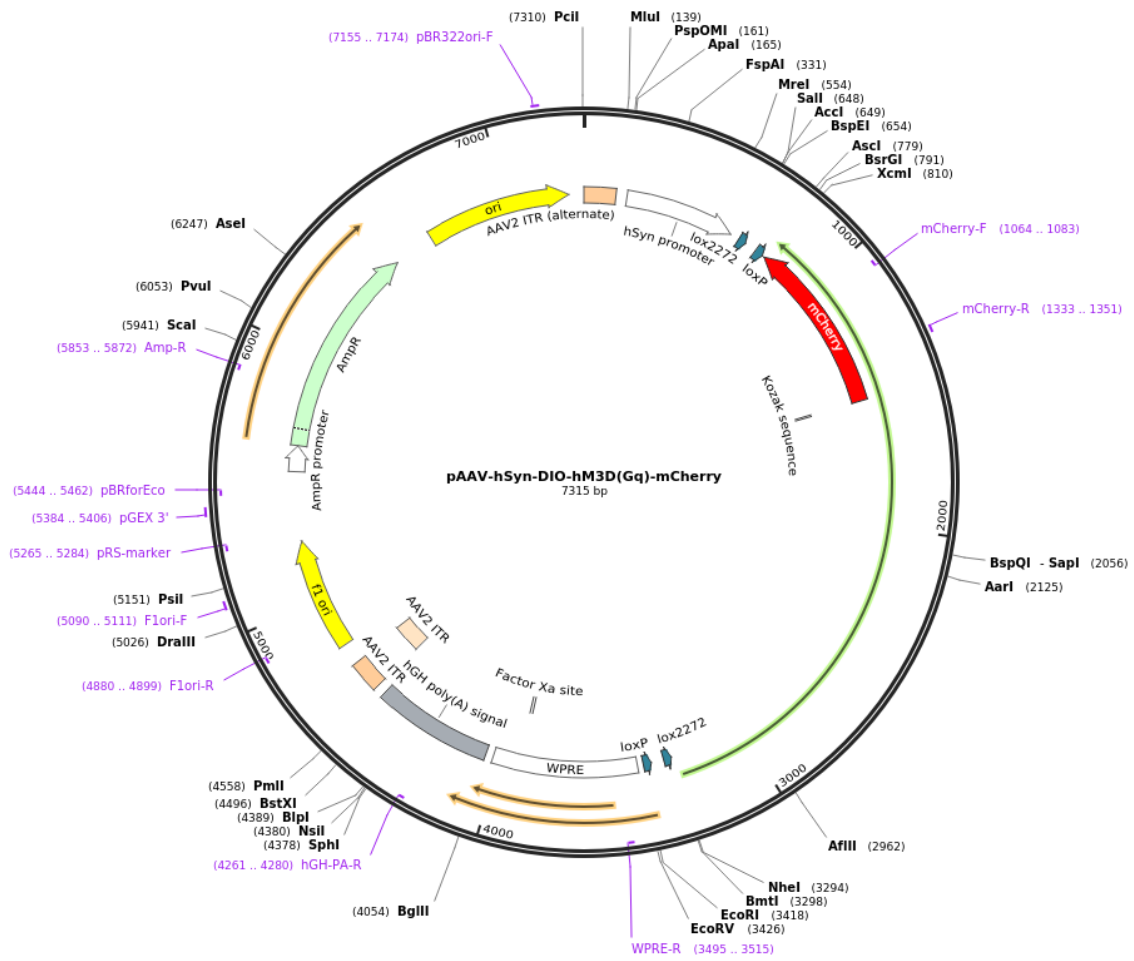


Figura A1(1). Vector víric pAAV-hSyn-DIO-hM3D(Gq)-mCherry; addgene, plasmid #44361. Aquest constructe víric ha servit com a model per dissenyar el vector utilitzat a l'experiment. (Veure material i mètodes, apartat 4.1).

