



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

Tesis de Licenciatura

La función de un ARN circular derivado del gen Tulp4 en un modelo *in vivo*: análisis de la morfología neuronal y el comportamiento.

Camila Pannunzio

Director: Dr. Sebastián Alejandro Giusti

Lugar de trabajo: Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires – CONICET
– Instituto Partner de la Sociedad Max Planck (IBioBA – MPSP).

Buenos Aires, Septiembre 2021

Camila Pannunzio

Tesista

Dr. Sebastián A. Giusti

Director

ÍNDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN	6
1. ARNs circulares	6
2. Sistema Nervioso Central en mamíferos	13
3. Abordaje experimental	19
4. Resultados previos del laboratorio	24
5. Hipótesis y objetivos	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
1. <i>Primers</i> y Reactivos	28
2. Animales	29
3. Experimentos morfológicos neuronales	31
4. Experimentos comportamentales	34
5. Estadística	39
RESULTADOS	40
1. Caracterización morfológica neuronal	40
2. Caracterización comportamental	44
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	54
ANEXO	63
BIBLIOGRAFÍA	68

RESUMEN

Los ARNs circulares (circARNs) son una clase de ARN no codificante recientemente caracterizada. Estas moléculas derivan de secuencias exónicas y son los productos de un mecanismo alternativo de *splicing* conocido como *backsplicing*, el cual trae como resultado una molécula de ARN simple cadena con extremos unidos de forma covalente. Mediante el uso de sistemas de identificación de alto rendimiento de numerosos transcriptos circulares en muestras de tejido nervioso, hemos seleccionado un transcripto circular derivado del gen Tulp4 (circTulp4) con el objetivo de llevar a cabo una caracterización funcional, basada en su alto nivel de expresión y enriquecimiento sináptico. Para tal fin, utilizamos como modelo *in vivo* ratones transgénicos *knockout* para circTulp4 generados previamente en el laboratorio mediante la técnica CRISPR/Cas9. Resultados previos demostraron que estos ratones presentan alteraciones en la neurotransmisión excitatoria, memoria de corto término, locomoción y en el comportamiento asociado a la ansiedad. Considerando estos resultados decidimos realizar una caracterización morfológica neuronal, mediante el análisis de la arborización y espinas dendríticas de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. Por otra parte, realizamos una caracterización comportamental guiados por los resultados previos, y así explorar más extensamente aspectos de la conducta asociados al aprendizaje, y los asociados a comportamientos de tipo ansioso y depresión. Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permitieron identificar un aumento en el volumen y densidad de espinas, interpretado como un mecanismo compensatorio de los déficits en la neurotransmisión excitatoria, y que la pérdida de circTulp4 conduce, desde el punto de vista comportamental, a un aumento en la sensibilidad ante estímulos estresantes o ansiogénicos.

ABSTRACT

Function of a circular RNA transcript derived from the Tulp4 gene in an *in vivo* model: analysis of neuronal morphology and behavior.

Circular RNAs (circRNAs) are a newly characterized class of noncoding RNAs. These molecules derive from exonic sequences and are the products of an alternative mechanism of splicing known as backsplicing, which yields a single-stranded RNA molecule with covalently joined ends. Using a systematic high throughput identification of numerous circular transcripts in nerve tissue samples, we have selected a circular RNA transcript derived from the Tulp4 (Tubby-like protein 4) gene to perform a functional characterization based on its high expression level and its synaptic enrichment. We have previously generated a transgenic knockout mouse line mutating a splicing acceptor site using CRISPR/Cas9, preventing circTulp4 biogenesis while preserving the transcription of the linear isoform of Tulp4. Recent results demonstrate that circTulp-4 KO mice have alterations in excitatory neurotransmission and specific behaviors, including memory and those related to anxiety and depression. Here, we performed a morphological characterization of CA1 hippocampal neurons by analyzing dendritic arborization and dendritic spines. In addition, we extended the previous behavioral characterization by performing tests to assess memory and emotional behaviors further. The results from this work have shown that circTulp4-KO mice have a higher density and volume of dendritic spines, which is interpreted as a compensatory effect to the impaired excitatory neurotransmission. Moreover, circTulp-4 loss-of-function in mice leads to an increased sensitivity to stressful or anxiogenic stimuli.

INTRODUCCIÓN

1. Un nuevo grupo de transcriptos no codificantes: los ARNs circulares.

El desarrollo de la tecnología de secuenciación de ARN en paralelo con la bioinformática ha revelado una impactante conservación en el número de genes encontrados en organismos diversos como *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus* y *Homo sapiens*, sugiriendo que la complejidad de especies no puede ser únicamente explicada por secuencias codificantes de proteínas (Lander *et al.*, 2001; Mattick *et al.*, 2003; Waterston *et al.*, 2002).

El análisis comparado de las secuencias genómicas de diversos mamíferos ha revelado, hace ya más de una década, que sólo una proporción cercana al 1,2% del ADN nuclear codifica para proteínas (Shabalina *et al.*, 2004). Sin embargo, numerosas investigaciones basadas en el uso de *microarrays* y secuenciación de ARN han demostrado que la vasta mayoría del genoma se transcribe (80-90% en humanos) (Clark *et al.*, 2011). Este fenómeno, conocido como ‘transcripción generalizada’, ha sido respaldado de manera sólida por los resultados masivos de transcriptómica provenientes del proyecto ENCODE (Birney *et al.*, 2007), poniendo a prueba la idea de que la información genética se expresa de forma funcional únicamente como proteínas.

Los ARNs que no codifican secuencias peptídicas, y por eso llamados ARNs no codificantes (ncARN), incluye a los ARNs pequeños nucleares (snARN) y nucleolares (snoARN), los ARN asociados a proteínas Piwi (piARNs), ARNs largos no codificantes (lncARNs), microARNs (miARNs) y ARN circulares (circARNs), entre otros. En la actualidad, el estudio de las funciones del genoma no codificante se ha tornado en un área activa en el campo de la biología molecular y celular.

Biogénesis

Los transcriptos circulares y lineales (mARN) de un gen derivan de las transcripciones primarias de la ARN polimerasa II por reacciones catalizadas por la maquinaria canónica *spliceosomal* (Ashwal-Fluss *et al.*, 2014; Starke *et al.*, 2015; Wang & Wang, 2015). Esta reacción involucra típicamente los sitios consenso del *splicing* GU-AG (Black, 2003) y puede incluir múltiples exones (Zhou *et al.*, 2018). A diferencia del *splicing* canónico, el llamado “*backsplicing*” que origina a los circARNs implica el ataque de un sitio dador 5’ a un sitio aceptor 3’ río arriba (Figura 1). Las moléculas de ARN resultantes son simple cadena, covalentemente cerradas, y se caracterizan por una secuencia única que no está presente en

los mARN: la unión cabeza-cola (del inglés, *head-to-tail junction*). Los circARNs pueden contener uno o varios exones adyacentes, incluir secuencias intrónicas y regiones no traducidas (UTR), y también pueden originarse a partir de la hebra *antisense* (Memczak *et al.*, 2013). Es interesante destacar que muchos circARNs se pueden producir a partir de un *locus* génico mediante *backsplicing* y/o *splicing* alternativo dentro de un circARN que contiene múltiples exones (Neff *et al.*, 2012). Los transcritos circulares presentan una mayor estabilidad debido a que son naturalmente resistentes a la acción de endonucleasas y por carecer de extremos libres. Los transcritos lineales tienen una vida media de 8 a 9 horas en células humanas (Garneau *et al.*, 2007; Neff *et al.*, 2012), a diferencia de la vida media de los circARNs la cual excede las 24-48 horas (Enuka *et al.*, 2016).

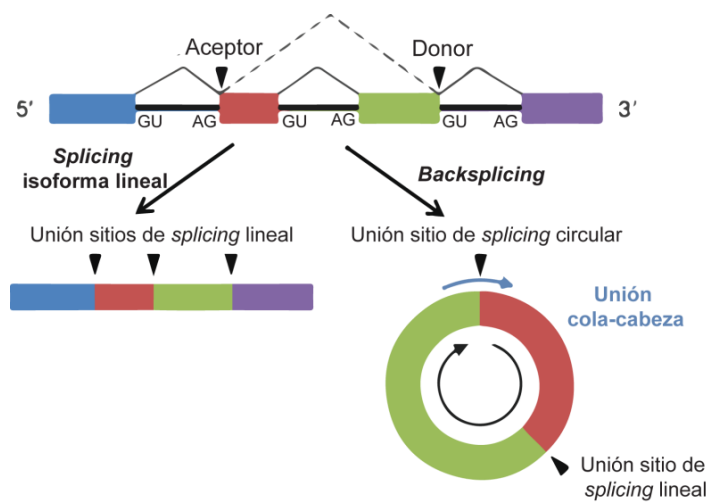


Figura 1. Biogénesis de circARNs. Las isoformas lineales o circulares tienen lugar luego de que los pre-mARNs sufran diversos eventos de *splicing*. Si los sitios de *splicing* en el pre-mRNA se empalman en un orden secuencial, es decir la forma canónica de *splicing*, se generará una isoforma lineal. Este proceso está representado en el diagrama superior por líneas continuas. De forma alternativa, si el sitio donador se empalma al sitio aceptor que se encuentra río arriba, ocurre la formación de un circARN. Las líneas punteadas representan este mecanismo llamado *backsplicing*. Debido a este empalme particular, los circARNs presentan como característica singular la unión cabeza-cola, secuencia cuyo orden no corresponde al

observado en el genoma. Adaptado de Guo *et al.*, 2014.

En general, la reacción de circularización depende de la interacción entre las secuencias intrónicas que flanquean a los exones que formarán al circARN. En este contexto, se ha observado que el apareamiento de bases entre las secuencias intrónicas con alto grado de complementariedad y la presencia de determinadas proteínas de unión a ARN, pueden promover la circularización de exones favoreciendo la proximidad de los sitios dadores y aceptores del *splicing* (Ashwal-Fluss *et al.*, 2014; Ivanov *et al.*, 2015; Kramer *et al.*, 2015). La eficiencia del proceso de *backsplicing* es además regulada por el tipo de *splicing* alternativo “*exon skipping*”, el tamaño de los exones, la velocidad de elongación de la ARN polimerasa II y por los niveles de los componentes “*core*” del *spliceosoma*, permitiendo que los ARNs circulares sean expresados de una manera tejido y estadio específica (Wilusz, 2018; Zhang *et al.*, 2016).

Introducción a los ARN circulares

Los ARN circulares se describieron por primera vez en viroides en 1976. Se decía que estos patógenos contenían “moléculas circulares de ARN simple cadena cerradas covalentemente”. Posteriormente, en 1979, se describieron ARNs circulares en células de mamífero como un genoma viral de ARN (Hsu & Coca-Prados, 1979). Aunque algunos estudios informaron posteriormente de la existencia de circARNs (Capel *et al.*, 1993; Cocquerelle *et al.*, 1992; Nigro *et al.*, 1991; Zaphiropoulos, 1996), su subrepresentación y bajos niveles de expresión han apoyado durante mucho tiempo la noción de estas moléculas como subproductos minoritarios y no funcionales de la maquinaria del *spliceosoma*.

Un cambio rotundo en la atención de la comunidad científica hacia esta clase de moléculas estuvo posibilitada por la llegada de secuenciación de ARN y la aplicación de nuevos algoritmos computacionales. Esas metodologías evidenciaron que los transcriptos circulares se expresan de manera ubicua en todo el dominio eucariota (Ashwal-Fluss *et al.*, 2014; Memczak *et al.*, 2013; Salzman *et al.*, 2012). La mayoría de las moléculas circulares derivan de genes que codifican proteínas y abarcan exones completos (Ashwal-Fluss *et al.*, 2014; Guo *et al.*, 2014; Rybak-Wolf *et al.*, 2015; You *et al.*, 2015).

Mediante el uso de la secuenciación de ARN, se ha evidenciado que el patrón de expresión de circARN es específico del tejido y de la etapa de desarrollo (Rybak-Wolf *et al.*, 2015; Venø *et al.*, 2015; You *et al.*, 2015; Westholm *et al.*, 2014). Recientemente se ha demostrado la expresión endógena de numerosos circARNs en células de mamíferos, siendo muchos de ellos abundantes en relación a su isoforma lineal, alcanzando incluso niveles de hasta 10 veces mayores (Rybak-Wolf *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014; You *et al.*, 2015), dando lugar a la idea de que este grupo de moléculas podría tener una función biológica relevante.

Detección de los transcriptos circulares

La prevalencia generalizada de los transcriptos circulares se ha subestimado durante mucho tiempo debido a numerosas razones. En primer lugar, a diferencia de los ARN pequeños, los circARNs no se segregan fácilmente por tamaño o motilidad electroforética de otras especies de ARN. En segundo lugar, las técnicas moleculares que se suelen utilizar en los estudios de ARN destruyen la circularidad porque implican la amplificación de la muestra, la fragmentación de la molécula o ambas. Por otro lado, el *microarray*, la técnica más utilizada a nivel mundial para el análisis de transcriptomas antes de la aparición de la secuenciación de alto rendimiento, no permite distinguir entre transcripciones circulares y lineales de un gen codificante.

Debido a la falta de extremos libres, los circRNAs no pueden identificarse mediante RACE (*rapid amplification of cDNA ends*) o mediante el enriquecimiento de poli-A previo a la secuenciación del RNA (Jeck & Sharpless, 2014). Incluso en la actualidad, la identificación de circRNA no es automática, sino que se basa en el postprocesamiento bioinformático de los datos de secuenciación del ARN, la cual detecta la unión característica cabeza-cola por su no colinealidad con el genoma (Memczak *et al.*, 2013; Rybak-Wolf *et al.*, 2015). Es importante señalar que, hasta hace unos años, esta era una restricción establecida por la mayoría de los algoritmos bioinformáticos que provocaba que se filtraran moléculas circulares de los datos de secuenciación de ARN. Las primeras identificaciones sistémicas de circRNAs fueron tomadas con escepticismo por algunos investigadores en el campo del ARN, argumentando que estas moléculas podrían representar subproductos de la maquinaria *spliceosomal* sin ninguna relevancia funcional (Guo *et al.*, 2014).

Un estudio reciente (Xu & Zhang, 2021), evidencia que los circARNs de mamíferos en general no se conservan y que más del 97% de la producción de circARN observada es deletérea y proviene de errores en el *splicing*. De todos modos, esto último no es inconsistente con el hecho de que una pequeña fracción de circARNs haya demostrado tener actividades bioquímicas. Existen evidencias que sustentan la presencia de los transcriptos circulares como elementos independientes de errores de *splicing*: el nivel de expresión de los circARNs se correlaciona débilmente con sus contrapartes lineales sugiriendo una regulación específica (Jeck *et al.*, 2013; Salzman *et al.*, 2012); la mayoría de los circARNs son citoplásmicos, mientras que la mayoría de los subproductos *spliceosomales* se acumulan en el sitio de transcripción (Moore & Proudfoot, 2009) y por último, se ha demostrado la funcionalidad para algunos circARNs tanto en condiciones fisiológicas como en enfermedades (Du *et al.*, 2016; Hansen *et al.*, 2013; Memczak *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2016).

Regulación espacial y temporal de la expresión de circARNs

Se ha observado en muchas oportunidades que la regulación del circARN es independiente -e incluso opuesta- a la que respecta al transcripto lineal derivado del mismo locus (Conn *et al.*, 2015; Salzman *et al.*, 2013). Un gran número de circARNs parecen expresarse específicamente dependiendo del tejido y tipo celular (Memczak *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2018). De esta forma, la abundancia relativa de las isoformas circulares está regulada de una manera específica de gen y tipo celular (Salzman *et al.*, 2012; Salzman *et al.*, 2013).

En muestras de tejido humano, se ha observado un enriquecimiento general para la expresión de circARNs en el sistema nervioso (Rybak-Wolf *et al.*, 2015). Se han identificado dos factores que contribuyen a la mayor abundancia de circARNs en el cerebro: La expresión exclusiva de muchos genes que producen circARNs en este órgano y que, en los casos en

los que el gen se expresa en otros tejidos y en cerebro, la contribución relativa de los circARNs es significativamente mayor en este último (You *et al.*, 2015).

A nivel intracelular, los transcriptos circulares y lineales de un mismo gen pueden tener una localización diferente (Rybak-Wolf *et al.*, 2015). En las neuronas, los circARNs se sitúan principalmente en el citoplasma, sin embargo, muchos de ellos están localizados y enriquecidos en compartimentos sinápticos (Rybak-Wolf *et al.*, 2015; You *et al.*, 2015). En comparación con el ARN citoplasmático y el ARN total del cerebro, el enriquecimiento de los circARNs se observó tanto en fracciones de sinaptoneurosomas murinos como a partir de microdissección de neuropilos en cortes de hipocampo (Rybak-Wolf *et al.*, 2015; You *et al.*, 2015).

Con respecto a la regulación temporal de la expresión de los circARNs, se ha observado que en muestras hipocampales (You *et al.*, 2015) y en cultivos primarios de neuronas (Rybak-Wolf *et al.*, 2015) un aumento global de los niveles de circARNs a lo largo del desarrollo. Hasta el momento y de forma exclusiva, se ha observado en el cerebro, a diferencia de otros órganos, una acumulación de los circARNs durante el envejecimiento (Gruner *et al.*, 2016; Westholm *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2018).

Al analizar de forma conjunta lo mencionado anteriormente, el patrón de expresión temporal y su localización subcelular sugieren una potencial función de algunos circARNs como reguladores de la transmisión sináptica y fenómenos de plasticidad sináptica.

Funciones y mecanismos de acción de los circARNs

Si bien se ha demostrado que algunos circARNs presentan funciones bioquímicas, existe una fuerte evidencia que los transcriptos circulares son productos, en gran parte, no funcionales (Xu & Zhang, 2021). Sin embargo, aquellos transcriptos que sí lo son, no presentan una función característica generalizada. A continuación se mencionan las funciones y mecanismos conocidos de esta clase de transcriptos.

La primera función encontrada de los circARNs fue la de actuar como esponjas de miARN, secuestrándolos y de este modo evitar su interacción con los mARN blanco, como en el caso de Cdr1as y circHIPK3 (Hansen *et al.*, 2013; Memczak *et al.*, 2013, Piwecka *et al.*, 2017, Zheng *et al.*, 2016). Otros estudios sugieren que los circARNs interactúan con proteínas de unión al ARN (RBP) (Dudekula *et al.*, 2016) actuando como: esponjas de proteínas (Abdelmohsen *et al.*, 2017; Legnini *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018a y 2018b), activadores de funciones proteicas (Li *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2013), plataformas para el ensamblaje de complejos enzima-sustrato (Du *et al.*, 2016; Du *et al.*, 2017; Zeng *et al.*, 2017) y reclutadores de proteínas en sitios específicos (Chen *et al.*, 2018). Además, se observó que un subconjunto de circARNs puede actuar como molde para la traducción de

péptidos bajo circunstancias específicas (Legnini *et al.*, 2017; Pamudurti *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018a y 2018b), aunque se cree que la vasta mayoría son no codificantes ya que únicamente una pequeña proporción de circARNs está asociada con polirribosomas (Guo *et al.*, 2014; Jeck *et al.*, 2013; Salzman *et al.*, 2013; Stagsted *et al.*, 2019; You *et al.*, 2015).

Los circARNs se acumulan durante la maduración neuronal (Rybak-Wolf *et al.*, 2015) y durante el envejecimiento (Gruner *et al.*, 2016; Westholm *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2018), y debido a esto podrían tener una función en enfermedades neurodegenerativas. Un ejemplo de esto es Cdr1as, el cual se encuentra fuertemente disminuido en muestras de hipocampo de pacientes con Alzheimer esporádico (Lukiw, 2013), además de tener implicancias importantes en la función neuronal dado que Cdr1as regula la transmisión sináptica y su ausencia afecta la funcionalidad del cerebro (Piwecka *et al.*, 2017). El transcripto circular Cdr1as es el circARN que se encuentra mejor caracterizado y es el de mayor nivel de expresión en mamíferos, siendo también alta su expresión en neuronas. Hace ya algunos años se ha descubierto que la pérdida de este circARN en un animal *knockout* (KO) genera una desregulación de miR-7 que conduce a una alteración de la función cerebral (Piwecka *et al.*, 2017).

Por otra parte, existen ARNs circulares que derivan de *loci* genómicos asociados a enfermedades específicas o con roles importantes durante el desarrollo embrionario. Esto indicaría una posible función de los circARNs derivados de esos *loci* en contextos fisiológicos y patológicos. Se ha demostrado en un estudio reciente una diferencia en los niveles de circARNs en tejidos normales y cancerosos. Se observó que los ARNs circulares son generalmente menos abundantes en tumores (Bachmayr-Heyda *et al.*, 2015). Este trabajo mencionado demuestra la existencia de una correlación negativa entre la abundancia relativa de circARNs y la proliferación celular, a partir de muestras de cáncer de colon y de ovario, como así también de muestras de fibrosis pulmonar idiopática, otra enfermedad relacionada con la proliferación celular diferencial (Bachmayr-Heyda *et al.*, 2015). De esta forma, los circARNs podrían tener una función en el desarrollo tumoral. Esto se observó en el caso de circITCH, en donde su sobreexpresión modula el crecimiento celular y suprime el crecimiento tumoral (Li *et al.*, 2015). Además, su estabilidad en fluidos extracelulares y su expresión tejido-específica, los convierte en candidatos promisorios como biomarcadores de enfermedades (Lu & Xu, 2016).

En resumen, actualmente existe consenso en considerar a los circARNs como una clase amplia de reguladores post-transcripcionales endógenos cuya funcionalidad estaría mediada por mecanismos moleculares diversos. Es por esta razón que los diseños experimentales destinados a elucidar la funcionalidad de los ARNs circulares deben orientarse -en el presente estado del arte del campo de estudio- a candidatos individuales.

El desarrollo de herramientas moleculares para estudiar los efectos de la pérdida de función es una condición necesaria para llevar a cabo una caracterización funcional. Una restricción lógica en el diseño de las herramientas que conduzcan a una de pérdida de función de circARNs es que deben preservar la expresión de las isoformas lineales derivadas del mismo gen. La estrategia predominante en estudios sobre circARNs es la generación de vectores de expresión de shARNs dirigidos contra la secuencia que corresponde a la unión de *backsplicing* (unión cabeza-cola), que se encuentra ausente en las isoformas lineales (Legnini *et al.*, 2017; Zheng *et al.*, 2016), pudiendo regular negativamente de forma específica las isoformas circulares.

Las funciones de los circARNs, ¿están relacionadas con las de la expresión del gen del cual derivan?

Si bien la función de los circARNs no necesariamente está relacionada con la del producto de expresión principal del *locus* del cual derivan, a menudo sus patrones de expresión y localización subcelular correlacionan.

En el presente trabajo, se seleccionó como candidato para estudiar su funcionalidad *in vivo*, a la molécula circTulp4, por su abundancia en sistema nervioso (ver Resultados previos del laboratorio).

¿Cuál es la función del transcrito lineal de Tulp4? Tulp4 codifica para una proteína que pertenece a la familia de TULP (*tubby-like protein*), que en los vertebrados abarca a TUB y a los TULP relacionados del 1 a 4 (Li *et al.*, 2001; North *et al.*, 1997). La familia TULP se caracteriza por un 'dominio *tubby*' C-terminal conservado que consiste en un barril β que encierra una hélice α central que interactúa con fosfoinosítidos específicos de membrana (PIP) (Ikeda *et al.*, 2002a; Santagata *et al.*, 2001). TULP4 es el miembro más distante de la familia TULP, compartiendo solo un 40-48% de identidad de secuencia con otras proteínas de la familia *tubby* del dominio *tubby* conservado. Su localización subcelular es esencialmente citoplasmática, estando también presente en cilias. En ratones, esta se expresa principalmente en el cerebro y testículos. Debido a la similitud de secuencia, se cree que esta proteína podría ser un componente de reconocimiento al sustrato en ciertas E3 ligasas (proteínas Elongin-Cullin-SOCS-box) (Kile *et al.*, 2002), participando de este modo en la vía de la ubiquitinación. A nivel de organismo completo, en ratones transgénicos homocigotas *knockout* para la mutación resultaron ser letales mientras que los ratones heterocigotas *knockout* para el gen Tulp4, se observaron alteraciones en los fenotipos comportamentales como un aumento en la respuesta de *freezing* en un *fear conditioning* contextual y de clave (IMPC, International Mouse Phenotyping Consortium). Estos resultados indican que el transcrito lineal de Tulp4 tiene efectos sobre el comportamiento. Cabe mencionar que la

delección génica de los ratones Tulp4 KO afecta a un exón río debajo de las secuencias involucradas en la generación de circTulp4. Por lo tanto, es probable que los niveles de expresión de circTulp4 no estén afectados en esa línea murina.

Para estudiar la funcionalidad de circTulp4, es necesaria la evaluación de los fenotipos que se producen como consecuencia de la pérdida de función de la molécula de interés. Este análisis fenotípico puede realizarse a diversos niveles: molecular, celular, e incluso en el organismo completo. En las siguientes secciones se detallan los diferentes niveles de estudio utilizados como estrategias predominantes en esta tesis para la caracterización funcional *in vivo* de este circARN candidato en el sistema nervioso central.

2. Principios generales de la función neuronal en el Sistema Nervioso Central de mamíferos.

Sinaptogénesis y espinogénesis en el SNC de mamífero: bases de la neurotransmisión excitatoria

Los circuitos neuronales se establecen durante el desarrollo mediante la formación de contactos sinápticos. La mayoría de los contactos sinápticos excitatorios en el Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos está compuesto de un terminal axónico pre-sináptico conteniendo vesículas sinápticas y una densidad post-sináptica (*post-synaptic density*, PSD) rica en proteínas y receptores (Harris, 1999; Hering & Sheng, 2001; Sheng & Hoogenraad, 2007). La formación de las espinas dendríticas coincide con el período principal de la sinaptogénesis durante las primeras semanas post-natales en muchas regiones del cerebro de roedores. Durante los primeros estadios de la sinaptogénesis, la mayoría de las sinapsis en las neuronas piramidales están localizadas sobre el *shaft* dendrítico; no obstante, a medida que comienzan a formarse las espinas, las sinapsis excitatorias en estas comienzan a reemplazar a las localizadas en el *shaft* dendrítico (Yuste & Bonhoeffer, 2004). En el adulto, muy pocas sinapsis excitatorias se encuentran en el *shaft*, y la gran mayoría de las espinas contienen una única sinapsis excitatoria (Harris *et al.*, 1992; LeVay, 1973).

En las neuronas excitatorias –como las neuronas piramidales del hipocampo y corteza– la llegada del potencial de acción que recorre el axón, provoca la fusión de las vesículas cargadas del neurotransmisor glutamato, las cuales están acopladas en el terminal sináptico (Burns & Augustine, 1995; Phillips *et al.*, 2001). Una vez liberadas las moléculas de neurotransmisor, el glutamato difunde en el espacio sináptico y se une a los receptores de *N-methyl-D-aspartic acid* (NMDAR) y *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid* (AMPA). Estos receptores son las dos clases principales de receptores ionotrópicos

glutamatérgicos presentes en la PSD (Hollmann, 1994). La apertura de los NMDARs y AMPARs, conduce a un flujo entrante de iones, se produce una despolarización local y se activan los canales iónicos voltaje-dependientes, como así también diversas cascadas de señalización. En su conjunto, esta serie de sucesos, lleva a múltiples eventos de despolarización que se suman y propagan hacia el soma donde si se alcanza el umbral eléctrico, un nuevo potencial de acción es generado. Esto sucede en un sitio específico llamado cono axónico, ubicado en la proximidad del cuerpo celular (Figura 2A).

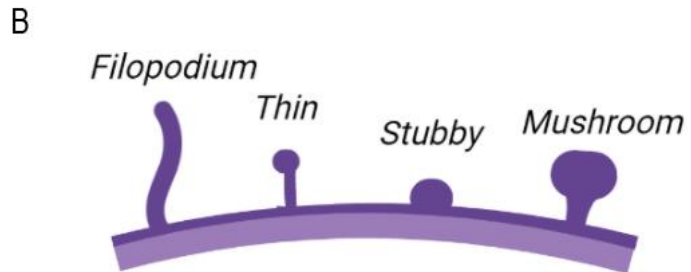
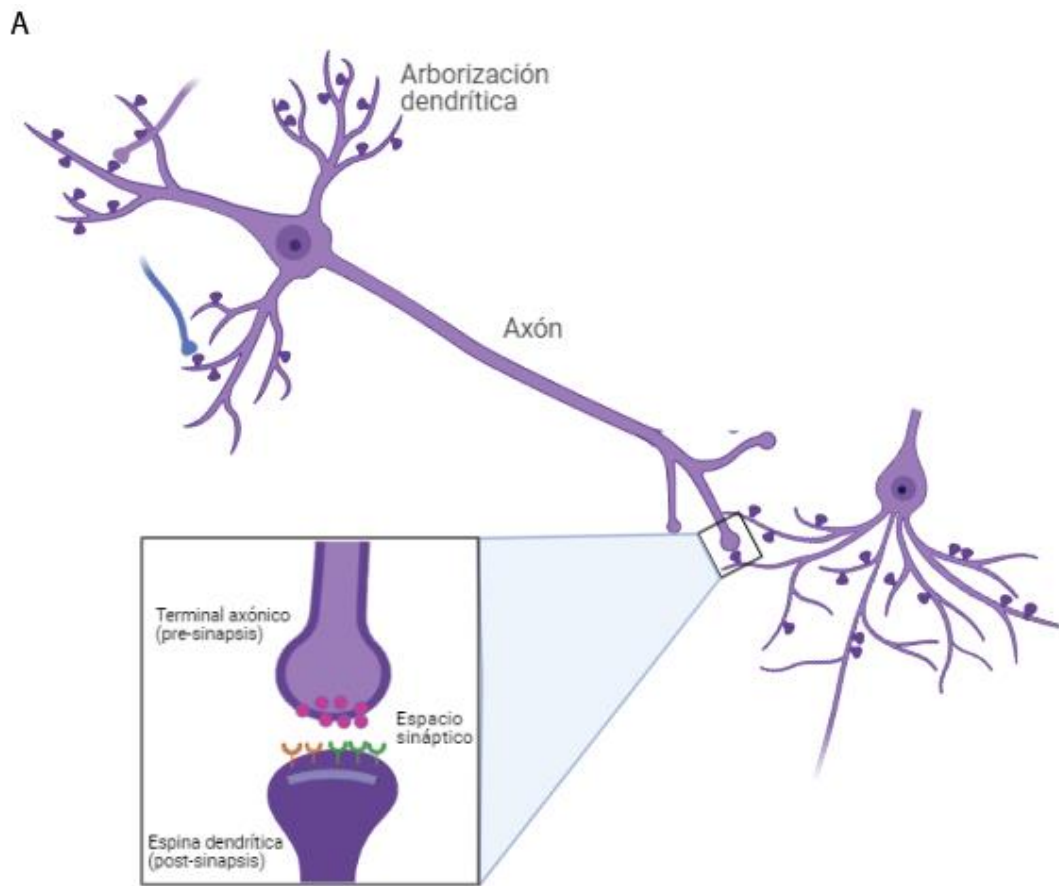


Figura 2. Sinapsis excitatoria generalizada del SNC de mamífero. (A) Durante el desarrollo post-natal del cerebro de mamíferos, la formación de espinas coincide con la sinaptogénesis. Las sinapsis excitatorias están formadas por un terminal axónico pre-sináptico de una neurona y una espina dendrítica de otra. El recuadro que se observa, muestra una magnificación de un esquema de una sinapsis; el terminal pre-sináptico contiene vesículas cargadas de glutamato y de proteínas de andamiaje, la espina dendrítica contiene receptores de glutamato y un gran número de proteínas de señalización y de andamiaje. **(B)** Las protuberancias dendríticas se clasifican en cuatro clases según su morfología: *filopodium* (delgadas, estructura *hair-like*), *thin* (cabeza bulbosa pequeña y cuello delgado), *stubby* (cortas y gruesas) y *mushroom* (cabeza grande en forma de bulbo y cuello estrecho). Adaptado de Peters & Kaiserman-Abramof, 1970. **(C)** Gradiente de variaciones morfológicas de las espinas dendríticas. **(Adaptado de Berry & Nedivi, 2017)**

Estabilización de las espinas y plasticidad sináptica

Las espinas dendríticas presentan una amplia variedad de formas y tamaños, siendo muy diversas a lo largo de las diferentes áreas del cerebro, tipos celulares y especie (Ghani *et al*, 2017). Tradicionalmente, el análisis estructural de las espinas dendríticas las agrupa en cuatro clases fijas según sus características morfológicas: *mushroom*, *thin*, *stubby* y *filopodia* (Figura 2B) (Peters, A. & Kaiserman-Abramof, I. R., 1970). Dicha clasificación se enfoca en las propiedades del cuello y cabeza de las espinas. Las espinas de tipo “*mushroom*” presentan una cabeza grande y un cuello angosto que la separa de la dendrita. Estas forman fuertes conexiones sinápticas, presentan un mayor tiempo de vida y además se cree que están implicadas en el almacenamiento de memorias de largo término (Bourne & Harris, 2007; Hayashi & Majewska, 2005). La segunda clasificación corresponde a las espinas tipo “*thin*”, las cuales presentan una estructura similar a las *mushroom*, pero la cabeza es más pequeña en relación al cuello. Son espinas más dinámicas y se cree que, acompañado de un incremento de la cabeza de la espina, son las responsables de formar nuevas memorias durante el proceso de plasticidad sináptica (Bourne & Harris, 2007; Hayashi & Majewska, 2005). En tercer lugar se encuentran las espinas “*stubby*”, las cuales típicamente no presentan un cuello en su estructura. Se las conoce como el tipo de espina que predomina en los estadios tempranos del desarrollo postnatal, pero también se las encuentra en pequeñas cantidades en la adultez, donde se forman debido a la desaparición de las espinas tipo *mushroom* (Hering & Sheng, 2001). Por último se encuentran las *filopodia*, las cuales son protrusiones con una estructura alargada y delgada sin una cabeza definida. Comúnmente se las observa en neuronas en desarrollo, aunque también pueden ser encontradas en neuronas maduras pero bajo determinadas condiciones específicas como por ejemplo luego de ciertos tipos de daño cerebral (Yoshihara *et al.*, 2009).

Inicialmente la clasificación en las tres categorías mencionadas se realizaba de forma manual, la cual era una tarea laboriosa y propensa a errores subjetivos. Debido a esto, se desarrollaron diversos algoritmos de clasificación y segmentación para automatizar este proceso permitiendo resultados rápidos, simples y con un error mínimo por parte del

experimentador. Esta clasificación automática se basa en la estimación de parámetros claves como el tamaño de la cabeza y la relación de la cabeza/cuello de la espina, y está implementada en una amplia variedad de *softwares* (Basu *et al.*, 2018; Dickstein *et al.*, 2016; Koh *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2011).

A pesar de su amplio uso en el área, el enfoque de la clasificación cualitativa mencionada anteriormente presenta limitaciones. Las transiciones entre las estructuras de tipo *mushroom*, *thin* y *stubby* ocurren de forma abrupta en esta clasificación pero gracias al avance tecnológico y de diversos estudios *in vivo*, se observó que en realidad existe un espectro continuo de variaciones morfológicas de las espinas (Figura 2C), siendo una de ellas el volumen (Arellano *et al.*, 2007; Berry & Nedivi, 2017; Loewenstein *et al.*, 2015; Tonnesen *et al.*, 2014; Wallace & Bear, 2004; Yuste & Bonhoeffer, 2004).

La formación y estabilización de las espinas son procesos regulados por la actividad neuronal; estímulos que afectan la fuerza sináptica en cultivo también influyen en el volumen y la estabilización de las espinas dendríticas. Por esta razón, se utilizan métodos que permiten la visualización de la densidad de espinas y su tamaño, y de este modo inferir la localización de las sinapsis excitatorias en cultivo, cortes de cerebro e *in vivo* (Rochefort & Konnerth, 2012).

Existe una variedad de estímulos que afectan la conectividad de los circuitos neuronales, incluyendo ciertos patrones de actividad sináptica (Engert & Bonhoeffer, 1999; Hosokawa *et al.*, 1995; Kirov & Harris, 1999; Maletic-Savatic *et al.*, 1999; Nägerl *et al.*, 2004; Yuste & Bonhoeffer, 2001), aprendizaje y memoria (Bourne & Harris, 2007; Gruart *et al.*, 2006; Neves *et al.*, 2008; Whitlock *et al.*, 2006), estrés (Fuchs *et al.*, 2006; Goldwater *et al.*, 2009; Radley *et al.*, 2008) y ansiedad (Wang G. *et al.*, 2013), hormonas (McEwen *et al.*, 1991), envejecimiento (Dumitriu *et al.*, 2010; Woolley *et al.*, 1990), como así también sustancias de abuso de consumo crónico (Kauer, 2004). El proceso de cambios en la conectividad sináptica dependientes de experiencia se conoce como plasticidad sináptica. La remodelación subyacente de las espinas dendríticas, así como los cambios en la fuerza y la función de la conectividad sináptica, constan de reordenamientos dinámicos en el citoesqueleto de actina de la espina (Hotulainen y Hoogenraad, 2010). Dos de los mecanismos celulares por los que se producen cambios dependientes de la actividad en las espinas son la plasticidad Hebbiana y homeostática. La plasticidad sináptica Hebbiana es un mecanismo a través del cual la actividad correlacionada entre la presinapsis y la postsinapsis conduce a cambios duraderos en la función sináptica (Zenle *et al.*, 2017). La potenciación de largo término (*long-term potentiation*, LTP) y depresión de largo término (*long-term depression*) corresponden a dos formas de plasticidad Hebbiana que puede inducir un aumento o reducción del tamaño de las espinas a largo término, respectivamente. Asimismo, la plasticidad homeostática es una forma

de plasticidad general que restringe la excitabilidad celular y circuital dentro de los límites fisiológicos (Wefelmeyer *et al.*, 2016), y que bajo circunstancias de privación de actividad sináptica el tamaño y la densidad de espinas se modifica (Forrest *et al.*, 2018).

Arborización dendrítica y sus espinas

La formación y la morfogénesis adecuadas de las dendritas y sus formas particulares son fundamentales para el ensamblado de los circuitos neuronales en el cerebro y proporcionan la base para que las neuronas reciban y propaguen la información. La morfología de un árbol dendrítico determina la capacidad de procesamiento e integración de señales eléctricas entrantes (London & Häusser, 2005). En este sentido, el patrón de extensión y ramificación de las dendritas controla de forma crítica el número y tipo de contactos sinápticos que establece una neurona (Parrish *et al.*, 2007; van Elburg & van Ooyen, 2010; Vetter *et al.*, 2001).

El desarrollo del árbol dendrítico está caracterizado por una secuencia de pasos complejos e interrelacionados, los cuales incluyen crecimiento de neuritas y ramificaciones, orientación sináptica, limitación del crecimiento, estabilización y remodelado (Scott & Luo, 2001). Una mala regulación del desarrollo dendrítico como también un remodelado anormal está asociado con diversos síndromes genéticos, trastornos del neurodesarrollo y enfermedades neurológicas, incluyendo retraso mental, síndrome de frágil X, síndrome de Down, síndrome de Rett y esquizofrenia (Emoto, 2011). Además, se observaron alteraciones patológicas en las dendritas y en sus espinas en modelos de ratón con enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer (Duyckaerts *et al.*, 2008; Luebke *et al.*, 2010). En diversos estudios se ha demostrado que las neuronas hipocámpales y neocorticales pueden sufrir una extensa remodelación dendrítica reversible en respuesta a factores externos o estímulos ambientales como así también a condiciones patológicas como estrés crónico, hibernación, actividad física, tareas de aprendizaje sensoriomotoras, exposición crónica a drogas, epilepsia, isquemia y daño cerebral (Emoto, 2011; Hickmott & Ethell, 2006; Lambert *et al.*, 1998; Magarinos *et al.*, 2006; Popov & Bocharova, 1992; Popov *et al.*, 1992; Spigelman *et al.*, 1998; Ruan *et al.*, 2006).

3. Abordajes experimentales para el estudio de la morfología neuronal y del comportamiento.

Estudio de la morfología neuronal

Para poder estudiar los cambios estructurales en las neuronas y las espinas dendríticas, resulta importante la obtención de imágenes que permitan cuantificar la densidad y aspectos morfológicos de las espinas como así también la complejidad y longitud del árbol dendrítico. De forma óptima, ambas estructuras deben ser examinadas a alta resolución, pero con frecuencia esto implica un compromiso en el rendimiento. La microscopía confocal de alta resolución se utiliza para visualizar las espinas en los segmentos dendríticos o neuronas completas. Previo a la microscopía, se pueden emplear varias técnicas de marcaje que pueden incluir transfección viral con GFP, inyección iontoforética con coloración fluorescente (cell loading) o expresión viral. A lo largo de los años, la necesidad de analizar imágenes de forma precisa, eficiente y en real 3D ha sido un obstáculo importante para derivar relaciones fiables entre la función neuronal alterada y los cambios en la morfología de las espinas.

En el presente trabajo, para poder caracterizar morfológicamente las neuronas hipocampales de la región CA1 de los ratones circTulp4-KO, se analizó la arborización dendrítica, tanto en su complejidad como en su longitud, y la morfología y densidad de las espinas. Las imágenes obtenidas con microscopía confocal, se procesaron y analizaron con el *software* NeuroLucida 360 (MBF Bioscience), que permite realizar reconstrucciones tridimensionales de las neuronas y sus estructuras.

Principios y modelos comportamentales

Con el objetivo de caracterizar funcionalmente a los ratones circTulp4-KO a nivel comportamental, se llevó a cabo una batería de experimentos donde se busca comparar parámetros del comportamiento entre los animales *wild type* y *knockout* para circTulp4. A continuación se describe la base teórica de cada prueba ejecutada.

1. Aprendizaje y memoria

Uno de los objetivos más desafiantes de la neurociencia es entender como el sistema nervioso adquiere – (aprendizaje) y almacena para luego evocar – (memoria) información captada del exterior. La idea de que los cambios en la fuerza de las sinapsis dentro de diversos circuitos neuronales podrían mediar el almacenamiento de la información adquirida durante el aprendizaje, tiene apoyo tanto teórico como experimental (Bliss & Lømo, 1973; Jones, 1994;

Kandel, 2001; Morris, 1999; Scoville & Milner, 1957). La plasticidad sináptica y la hipótesis de la memoria establece que: *La plasticidad sináptica dependiente de la actividad se induce en las sinapsis apropiadas durante la formación de la memoria, y es necesaria y suficiente para la codificación y el almacenamiento de trazas del tipo de memoria mediada por el área del cerebro en la que se observa esa plasticidad* (Martin *et al.*, 2000).

La memoria tiene diversas configuraciones y está distribuida a lo largo de diferentes regiones del cerebro. El hipocampo ha captado gran parte de la atención en el estudio del cerebro, con lo cual a lo largo de los años se han hecho diversos experimentos. Entre estos se encuentran las lesiones, como el caso conocido del paciente H.M (Henry Molaison (1926-2008)) (Scoville & Milner, 1957; Corkin, 1984), como así también experimentos de plasticidad sináptica, los cuales sugieren un papel importante del hipocampo en la memoria episódica de animales y humanos (Gruart *et al.*, 2006; Scoville & Milner, 1957; Whitlock *et al.*, 2006). Esta área está compuesta por diversas regiones: el giro dentado (DG), CA3, CA2, CA1, el *subiculum*, el pre y para-*subiculum* y la corteza entorrinal (EC). El giro dentado, la región CA3 y CA1 son los protagonistas de la vía trisináptica clásica. (Figura 3) El hipocampo es un sistema modelo para estudiar la plasticidad sináptica debido a su patrón laminar relativamente simple de neuronas y vías sinápticas. Estas características anatómicas hacen que el hipocampo sea apropiado para manipulaciones electrofisiológicas, genéticas y moleculares.

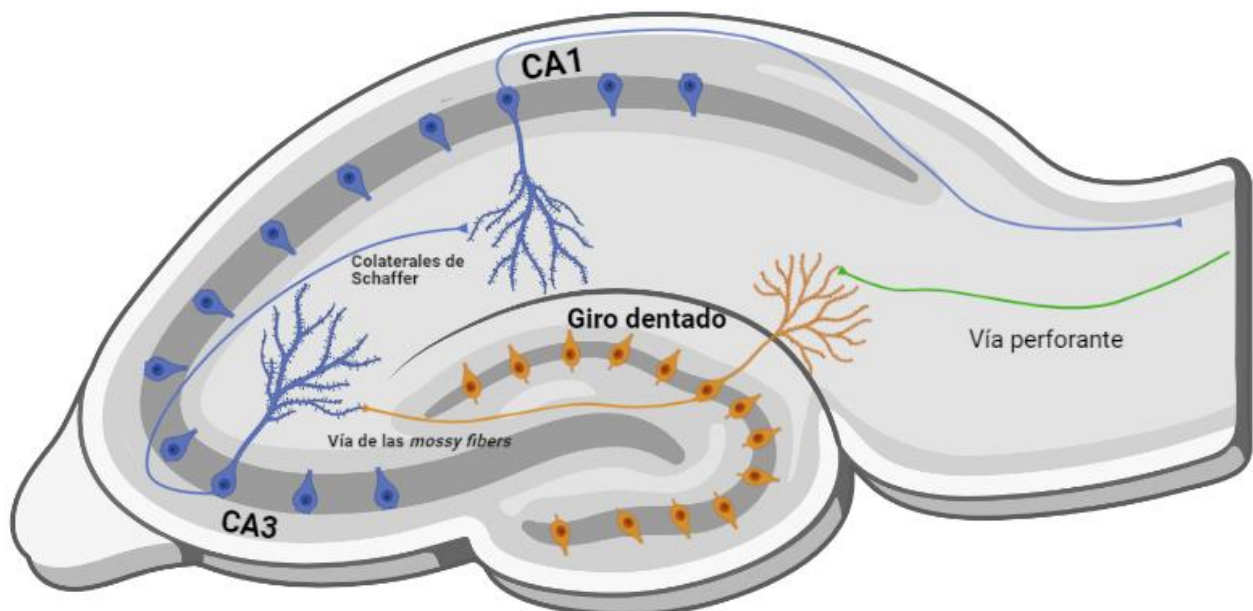


Figura 3. Clásico circuito trisináptico excitatorio del hipocampo. Diagrama representativo de un corte transversal de hipocampo de roedor, donde se encuentran expresadas las vías sinápticas excitatorias. En la vía perforante, los axones de la corteza entorrinal proyectan hacia las dendritas de las células granulares del giro dentado; en la vía de las *mossy fibers*, los axones del giro dentado contactan con las dendritas de las células piramidales de la CA3; y en la vía de las colaterales de Schaffer, los axones de la CA3 sinaptan con las dendritas de las neuronas piramidales de la CA1. Adaptado de Ho *et al.*, 2011.

En los humanos, la memoria episódica se refiere a los elementos "qué, cuándo y dónde" de una memoria relacionada con un evento. En el resto de los animales, solo el "qué" y el "dónde" pueden evaluarse mediante pruebas de comportamiento en las que se implementan señales contextuales.

Pruebas basadas en la cognición

Los tests para poner a prueba las funciones cognitivas en líneas de ratones genéticamente modificados, constituye un área sustancial de la neurociencia del comportamiento. Sin embargo, solo una pequeña fracción de las pruebas cognitivas tiene como objetivo la comprensión detallada de los procesos cognitivos subyacentes, y debe considerarse que ninguna prueba es específica para un solo dominio cognitivo.

La prueba de reconocimiento del objeto novedoso (*novel object recognition*, NOR) evalúa la memoria de reconocimiento. La prueba se basa en la preferencia natural de los roedores de pasar más tiempo explorando un objeto nuevo que uno familiar (Van Gaalen & Steckler, 2000). Se cree que la tarea depende de la función de la corteza hipocampal y perirrinal.

La prueba de alternancia espontánea del laberinto en forma de Y evalúa la memoria de trabajo espacial, la capacidad de mantener un elemento de memoria activo en mente hasta que se da una respuesta. La prueba se basa en la curiosidad natural de los roedores por explorar nuevos entornos, por lo que normalmente prefieren investigar un nuevo brazo del laberinto en lugar de volver a uno que fue visitado anteriormente (Dellu *et al.*, 2000; Wall *et al.*, 2003). En esta tarea participan diferentes áreas del cerebro, incluido el hipocampo, el *septum*, el prosencéfalo basal y la corteza prefrontal.

2. Ansiedad y depresión

En esta tesis se llevará a cabo el *Dark-light box*, *Marble burying* y la prueba de *Open Field* en baja luminosidad para evaluar comportamientos relacionados a la ansiedad, mientras que para un endofenotipo de la depresión, la prueba de preferencia por la sacarosa.

Pruebas basadas en comportamiento de tipo ansioso

Antes de describir las pruebas que evidencian el comportamiento de tipo ansioso, es importante describir con cierta precisión qué se entiende por ansiedad. La ansiedad es principalmente una respuesta a un potencial peligro y su función fundamental es evitar que el organismo se encuentre en situaciones que pongan en riesgo al individuo (Bannerman *et al.*,

2014). Está caracterizada por un aumento en la activación o *arousal*, expectativa, accionamiento del sistema autónomo y neuroendocrino, y por patrones específicos del comportamiento, que van desde la exploración y alimentación hasta comportamientos de escape o defensivos (Steimer, 2002). Se considera que la ansiedad es distinta del miedo, que es la respuesta a un peligro inmediato y real, y están involucrados diferentes circuitos neuronales en estos comportamientos protectores o defensivos (Gray, 1982; Gray & McNaughton, 2000). La ansiedad está asociada con el conflicto o la incertidumbre, y surge cuando hay competencia entre los objetivos y las opciones de respuesta disponibles al mismo tiempo. Esto puede surgir a través de diversas vías, por ejemplo, existe un conflicto entre posibles resultados no aprendidos en pruebas de laboratorio simples e incondicionadas de ansiedad, tal como lo es el laberinto en cruz elevado. Tales pruebas se basan en un conflicto de exploración versus evitación, y se requiere que el animal elija si explorar los brazos abiertos y expuestos del laberinto, que son potencialmente peligrosos pero también potencialmente gratificantes (exploración), o permanecer en un lugar seguro y cerrado (evitación) (Van Gaalen & Steckler, 2000). Gray, y posteriormente Gray y McNaughton, sugirieron que un sistema neurobiológico que medie la ansiedad debe responder a situaciones de conflicto o incertidumbre y, una vez activado, debe evocar una serie de respuestas para resolver ese conflicto (Gray, 1982; Gray & McNaughton, 2000). Esto implica aumentar los niveles de excitación, modular los procesos de atención para modificar la saliencia de los estímulos en el entorno y, suprimir los circuitos motores en curso (inhibición conductual). Además, Gray (1982) sugirió que es el sistema hipocampal el involucrado en estas funciones. Mediante lesiones citotóxicas específicas en las subregiones han fraccionado al hipocampo en términos de sus efectos comportamentales. El hipocampo dorsal (hipocampo posterior en primates) sirve a las funciones de memoria espacial del hipocampo mientras que el ventral (hipocampo anterior en primates) subyace a los efectos ansiolíticos de las lesiones del hipocampo (Bannerman *et al.*, 2003; Bannerman *et al.*, 2014).

Las pruebas usadas para examinar el comportamiento ansioso en los ratones pueden ser divididas en pruebas incondicionadas (basadas en la etiología) y condicionadas (Lister, 1990; Rodgers *et al.*, 1997). Las pruebas incondicionadas más utilizadas incluyen al *open field*, laberinto en forma de cruz elevado y el *dark-light box*. Estos métodos se basan en medir el comportamiento de aproximación-evitación. Sin embargo, el material y los métodos utilizados para realizar estas pruebas varían enormemente entre los laboratorios, y por lo tanto, la interpretación y comparación de los resultados no siempre es evidente y directa (Bouwknicht & Paylor, 2008; Hogg, 1996; Stanford, 2007). A pesar de que la medición de este comportamiento puede realizarse mediante una única prueba, es más adecuado realizar una batería de test comportamentales para poder examinar el fenotipo conductual individualmente, ya que estas evaluaciones miden la ansiedad en diferentes condiciones (Van

Gaalen & Steckler, 2000). Los datos obtenidos de diferentes pruebas pueden ser combinadas para crear variables “derivadas” que ofrecen una descripción más completa del perfil comportamental de los individuos (Steimer, 2011).

La prueba *Dark-light box* evalúa el comportamiento ansioso de los ratones, los cuales presentan una preferencia natural por los ambientes oscuros. Esta prueba está basada en la aversión innata de los roedores por los ambientes iluminados y en su actividad exploratoria espontánea de un ambiente novedoso en respuesta a estresores leves como lo es la luz y el ambiente desconocido. Esta prueba puede ejecutarse con diversas variantes, ya sea en el ciclo de luz-oscuridad de los ratones, en la ubicación inicial del animal en el compartimento (oscuro o iluminado), en la exposición previa o no del ratón a una prueba de estrés, o incluso en cómo este armado el dispositivo según las proporciones de espacio iluminado u oscuro. Este amplio número de variantes posibles, permite obtener diversas interpretaciones de los resultados (Bourin & Hascoët, 2003).

Otra de las pruebas para evaluar el comportamiento ansioso de los ratones es el llamado *Marble burying*. Esta prueba radica en la naturaleza de los ratones por enterrar objetos que consideran nocivos los cuales le causan ansiedad (Deacon *et al.*, 2006), en este caso dichos objetos son canicas de vidrio desconocidas para ellos.

Finalmente, el test de *Open Field*, además de evaluar la locomoción de los ratones, brinda información acerca del comportamiento ansioso. Esto es evaluado mediante el tiempo que los animales pasan en el centro del campo, el cual es ansiogénico. Esta premisa está basada en la tendencia natural de los ratones de desplazarse o permanecer próximos a las paredes, comportamiento denominado tigmotaxis (Simon *et al.*, 1994).

Prueba basada en un endofenotipo de la depresión

La depresión se caracteriza por presentar síntomas como una profunda desregulación de las emociones, baja autoestima, pérdida de interés y una disminución en la motivación, como así también tiene asociado déficits cognitivos, concentración reducida frente a la ejecución de actividades, fatiga y otras alteraciones metabólicas y endocrinas (Gotlib & Joormann, 2010; Xu *et al.*, 2017). A pesar de los avances significativos en la investigación de disfunciones cognitivas, emocionales y neuronales específicas asociadas a la depresión, la neurobiología que la subyace todavía presenta numerosas incógnitas.

Para poder estudiar las bases moleculares, genéticas y neurobiológicas de la depresión, es necesario acudir al ratón como modelo experimental. Sin embargo, es apropiado mencionar que actualmente está en discusión si la depresión es un comportamiento posible de medir en los ratones. Debido a la complejidad de dicha enfermedad, es correcto hablar de endofenotipos, donde diversos aspectos de los mismos se ven reflejados en las

pruebas comportamentales. Un ejemplo de esto es la anhedonia y su evaluación mediante la prueba de preferencia por la sacarosa. Contando con el conocimiento obtenido hasta el momento de los mecanismos involucrados en esta enfermedad, se han desarrollado muchos tipos de evaluaciones comportamentales que pueden emplearse para comparar a los ratones e identificar si un ratón tiene anhedonia o está “deprimido” (Cryan *et al.*, 2005; Griebel *et al.*, 2002; Porsolt *et al.*, 1977; Tanti & Belzung, 2010). Se ha demostrado que los roedores consumen con avidez de forma natural alimentos dulces y beben selectivamente una solución dulce cuando se les da un régimen de libre elección de acceso a dos botellas: una con agua y la otra con solución de sacarosa (Goshen *et al.*, 2008; Sobrian & Ressler, 2003; Zhou *et al.*, 2011). Sin embargo, al exponer a esta situación a modelos de depresión basados en el estrés, es decir, que previamente fueron sometidos a estresores leves, los roedores no tuvieron preferencia por la solución azucarada (Goshen *et al.*, 2008; Sobrian & Ressler, 2003; Zhou *et al.*, 2011). Esta prueba se denomina preferencia por la sacarosa, en la cual dicha preferencia es medida a través de un índice. Numerosos estudios en el campo de la depresión, sugieren que una solución de sacarosa al 1-2% m/V es la concentración óptima para ofrecer a los roedores junto con agua para distinguir si están “deprimidos” o no (Goshen *et al.*, 2008; Sobrian & Ressler, 2003; Zhou *et al.*, 2011). En otro estudio, se observó que si a estos animales “deprimidos” se los trata con antidepressivos, recuperan la preferencia por la sacarosa (Liu *et al.*, 2015). Por lo tanto, es ampliamente aceptado que el índice de preferencia por la sacarosa es un parámetro útil para medir la anhedonia en roedores.

4. Resultados previos del laboratorio

Como punto de partida del proyecto de caracterización funcional de ARNs circulares, nuestro laboratorio realizó un análisis exhaustivo de estos transcritos en muestras humanas y murinas derivadas de tejidos y líneas celulares de origen nervioso (Rybak-Wolf *et al.*, 2015). Para tal fin, se utilizó la tecnología de secuenciación de ARN sumado a un posterior procesamiento informático que permitió identificar las uniones cabeza-cola como indicador específico de los transcritos circulares. Se detectaron en total 15.849 circARNs diferentes en muestras de ratón y 65.731 en muestras humanas. Además, se observó que cientos de circARNs presentaban niveles de expresión varias veces superior al de las isoformas lineales derivadas del mismo gen. En otros estudios publicados recientemente (You *et al.*, 2015), al igual que lo observado en nuestro laboratorio, se observó que los circARNs se encuentran enriquecidos en tejido nervioso en comparación con otros tejidos.

Uno de los primeros motivos por el cual se elige a circTulp4 para la caracterización funcional, es debido a la comparación de la expresión del mismo y de su isoforma lineal en distintos órganos tales como riñón, pulmón, corazón, hígado, bazo, timo, corteza cerebral,

hipocampo y cerebelo. En este análisis se observó que la mayor expresión del circTulp4 está presente en cerebro, y no así en los otros órganos (Figura 4C). Además, su isoforma lineal se encuentra prácticamente ausente en todos los órganos.

El criterio de selección como candidato para la caracterización funcional del circTulp4 se estableció según los datos de secuenciación generados por nuestro laboratorio a partir de corteza frontal, sinaptoneurosomas y cultivos primarios de neuronas de origen murino, que indicaron un elevado nivel de expresión de este circARN. Además de analizar la expresión en cultivos neuronales, se llevó a cabo la cuantificación de la expresión de circTulp4 y de su isoforma lineal en cultivos primarios de astrocitos. Al comparar la expresión del mismo en ambos cultivos se observó una expresión significativamente mayor de circTulp4 en neuronas que en astrocitos, mientras que la isoforma lineal entre ambos tipos celulares fue semejante.

Para realizar dicha caracterización, en nuestro laboratorio se desarrollaron como primer paso, vectores que permitieran realizar experimentos de pérdida de función. Para lograr la regulación negativa de este circARN, se llevó a cabo la expresión de un shARN dirigido contra la secuencia que forma la unión cabeza-cola (shCircTulp4). Se verificó la eficiencia y especificidad de los vectores (ausencia de modulación de la isoforma lineal) a través de su expresión en una línea celular murina derivada de neuroblastoma (Neuro-2a) y la cuantificación de circTulp4 y su isoforma lineal mediante qPCR.

Cabe destacar que -basado en los efectos observados por la pérdida de función de este ARN circular en neuronas en cultivo- nuestro laboratorio recientemente generó ratones *knockout* para circTulp4 (circTulp4-KO) por medio de la técnica CRISPR/Cas9, en colaboración con el grupo del Dr. Wurst, en el Helmholtz Zentrum de Múnich, Alemania. La modificación genética consistió en mutar un sitio aceptor de *splicing* que -por las características de este *locus*- no afecta el *splicing* de la forma lineal y al mismo tiempo evita la generación del circARN (Figura 4A). Es importante notar que no se observaron variaciones significativas de la isoforma lineal derivada del mismo gen, lo cual valida la especificidad del efecto de pérdida de función del transcrito circular (Figura 4C). Cabe destacar que circTulp4-KO es una de las primeras líneas de ratones genéticamente modificada que afecta de forma específica la generación de un ARN circular sin perjudicar la expresión de la isoforma lineal.

Estos animales *knockout* resultaron ser viables y fértiles, pero mostraron diversas alteraciones en la neurotransmisión excitatoria (Figura A1). Por otro lado, se llevaron a cabo pruebas de diversos parámetros neurológicos incluyendo la función muscular, equilibrio, coordinación motora, nocicepción y sensibilidad auditiva, que demostraron que los ratones circTulp4-KO no presentan alteraciones neurológicas significativas. A su vez, esto permite la utilización de pruebas comportamentales que dependen fuertemente de esas funciones neurológicas.

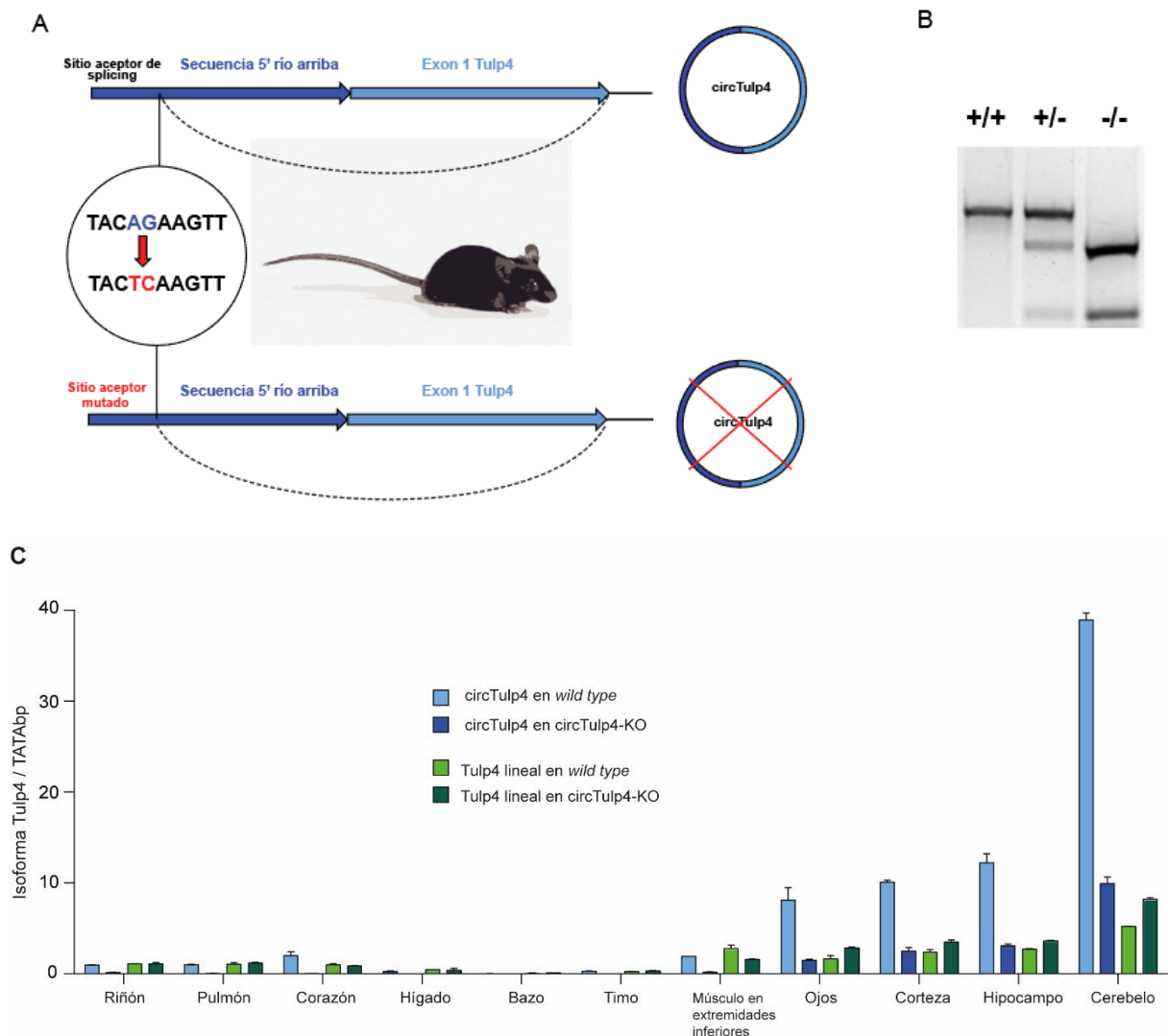


Figura 4. Generación de ratones circTulp4-KO y genotipado. (A) Diseño de la generación de la línea de ratones *knockout* para circTulp4. Mediante la técnica de CRISPR/Cas9 se introdujo una mutación en el sitio aceptor de *splicing* que participa en la reacción de formación de circTulp4. Debido a que este sitio es parte de la secuencia 5' río arriba del exón 1, no afecta la producción de la isoforma lineal. (B) Genotipado representativo de la línea de ratones CircTulp4-KO. En los animales en los que está presente la mutación que elimina el sitio de *backsplicing* se genera un sitio de restricción para la enzima Ddel. Para poder identificar a estos de los *wild type*, se realizaron PCR con *primers* específicos que flanquean el sitio de aceptor del *splicing* en cuestión y los productos de la misma son digeridos con Ddel. Los productos de digestión posteriormente son revelados mediante una electroforesis en gel de agarosa. De esta forma es posible identificar a los animales *wild type*, heterocigotas y homocigotas para la mutación. (C) Abundancia relativa de las isoformas lineales y circulares de Tulp4 en tejidos de ratón. CircTulp4 se encuentra fuertemente disminuido, pero no completamente ausente, en los tejidos de ratones circTulp4-KO. El producto detectado corresponde a un circARN que se genera mediante el uso de un sitio crítico de *splicing* localizado a dos pares de base del sitio mutado.

Previamente en el laboratorio, en el área del comportamiento animal, se llevó a cabo una batería de experimentos comportamentales que incluyeron la prueba de nado forzado, reconocimiento social, respuesta de sobresalto acústico (del inglés *Acoustic-startle response*), laberinto en forma de Y, laberinto elevado en forma de cruz y el *Open Field*. Es importante resaltar que las pruebas que evalúan el comportamiento de tipo ansioso (*Acoustic-startle response* y laberinto elevado en forma de cruz) y la memoria de trabajo (laberinto en forma de

Y) presentaron diferencias entre los grupos *wild type* y *knockout*, denotando mayor ansiedad y alteraciones en la memoria. A lo largo de esta tesis de licenciatura se ampliará y complementarán estas pruebas con las realizadas actualmente.

5. Hipótesis y objetivos

Debido a la alteración en la neurotransmisión excitatoria observada *in vivo* en ratones circTulp4 KO, nuestra **hipótesis de trabajo** propone que este fenómeno podría estar asociado a una variación en la densidad de las espinas dendríticas, como así también a alteraciones morfológicas del árbol dendrítico de las neuronas piramidales. Se espera, además, que las alteraciones en la neurotransmisión tengan un correlato a nivel del comportamiento.

Objetivo general

El objetivo general de la presente es elucidar la función del ARN circular circTulp4 en un modelo murino *in vivo*.

Objetivos específicos

Se evaluarán dos aspectos de la función *in vivo* de circTulp4 mediante el uso de ratones *knockout* para circTulp4:

1. Caracterización morfológica: Análisis de la arborización dendrítica de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo. Cuantificación de la densidad y morfología de las espinas dendríticas.
2. Caracterización comportamental: Exploración de las funciones de cognición y memoria, y endofenotipos asociados a la ansiedad y depresión.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. *Primers* y Reactivos

Primers para genotipado

CircTulp4	F: CCGGCAGGAACAAGGGATAG
	R: GGTGCTCCAGCTGATGCTTA
Thy1-eGFP	F: TCTGAGTGGCAAAGGACCTTAGG
	R: GTCCTCCTTGAAGTCGATGC

Buffers generales y soluciones

1x PBS (pH 7,4)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

20 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

10x Buffer TAE (pH 8,1)

4,84% (m/v) Tris-Base

1,14% (m/v) Ácido acético glacial

0,37% (m/v) EDTA

6x Buffer de carga Orange G (pH 7,5)

0,1% (m/v) Orange G

0,02 M Tris/HCl

15% (v/v) Glicerol

2. Animales

Mantenimiento de los animales

Para todos los experimentos, los ratones se alojaron en condiciones normales de laboratorio (22 ± 1 °C, 55 ± 5 % de humedad) con comida y agua *ad libitum*. A la edad de 3 a 4 semanas, los ratones de la misma camada se los separó de los progenitores, se enumeraron mediante perforaciones en las orejas obteniéndose una biopsia que será utilizada para su genotipado.

El mantenimiento de los animales, los apareos y el sacrificio de las crías fueron realizados bajo las normas internacionales y protocolos aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (Protocolo N° 2020-06-NE)

Cepas y líneas transgénicas de ratones usadas en la tesis

- Ratones de la línea transgénica Thy1-eGFP M3, generados en *background* C57Bl/6N, los cuales posteriormente se cruzaron con la línea transgénica CircTulp4-KO y compañeros de camada *wild type*, para estudio de la morfología dendrítica.
- Ratones de la línea transgénica CircTulp4-KO y compañeros de camada *wild type*, generados en *background* C57Bl/6N, para estudio comportamental.

Genotipado de los ratones CircTulp4-KO

Se obtuvo el ADN genómico a partir de una biopsia de la oreja del ratón, tomada a la edad de 3 a 4 semanas, por lisis alcalina del tejido. A las muestras de aproximadamente 1-2 mm de longitud, se le añadieron 100 µl de NaOH 50 mM y se calentaron a 95 °C durante 30 minutos hasta que el tejido se lisó. Después de este procedimiento, las muestras se incubaron en hielo y se neutralizaron mediante el agregado de 30 µl de Tris-HCl 1 M (pH 7,5, conteniendo EDTA 4 mM). Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta el momento en que se utilizaron como molde para la realización de una PCR. Con el fin de conocer el genotipo de cada animal, se utilizó 1 µl de la preparación de ADN genómico en una reacción de PCR de 25 µl, la cual contenía 2,5 µl de *buffer* PCR 10x (PB-L), 1,5 µl de MgCl₂ 25 mM (PB-L), 0,5 µl de dNTPs (10 mM cada uno, ThermoFisher), 0,5 µl de cada primer (CircTulp4 Fw y CircTulp4 Rv) y 0,25 µl de Taq ADN polimerasa (5 unidades (U) / µl, PB-L). Se llevó a cabo un programa estándar de PCR: 95 °C 5 minutos, 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 58 °C durante

30 segundos, 72 °C durante 1 minuto, seguido de 72 °C durante 10 minutos y luego se mantuvo a 8 °C. Los productos de PCR obtenidos fueron digeridos con la enzima de restricción Ddel (NEB). El fundamento de este procedimiento es que únicamente en el caso que esté presente la mutación que elimina el sitio de *backsplicing*, se genera un sitio de restricción para la enzima Ddel permitiendo, de esta forma, diferenciar los animales *wild type* y de los transgénicos. Los productos de la digestión se mezclaron posteriormente con *buffer* de carga Orange G 6X y fueron corridos por electroforesis en geles de agarosa 2%. Los geles fueron preparados con *buffer* TAE 1X y Gel Red (Biotium) (1 µl / 50 ml solución) para posterior visualización de las bandas al UV, y el *buffer* de corrida utilizado fue TAE 1X. Se presenta un ejemplo del genotipado de animales *wild type* y transgénicos en la Figura 4B de Introducción. Para visualizar y fotografiar las bandas se utilizó el Gel Doc G:Box XT4 (SYNGENE).

Genotipado de los ratones Thy1-eGFP

El proceso de extracción de ADN genómico hasta el momento de la preparación de las muestras para realizar la PCR, fueron similares a los pasos mencionados anteriormente para el genotipado de los ratones *CircTulp4*. En este caso, con el fin de dilucidar el genotipo de cada animal, se utilizó 1 µl de la preparación de ADN genómico en una reacción de PCR de 25 µl, la cual contenía 2,5 µl de *buffer* PCR 10x (PB-L), 1,5 µl de MgCl₂ 25 mM (PB-L), 0,5 µl de dNTPs (10 mM cada uno, ThermoFisher), 0,25 µl de cada primer (Thy1 F1 y EGFP R2) y 0,5 µl de Taq ADN polimerasa (5 unidades (U) / µl, PB-L). Se llevó a cabo un programa estándar de PCR: 95 °C 5 minutos, 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 58 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 1 minuto, seguido de 72 °C durante 10 minutos y luego se mantuvo a 8 °C. Los productos de PCR obtenidos se mezclaron posteriormente con *buffer* de carga Orange G 6X y fueron corridos por electroforesis en geles de agarosa 2%. Los geles fueron preparados con *buffer* TAE 1X y Gel Red (Biotium) (1 µl / 50 ml solución) para posterior visualización de las bandas al UV, y el *buffer* de corrida utilizado fue TAE 1X. Para visualizar y fotografiar las bandas, se utilizó el Gel Doc G:Box XT4 (SYNGENE).

Regenotipado

Con el fin de asegurarse que el genotipo de los ratones es el correcto, se tomó una muestra de la cola y se repitió el protocolo llevado a cabo en la sección anterior “*Genotipado de los ratones CircTulp4-KO*” al finalizar la totalidad de los experimentos comportamentales. Posteriormente se verificó que el genotipo determinado en el genotipado inicial coincida con este último realizado.

Cruza de los ratones de la línea transgénica CircTulp4 y Thy1-eGFP

Se cruzaron los ratones de la línea transgénica CircTulp4-KO con la línea Thy1-eGFP para marcar genéticamente y evidenciar la morfología de una población dispersa de neuronas a través de la expresión de la proteína eGFP (Figura 5). Para conocer el genotipo de los ratones que resultan de dicha cruce, se realizó el genotipado siguiendo los protocolos mencionados anteriormente.

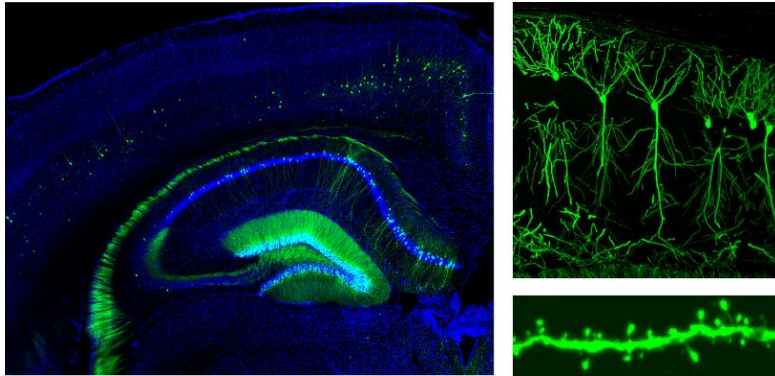


Figura 5. Setup experimental de los ratones Thy1-eGFP x circTulp4. Se observan imágenes, reveladas a través de microscopia confocal, pertenecientes a la cruce de la línea de ratones Thy1-eGFP y circTulp4-KO, la cual expresa la proteína eGFP en un subconjunto de neuronas incluyendo neuronas piramidales del hipocampo, células granulares del giro dentado, la arborización dendrítica de las neuronas piramidales, las dendritas y sus espinas.

3. Experimentos morfológicos neuronales

Preparación de los cortes de cerebro para análisis.

Los animales de 10 semanas de edad que resultaron ser portadores del gen *thy1* y además *knockout* o *wild type* para circTulp4, fueron anestesiados con isoflurano (Piramal Critical Care) y perfundidos transcárdialmente con una bomba peristáltica durante 1 minuto con PBS 1X, 5 minutos con 4% PFA (p/v) en PBS 1X, pH 7,4. Los cerebros fueron extraídos, y se fijaron posteriormente durante 24 horas en 4% PFA (p/v) en PBS 1X. Los cerebros fueron lavados con PBS 1X y posteriormente fueron integrados en una solución tibia de 4% (p/v) agarosa (Invitrogen) en PBS 1X con el fin de realizar cortes transversales en la zona del hipocampo de 150 μm de espesor con un vibrátomo (VT1000 S, Leica). Luego de su corte, las secciones se almacenaron a -20°C en solución de crioconservación (20% (v/v) de glicerol, 30% (v/v) etilenglicol en PBS 1X) hasta el momento de llevarlo al microscopio confocal (Zeiss LSM 710) y adquirir las imágenes mediante el escaneo laser con fotomultiplicadores.

Adquisición y análisis de imágenes

En el presente trabajo se llevó a cabo el análisis morfológico de las neuronas piramidales del CA1 del hipocampo, más específicamente la longitud dendrítica total y su complejidad, como así también la densidad de espinas dendríticas y su morfología. Para esto, se tomaron las imágenes de los cortes de cerebro de ratones Thy1-eGFP x circTulp4-KO utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 710. Dichas imágenes se procesaron en un software llamado Neurolucida 360 (MBF Bioscience), cuya principal y valiosa herramienta es la reconstrucción en tres dimensiones de las neuronas, la cual permite obtener reconstrucciones con precisión del árbol dendrítico como así también de las espinas dendríticas. A continuación se describirá con mayor detalle el procesamiento de cada componente neuronal.

Arborización dendrítica

Con el fin de estudiar la arborización dendrítica de estas neuronas piramidales, se obtuvieron las imágenes correspondientes mediante el uso de un microscopio confocal Zeiss LSM 710. Como primer paso, se realizó un rastreo de las neuronas sobre los cortes de cerebro con la finalidad de seleccionar neuronas que presenten una morfología sana y niveles adecuados de fluorescencia. Para tal fin, se utilizó el objetivo Plan-Apochromat 20x/0.8 M27 y con el mismo objetivo se fotografiaron las neuronas. Las imágenes tomadas en este análisis fueron adquiridas usando *z-steps* de 0,500 μm de forma tal que el espesor de la neurona esté abarcado en el eje Z de la imagen.

Posteriormente, estas imágenes fueron importadas al Neurolucida 360 donde se seleccionaron las neuronas que se encontraban completas, para luego realizar manualmente la reconstrucción tridimensional del soma y la arborización. El volumen del soma, la complejidad y longitud dendrítica total fueron los parámetros a estudiar de las neuronas. Esta información se extrajo mediante la extensión del *software* llamada Neurolucida 360 Explorer (MBF Bioscience). Los datos de la complejidad del árbol dendrítico se obtienen de una forma indirecta mediante el análisis de Sholl (Figura 6) el cual consiste en una serie de círculos concéntricos que parten desde el soma, con una distancia constante entre ellos, llamando a esta medida "distancia del soma". En base a esto, se obtiene el número de intersecciones entre las dendritas y los círculos concéntricos. Este parámetro refleja la complejidad del árbol dendrítico de la neurona, cuanto mayor número de intersecciones presente una neurona, mayor será la complejidad.

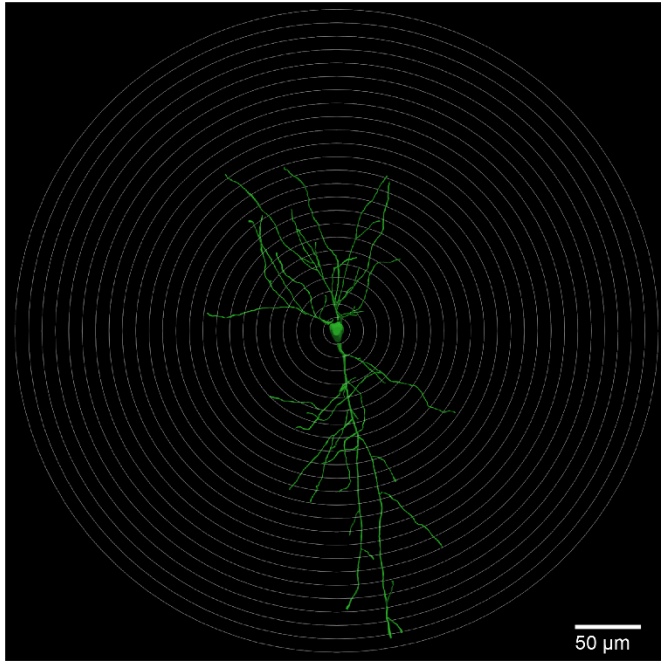


Figura 6. Análisis de Sholl: estudio cuantitativo de la complejidad del árbol dendrítico. Mediante el análisis de Sholl, es posible obtener información de la complejidad de la arborización dendrítica de la neurona. Este análisis está compuesto por círculos concéntricos que parten desde el centro del soma, con una distancia constante entre cada círculo, en este caso de 10 μm . En este tipo de análisis se obtiene información de lo que se conoce como número de intersecciones. Este parámetro consiste en cuantificar el número de dendritas que cruzan cada círculo concéntrico, siendo la representación de la distancia al soma. Por lo tanto, este estudio da la información de que cuanto mayor es el número de intersecciones, mayor complejidad presenta la arborización de la neurona en estudio. Esta imagen representativa pertenece a la reconstrucción tridimensional de una neurona piramidal de un ratón Thy1-eGFP circTulp4-KO, obtenida a través de la extensión NeuroLucida 360 Explorer del *software* NeuroLucida 360 (MBF Bioscience).

Espinas dendríticas

Para realizar el estudio de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales se tomaron imágenes utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 710. Primeramente, se realizó una exploración de las neuronas sobre los cortes de cerebro con el fin de seleccionar neuronas que contaran con una morfología sana, con altos niveles de fluorescencia y con las dendritas suficientemente separadas unas de otras con el fin de poder fotografiarlas individualmente. Esta exploración se realizó utilizando un objetivo de inmersión en aceite Plan-Apochromat 40x/1.4 Oil DIC M27 y con el mismo objetivo se fotografiaron las dendritas individuales realizando además un zoom digital. Todas las imágenes correspondientes al análisis de las espinas dendríticas fueron adquiridas usando *z-steps* de 0,100 μm de forma tal que todo el espesor de la dendrita se encuentre contenido en el Z de la imagen.

Para el análisis de las espinas dendríticas, las imágenes fueron individualmente atravesadas por un proceso de deconvolución, el cual consiste en un conjunto de métodos que están diseñados para mejorar la nitidez de las imágenes eliminando la difuminación (del inglés "*blurring*") inducida por la apertura limitada del objetivo. Esto es especialmente importante en el eje z, dado que, al tener menor resolución, contiene un mayor grado de señal de fluorescencia por fuera del punto de foco. Este proceso se realizó mediante el *software* ImageJ, con el *plugin* "Iterative Deconvolve 3D". Para lograr esto, como primer paso, se generó una imagen de la función de dispersión de punto (PSF) teórica mediante otro *plugin* llamado "Diffraction PSF 3D". En dicho procesamiento se toman en cuenta las condiciones en

que las fotos fueron tomadas (índice de refracción del medio de inmersión, apertura numérica del objetivo, longitud de onda utilizada, tamaño de pixel, *z-step* y tamaño de la imagen). Una vez obtenida la PSF, se realizó la deconvolución de cada foto, con un número máximo de 10 iteraciones. Una vez obtenidas las fotos deconvolucionadas, se las importó al *software* Neurolucida 360, donde se realizó la reconstrucción tridimensional de las dendritas y sus espinas. Este procedimiento fue realizado mediante una herramienta automática del *software* el cual detecta las protrusiones según los siguientes parámetros: *outer range*: 2,5 μm ; *minimum height*: 0,3 μm ; *detector sensitivity*: 110%; *minimum count*: 10 voxels. En este caso, los valores de dichos parámetros fueron los correspondientes a neuronas piramidales del CA1 del hipocampo (Dickstein *et al.*, 2016). La cuantificación de la densidad y los aspectos morfológicos de las espinas dendríticas se extrajeron mediante el Neurolucida 360 Explorer (MBF Bioscience). Esta herramienta devuelve la longitud de las dendritas, el número de espinas presentes, su volumen (voxel y μm^3) y la clasificación morfológica de las mismas según los parámetros establecidos de forma automática correspondiente al tipo de neurona. Esta información se extrajo en una planilla de Excel donde se calculó la densidad de las espinas dendríticas, expresada como el número de espinas dendríticas sobre 10 μm de longitud de dendrita.

4. Experimentos comportamentales

Todos los experimentos comportamentales fueron llevados a cabo en ratones adultos macho de entre 10 y 20 semanas de edad que fueron habituados a las condiciones del cuarto de evaluación. En función de minimizar posibles efectos de arrastre de las diferentes pruebas comportamentales, la secuencia de los mismos fue dispuesta del menos al más estresante. En la German Mouse Clinic (GMC, Múnich, Alemania) se realizó una serie de pruebas neurológicas y nociceptivas en un *batch* de ratones machos y hembras de la línea circTulp4-KO. En estos experimentos se observó que los ratones hembras *knockout* para circTulp4 presentaban un mayor peso corporal que el grupo *wild type*. Debido a esto, para este trabajo se decidió realizar los experimentos comportamentales en animales macho ya que la diferencia en el peso corporal de las hembras podría influenciar la locomoción y exploración. Si esto sucediera, impediría discernir si dichas diferencias corresponden a la falta del circTulp4 o a sus diferencias corporales.

Open Field en baja luminosidad

Los ratones de 10 semanas de edad fueron dispuestos en cajas sin tapa de 50 x 50 x 50 cm, durante 20 minutos, con un rango de iluminación de 13-15 lx. Se grabó mediante cámaras web (Logitech BRIO) conectadas a notebooks y se cuantificó mediante el software ezTrack (Pennington *et al.*, 2019) la distancia total recorrida, distancia recorrida en fragmentos de 5 minutos y el tiempo que los ratones estuvieron en el área central de 25 x 25 cm.

En esta prueba se permite al animal explorar el ambiente, y de este modo caracterizar la actividad locomotora en un ambiente novedoso. Además, se cuantificará el tiempo que pasa el ratón en el centro de la arena experimental. Este parámetro se tuvo en cuenta debido a que los ratones naturalmente presentan una tendencia a permanecer en el área periférica (tigmotaxis), en donde el animal se encuentra menos expuesto (Simon *et al.*, 1994). Por lo tanto, se espera que en el área central los ratones menos ansiosos pasen más tiempo. El experimento se llevó a cabo en horario diurno, en la fase de menor actividad de los ratones.

Dark-light Box

Este experimento comportamental fue llevado a cabo bajo dos condiciones: basal y post-estrés. En condiciones basales, los ratones de 17 semanas de edad se colocaron durante 5 minutos (Mozhui *et al.*, 2010) en el compartimento oscuro de una caja dividida por su luminosidad. Este dispositivo consistía de una caja con un compartimiento grande iluminado (dos tercios; 33,5 x 50 x 50 cm) con un rango de iluminación de 800-1000 lx y sin tapa, y un compartimiento pequeño y oscuro (un tercio; 16,5 x 50 x 50 cm) con tapa. Estos espacios se encontraban separados por una pared plástica con un espacio que conecta ambos lados, de un tamaño suficiente para la entrada y salida del animal, sin que altere la oscuridad. El compartimiento iluminado, además de contar con lámparas de cirugía y una cámara de vídeo (Logitech BRIO), estaba caracterizado por tener paredes y suelo blanco, mientras que en el oscuro, estos componentes eran de color negro. Mediante las filmaciones y el programa informático *Solomon Coder*, se adquirió de forma manual los datos de la latencia, el número de transiciones y el tiempo que el animal estuvo en la zona iluminada. Se define a la latencia como el tiempo que tarda el ratón en ingresar al compartimiento iluminado por primera vez, mientras que el número de transiciones representa la cantidad de veces que el ratón se desplaza de un compartimiento al otro. El fin de esta prueba comportamental es evaluar el comportamiento relacionado a la ansiedad de los ratones, los cuales típicamente tienen preferencia por los ambientes oscuros, como así también estimar la actividad locomotora mediante el número de transiciones. El test fue realizado en horario nocturno, con los animales en un ciclo normal de luz/oscuridad.

Tres semanas después de llevar a cabo este experimento a los ratones de 20 semanas de edad con el objetivo de analizar si la exposición a un estrés agudo modifica la respuesta posterior (Neufeld-Cohen *et al.*, 2010), se les aplicó un protocolo de estrés por restricción de movimiento. Este estrés agudo consistió en la inmovilización de los ratones durante 30 minutos colocándolos dentro de un tubo de polipropileno de 50 ml de volumen con orificios para la entrada de aire, en un contexto de oscuridad. Luego de 24 horas, los ratones realizaron el ensayo de *Dark-light box* descrito previamente.

Marble Burying

En la prueba de entierro de canicas, los ratones de 12 semanas de edad fueron colocados en el mismo tipo de jaulas (18.4 x 29.2 x 12.7 cm) donde se encuentran habitualmente una vez que se los saca del bioterio. Estas jaulas estaban armadas de tal forma que la viruta, compactada manualmente, alcance 5 cm de profundidad. Se colocaron de forma equidistante 18 canicas de vidrio de 1 cm de diámetro y una tapa plástica con orificios para la entrada de aire. Los ratones fueron colocados 30 minutos en estas jaulas, dentro del armario en el que se encuentran regularmente. El parámetro a cuantificar en este experimento fue el número de canicas enterradas (que la canica se encuentre al menos dos tercios cubierta por viruta) (Deacon *et al.*, 2006). El objetivo de este experimento es analizar el comportamiento de tipo ansioso del animal. Naturalmente, los ratones tienden a enterrar objetos que consideran nocivos, y que le generan ansiedad (Deacon *et al.*, 2006). El test fue realizado en horario diurno.

Prueba de Preferencia por la sacarosa

La edad de los ratones a lo largo de la prueba fue de entre 12 y 13 semanas y la duración del experimento fue de 10 días. A partir del momento en que se sacó del bioterio a los ratones, estos fueron dispuestos en jaulas con alimento *ad libitum* y dos botellas con agua. La razón por la cual los ratones disponían de estas dos botellas fue para permitir que se habitúen a la presencia y disponibilidad de agua en ambas, y que a la hora de realizar este experimento se reduzcan los sesgos de elección. En el día 0 del experimento se colocó en cada jaula una botella con agua corriente y otra con una solución de sacarosa 1% m/V. A la mitad de los ratones se les colocó la botella con solución de sacarosa del lado izquierdo, y a la otra mitad del lado derecho, de forma azarosa. Cada botella tenía una marca de color por encima para poder distinguirlas entre sí. Esta disposición fue llevada a cabo para descartar una preferencia por ubicación, que podría enmascarar a la de la solución. Se pesaron las

botellas durante 10 días consecutivos, incluyendo una renovación de las soluciones en el día 4, momento en el que además se procedió con el cambio semanal de jaulas. El peso del agua ingerida por los animales se determina por la diferencia de peso de las botellas entre un día y su consecutivo. La preferencia por la sacarosa se midió a través de un índice que se calcula de la siguiente manera:

$$\% \text{índice de preferencia: } \frac{\text{solución de sacarosa ingerida (ml)}}{\text{solución de sacarosa ingerida (ml)} + \text{agua ingerida (ml)}} \times 100\%$$

En este tipo de experimento se busca analizar el endofenotipo depresivo mediante la anhedonia (Deussing *et al.*, 2006), la cual se define como la incapacidad de experimentar placer (Liu *et al.*, 2018; Klein, 1974; Papp *et al.*, 1991). En este caso, el estímulo placentero es la sacarosa (Papp *et al.*, 1991; Forbes *et al.*, 1996; Willner & Healy, 1994; Willner *et al.*, 1987). A la semana de concluido el experimento, se pesó a todos los animales en una balanza, a pesar de que el índice de preferencia es independiente del peso (Liu *et al.*, 2018).

Prueba de Reconocimiento de objeto novedoso

Los ratones de 19 semanas de edad se sometieron a 3 días consecutivos de habituación a la manipulación y a la arena experimental (dimensiones: 27 x 37 x 15 cm), lo que implicó colocar a cada animal dentro de la arena experimental sin presentación de los objetos 5 minutos por día. Tanto la habituación como el entrenamiento y la evaluación se realizaron en un cuarto libre de ruido ambiental y con baja iluminación correspondiente a las condiciones del *Open Field* en baja luminosidad. El día 4 se realizó la sesión de entrenamiento y evaluación de memoria de corto término. Para el entrenamiento, cada animal se colocó dentro de la arena experimental durante 3 minutos con dos objetos idénticos. Los objetos utilizados fueron dados o imanes plateados con forma de peón de ajedrez. Debido a que las jaulas con los animales compartieron el armario durante el tiempo que duraron los experimentos comportamentales, los objetos se lavaron con agua corriente entre su disposición a los animales para que no haya pistas olfativas en los mismos. La retención de la memoria de corto término se probó a 3 horas del entrenamiento. Durante la sesión de evaluación, los animales se colocaron dentro de la arena experimental y se les permitió explorar los dos objetos diferentes entre sí (un dado y un imán) durante 3 minutos. Uno de los objetos era idéntico a los explorados durante la sesión de entrenamiento (objeto familiar) y el otro era un objeto novedoso. Los objetos se expusieron en los mismos lugares de la arena que en la sesión de entrenamiento. La ubicación del objeto novedoso se intercambió entre la

izquierda y la derecha para los diferentes animales del mismo grupo experimental para evitar la preferencia de lugar durante la sesión de evaluación. En el día 5 del experimento, se realizó el entrenamiento para posteriormente evaluar la retención de la memoria de largo término. En este caso, el entrenamiento consistió de 5 minutos de exploración y los objetos utilizados fueron un tornillo y un imán circular blanco y violeta. Estos objetos diferían notablemente de los dispuestos en la prueba anterior. La retención de la memoria de largo término fue evaluada en el día 6, es decir, 24 horas después del entrenamiento. Cada sesión de evaluación tuvo una duración de 5 minutos y los procedimientos experimentales fueron los mismos que se realizaron en la evaluación de la memoria de corto término. Las sesiones de entrenamiento y evaluación se filmaron con una cámara web (Logitech BRIO) y el comportamiento de exploración se evaluó manualmente a través del software *Solomon Coder*. Durante la evaluación, se determinó el tiempo total de exploración para cada objeto y el tiempo relativo de la exploración del nuevo objeto se calculó mediante un índice de discriminación (%ID) calculado de la siguiente manera:

$$\%ID = \frac{t \text{ novedoso} - t \text{ familiar}}{t \text{ novedoso} + t \text{ familiar}} \times 100\%$$

Siendo “t novedoso” el tiempo que el ratón exploró el objeto novedoso y “t familiar” el tiempo que exploró el objeto conocido.

Se calculó el valor medio del %DI para los diferentes grupos de animales. El tiempo total de exploración para cada grupo fue comparado con el fin de verificar que no hubiera diferencias entre los grupos en este parámetro. Los animales que muestran tiempos de exploración bajos se excluyeron de los experimentos. Otro análisis a tener en cuenta es la verificación de que cada grupo de ratones entrenado con un objeto u otro no presenten diferencias significativas en el tiempo de exploración de los mismos durante el entrenamiento, porque de tener preferencia por algún objeto, los resultados del test podrían estar sesgados por esta diferencia.

La prueba de reconocimiento del objeto novedoso está basado en la tendencia natural de los roedores a explorar más tiempo un estímulo novedoso que uno familiar, en este caso el estímulo es un objeto (Ennaceur & Delacour, 1988; Van Gaalen & Steckler, 2000). Este experimento pone a prueba la memoria de corto término (3 horas post-entrenamiento) y de largo término (24 hs post-entrenamiento) (Antunes & Biala, 2011).

5. Estadística

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el software GraphPad Prism 8. Para el análisis de los resultados, según corresponda para cada experimento, se utilizaron los estadísticos prueba t de *Student*, la Prueba U de Mann-Whitney, *Nested t test* y ANOVA de 2 vías con medidas repetidas (modelo de Efectos Mixtos), seguido según corresponda por el test de comparaciones múltiples Sidak.

RESULTADOS

1. Caracterización morfológica neuronal

Los ratones circTulp4-KO no difieren de los *wild type* en su anatomía cerebral macroscópica. Sin embargo, los resultados previos del laboratorio demuestran que los ratones KO para circTulp4 presentan alteraciones en la neurotransmisión excitatoria. Estas alteraciones se evidenciaron durante la caracterización electrofisiológica mediante una disminución del balance excitación/inhibición y, a nivel sináptico, en una disminución en la frecuencia las corrientes miniatura excitatorias (mEPSPs) (Figura A1). Considerando estos resultados, se decidió explorar el componente post-sináptico de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, además de profundizar la caracterización fenotípica neuronal de los ratones circTulp4-KO.

En este estudio se llevó a cabo un análisis exhaustivo de las espinas y de la arborización dendrítica. Para tal fin se utilizaron ratones genéticamente modificados Thy1-eGFP, que expresan GFP en un subconjunto disperso de neuronas, incluyendo las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo, las células granulares del giro dentado como así también las neuronas piramidales de la corteza (Feng *et al.*, 2000). La expresión de eGFP se encuentra bajo el control de elementos específicos neuronales provenientes del gen *thy1*. El promotor de este gen contiene las secuencias necesarias para su expresión en un subgrupo de neuronas pero carece de las secuencias requeridas para expresarse en células no neuronales. Estos ratones transgénicos fueron cruzados con la línea circTulp4-KO, obteniendo de este modo ratones que expresen la proteína fluorescente y sean *knockout* o *wild type* para circTulp4. Para poder estudiar la morfología neuronal, se realizaron cortes coronales de cerebro y se capturaron las imágenes mediante un microscopio confocal. Dichas imágenes se procesaron en el *software* NeuroLucida 360 (MBF Bioscience) que permitió la reconstrucción tridimensional de las neuronas. Tomando como base esas reconstrucciones, posteriormente se cuantificaron parámetros característicos de la arborización dendrítica como así también de las espinas.

En particular, se realizó una reconstrucción de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo en ambos genotipos (Figura 7A). La complejidad de la arborización dendrítica, estimada como el número de intersecciones de las dendritas en función de la distancia desde el soma, no mostró diferencias entre los grupos (Figura 7B, izquierda). Del mismo modo, la longitud dendrítica total resultó semejante entre genotipos (Figura 7B, derecha). Adicionalmente, se cuantificó el volumen del soma con el fin de establecer una correlación entre este parámetro y las potenciales variaciones observadas en la complejidad de la

arborización y la longitud dendrítica total. Los resultados observados en esta cuantificación indicaron que el volumen del soma de los ratones *circTulp4 knockout* y *wild type* son semejantes (Figura 7C). De forma conjunta, estos resultados permiten concluir que los ratones *circTulp4-KO* no presentan alteraciones en la complejidad del árbol dendrítico, como así tampoco en la longitud total del mismo.

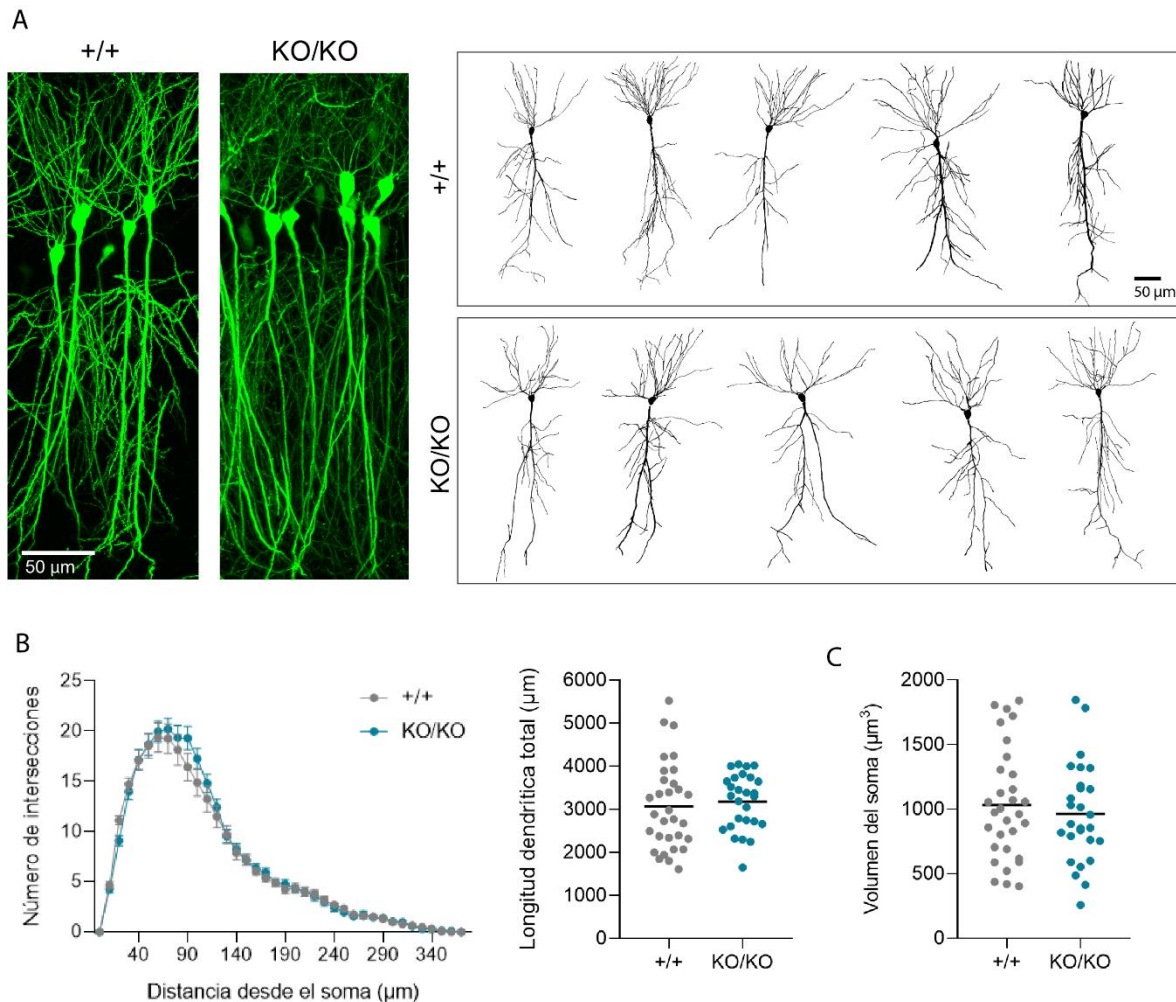


Figura 7. Árbol dendrítico en ratones *circTulp4-KO* permanece sin modificaciones tanto en su complejidad como en la longitud dendrítica. (A) *Stack* de imágenes obtenidas por microscopía confocal (izquierda) y reconstrucciones tridimensionales representativas (derecha) de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de ratones *wild type* (+/+) y *circTulp4-KO* (KO/KO). (B) Análisis de Sholl (izquierda) de las reconstrucciones neuronales en el cual se observa que la complejidad dendrítica, medida mediante el número de intersecciones, es semejante en ambos grupos (media \pm SEM, ANOVA de dos vías con medidas repetidas, $p=0,6744$). La longitud dendrítica total (derecha) no presentó diferencias significativas entre las medias de los grupos. Los puntos del gráfico representan la longitud dendrítica total por cada neurona y la barra horizontal corresponde a la media (prueba de t con la corrección de Welch, $p=0,6254$). (C) El volumen del soma presentó una variabilidad semejante en ambos grupos. Cada punto representa el valor individual de una neurona, mientras que la barra horizontal el valor de la media (prueba de t con la corrección de Welch, $p=0,5333$) (+/+ : n= 31 neuronas, 5 individuos; KO/KO: n= 27 neuronas, 6 individuos).

Posteriormente, se procedió a analizar la morfología de las espinas dendríticas mediante una reconstrucción tridimensional (Figura 8A). Para tal fin, se cuantificó la densidad

de espinas expresada como número de espinas por cada 10 μm . Los ratones *circTulp4-KO* presentaron un incremento en la densidad de espinas con respecto al grupo *wild type* (Figura 8B). Este aumento fue del 17% (IC = 30% - 3%) con una diferencia entre las medias de 3,60 espinas/10 μm . En la Figura 8B derecha, se presenta una visualización global de todos los datos agrupados por genotipo.

El siguiente parámetro a analizar de las neuronas fue la morfología de las espinas dendríticas, más específicamente su volumen. En los ratones *knockout* se observó un aumento del 13% (IC = 22% - 4%) del volumen en comparación con los animales *wild type* (Figura 8C), con una diferencia entre las medias de 0,010 μm^3 . En la Figura 8C derecha, se presenta una visualización global de todos los datos del volumen de espinas agrupados por genotipo. Con el fin de observar si esta diferencia de volumen que presentan ambos genotipos se concentra en algún rango en particular, se expresaron los datos mediante un histograma de frecuencia relativa calculado en porcentaje (Figura 8D). Dicha diferencia puede observarse a lo largo del rango de volumen de las espinas.

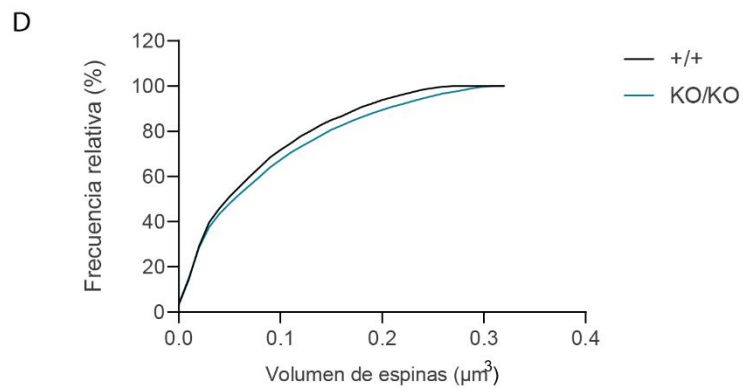
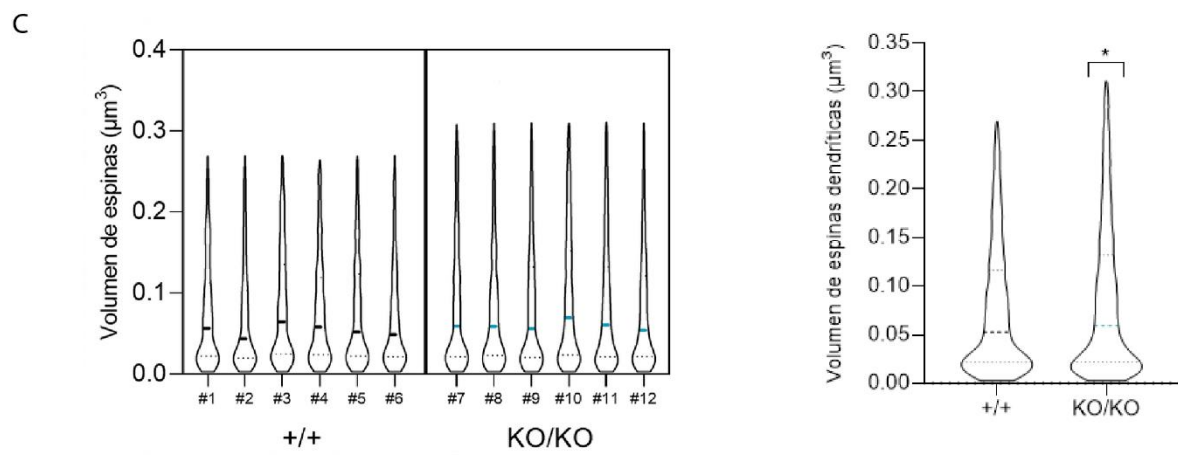
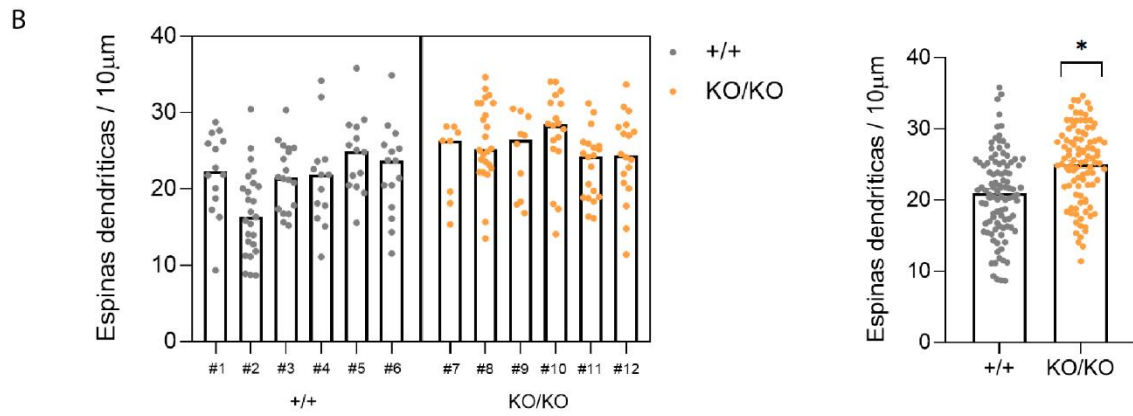
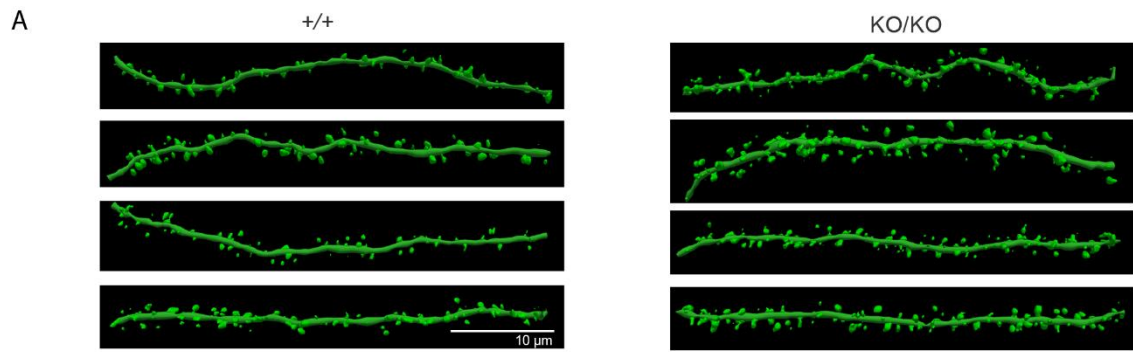


Figura 8. Efectos de la ausencia de circTulp4 en la densidad y morfología de las espinas dendríticas. (A) Imágenes representativas de la reconstrucción tridimensional de dendritas y sus espinas para cada genotipo (izquierda animales *wild type*; derecha *knockout*). **(B)** Al analizar la densidad dendrítica por individuo (izquierda), se observaron diferencias significativas dentro de cada genotipo (*Nested t test*, prueba Chi-cuadrado, $p=0,0014$). Aun así existe diferencia entre genotipos marcado por un aumento del 17% (IC= 30 – 3%) de la densidad de espinas en los ratones *knockout* respecto de los *wildtype* (*Nested t test*, $p=0,0221$). Al comparar la media global entre genotipos (derecha), se observó que en los ratones circTulp4-KO la densidad de espinas dendríticas presenta un aumento significativo (prueba de t con la corrección de Welch, $*p<0,0001$; $n=99$ dendritas en ratones *wild type*; $n=98$ dendritas en ratones *knockout*. 6 animales analizados por genotipo). **(C)** Comparación del volumen de las espinas dendríticas entre individuos (izquierda) donde se observan diferencias significativas entre ellos (*Nested t test*, prueba Chi cuadrado, $p<0,0001$). Al analizarlo entre genotipos, los animales *knockout* presentaron un aumento del 13% (IC= 22 – 4%) del volumen de las espinas con respecto a la media de los *wild type*. (*Nested t test*, $p=0,0099$). Al realizar una comparación global de la mediana (\pm RIQ) entre grupos (derecha), se observó que los ratones circTulp4-KO presentan un incremento en el volumen de las espinas dendríticas (Prueba U Mann Whitney, $p<0,0001$) La distribución de los datos está representada por medio de *violin plots*. **(D)** Histograma de la frecuencia relativa expresada en porcentaje por volumen de espinas. La diferencia entre los genotipos se observó a lo largo del rango de volumen de las espinas (+/+ : $n=6772$ espinas; KO/KO: $n=8460$ espinas; 6 animales analizados por genotipo).

2. Caracterización comportamental

Previamente esta línea de ratones circTulp4-KO fue analizada en parámetros neurológicos tales como la fuerza muscular, sensibilidad auditiva, nocicepción, coordinación motora y equilibrio. Dichas características no se vieron alteradas en los ratones, lo cual permite realizar una exploración de distintas dimensiones del comportamiento. Con anterioridad en el laboratorio, se realizó una batería de pruebas comportamentales que incluyen al laberinto en forma de Y (*Y-maze*), *Open Field* en condiciones de alta luminosidad, laberinto elevado en forma de cruz y al *Acoustic-startle response*. En estos ensayos se observaron alteraciones en los ratones circTulp4-KO en la memoria de corto término, la locomoción y en el comportamiento asociado a la ansiedad respectivamente. En este marco, uno de los objetivos del presente trabajo es extender la caracterización comportamental específicamente guiados por estos resultados previos, y así explorar más extensamente los aspectos de la conducta asociados a la cognición y al aprendizaje, y otros asociados a comportamientos de tipo ansioso y depresión.

Comportamientos relacionados a la ansiedad y depresión

En el resultado previo del *Open Field* en condiciones iluminadas (150-200 lx) se observó un aumento en la actividad locomotora por parte de los ratones *knockout* (KO/KO), reflejada a través de la distancia total recorrida (Figura 9A, izquierda). Para determinar si este aumento está inducido por las condiciones de luminosidad, se decidió realizar una prueba de *Open Field* en condiciones de luminosidad baja (13-15 lx). En este caso, no se observó un aumento de la actividad locomotora en los animales *knockout* (Figura 9B). Una de las interpretaciones es que este fenotipo podría estar reflejando un comportamiento asociado a un

estímulo ansiogénico, que aquí está representado por el estímulo lumínico elevado. Al analizar los primeros 5 minutos de exploración, en las condiciones de alta luminosidad se observó un incremento en la distancia recorrida por parte de los ratones *circTulp4-KO* (datos no mostrados), no así en condiciones de baja iluminación (Figura 9B, derecha). El tiempo que el animal permanece en el centro de la arena experimental tanto en condiciones de alta (Figura 9A, derecha) como de baja luminosidad (Figura 9C), no presenta diferencias significativas entre los animales *wild type (+/+)* y *knockout (KO/KO)*. Este parámetro evalúa el comportamiento de tipo ansioso del animal, por su tendencia natural de desplazarse cerca de los bordes. Además del valor comportamental *per se* que esta prueba aporta, también contribuye a que los próximos experimentos realizados bajo estas condiciones lumínicas no estén sesgados por una posible hiperlocomoción de los animales, perjudicando parámetros fundamentales de cada prueba.

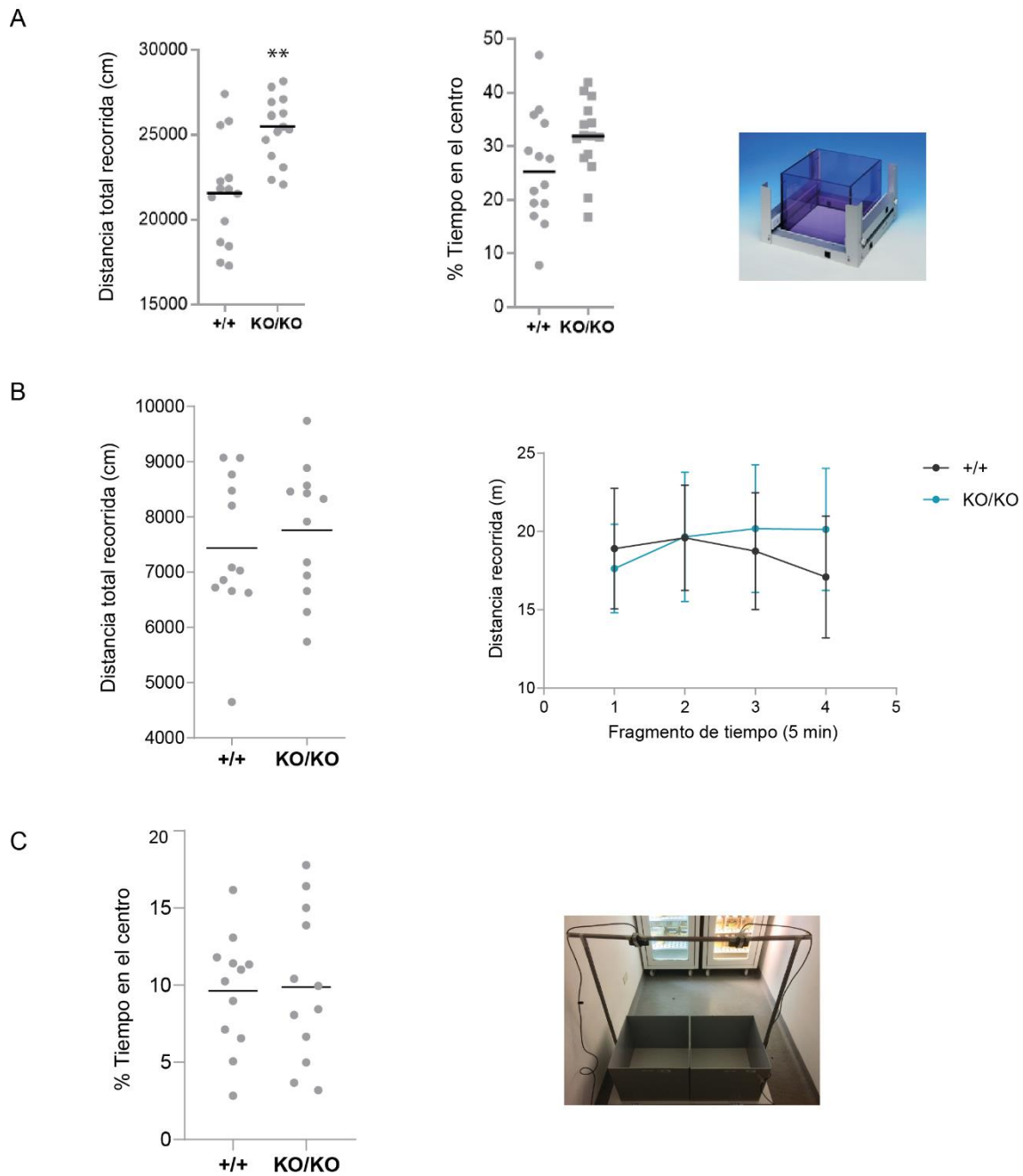


Figura 9. Los animales circTulp4-KO exhibieron un actividad locomotora similar a los *wild type* en una prueba de *Open Field* con baja luminosidad. (A) *Open Field* con alta luminosidad. Experimento llevado a cabo con anterioridad en el laboratorio, donde se observó que los animales KO exhibían una elevada actividad locomotora expresada mediante la medición de la distancia total recorrida dentro de la arena experimental (prueba t de Student, $*p=0,004$). No obstante, no se observaron diferencias significativas entre los grupos de ratones en el tiempo de permanencia en el centro ansiogénico. (B) *Open Field* con baja luminosidad (13-15 lx). Bajo estas condiciones, la distancia total recorrida en la arena experimental (izquierda) no muestra diferencias significativas entre los *wild type* (+/+) y *knockout* (KO/KO). Si se divide la distancia recorrida en fragmentos de 5 minutos (derecha) se observan respuestas semejantes entre ambos grupos de ratones. Estos parámetros denotan que en dichas condiciones, los animales tienen una actividad locomotora normal. (C) El tiempo de permanencia en el centro ansiogénico entre los *wild type* y los *knockout* no presentó diferencias significativas. En todos los casos excepto en (B derecha), los puntos de los gráficos representan los valores individuales de cada ratón, mientras que cada barra representa la media. Se realizó la prueba de t de Student. En el gráfico (B derecha), cada punto representa la media \pm s.e.m obtenida por fragmento y se realizó ANOVA de 2 vías con medidas repetidas. (+/+ : n=12; KO/KO: n=12).

Teniendo como antecedente los resultados obtenidos en el laberinto elevado en forma de cruz, en la prueba de *Acoustic-startle response* y la respuesta aumentada en la locomoción en el *Open Field* con alta luminosidad (estímulo estresante), se llevaron a cabo dos ensayos que evalúan el comportamiento asociado a la ansiedad: la prueba de *Dark-light box* y *Marble Burying*.

Inicialmente se realizó la prueba de *Dark-light box* en condiciones basales, el cual consiste en colocar al animal en el compartimento oscuro y dejarlo que explore durante los 5 minutos que dura la prueba. Se analizaron tres parámetros comportamentales: la latencia, el tiempo que permanece el animal en el compartimento iluminado y el número de transiciones. La latencia es el tiempo que tarda el ratón en pasar por primera vez al compartimento iluminado y típicamente refleja un comportamiento asociado a la ansiedad, basado en la preferencia de los ratones por la oscuridad. En este parámetro los ratones *wild type* (+/+) y *knockout* (KO/KO) no presentaron diferencias significativas (Figura 10A izquierda). El segundo parámetro estudiado corresponde al tiempo que los ratones pasan en el compartimento iluminado, que debido a la alta luminosidad es un contexto aversivo para los ratones. Este resultado fue semejante entre los dos genotipos (Figura 10A derecha). Por último, se analizó el número de transiciones entre compartimentos, el cual refleja la actividad locomotora del animal. Los ratones *knockout* manifestaron un mayor número de transiciones entre compartimentos, lo que manifiesta un comportamiento de tipo ansioso incrementado (Figura 10B). Este último resultado puede asociarse con el aumento de la actividad locomotora observada en condiciones de alta luminosidad.

Algunos fenotipos no se manifiestan en condiciones basales, sino como repuestas diferenciales ante condiciones ambientales o tratamientos específicos. Teniendo en cuenta esto, y considerando la mayor sensibilidad de los ratones KO ante un estímulo estresante (alta luminosidad), se hipotetizó que podrían tener una respuesta diferencial a un estrés agudo. Debido a esto, se decidió realizar un protocolo de estrés agudo por restricción de movimiento previo a una segunda prueba de *Dark-light box* (condición post-estrés). Este protocolo consistió en someter a los ratones a una restricción de movimiento durante 30 minutos en oscuridad, 24 horas antes de realizar nuevamente la prueba. Los resultados en la latencia mostraron que los genotipos no presentaron diferencias entre sí al igual que en la prueba basal, aunque sí se observa un efecto del estrés consistente en ambos genotipos (Figura 10A). El tiempo en el compartimento iluminado fue semejante tanto entre genotipos como entre condiciones. Por otro lado, el número de transiciones no se vio modificada entre los dos grupos de ratones en la condición post-estrés (Figura 10B). Lo interesante de este análisis es que si se compara el grupo *wild type* en condición basal y post protocolo de estrés, se observa que bajo esta última condición los animales *wild type* aumentaron el número de transiciones, diferenciándose de su versión basal, y siendo semejantes a lo observado con los *knockout* en

condiciones basales. Este resultado refuerza la interpretación de que un aumento de la actividad locomotora es el reflejo de una respuesta a un estímulo estresante. Los resultados también sugieren que hay un efecto techo en el número de transiciones que los animales pueden ejercer, y que los *knockout* lo alcanzaron sin necesidad de ser sometidos a dichas condiciones de estrés. Los animales *wild type* al encontrarse bajo cierto nivel de estrés por el protocolo estresante, se comportan como los animales *knockout* en condición basal. Estos últimos ya se encontraban respondiendo al estrés en la prueba basal debido a otros estímulos potencialmente estresantes que no lo eran para los *wild type*. Al realizar una interpretación en conjunto de los resultados obtenidos, se observa que el estrés puede tener como consecuencia un aumento en las transiciones, reflejando un aumento en la actividad locomotora.

Adicionalmente, evaluamos a los animales mediante la prueba de *Marble burying* (Figura 10C), en el cual se basa en que los animales con mayor nivel de ansiedad entierran los objetos desconocidos. Los ratones *circTulp4-KO* y *wild type* enterraron un número similar de canicas. En este caso, no se observó un comportamiento asociado a ansiedad incrementado en los ratones *knockout*.

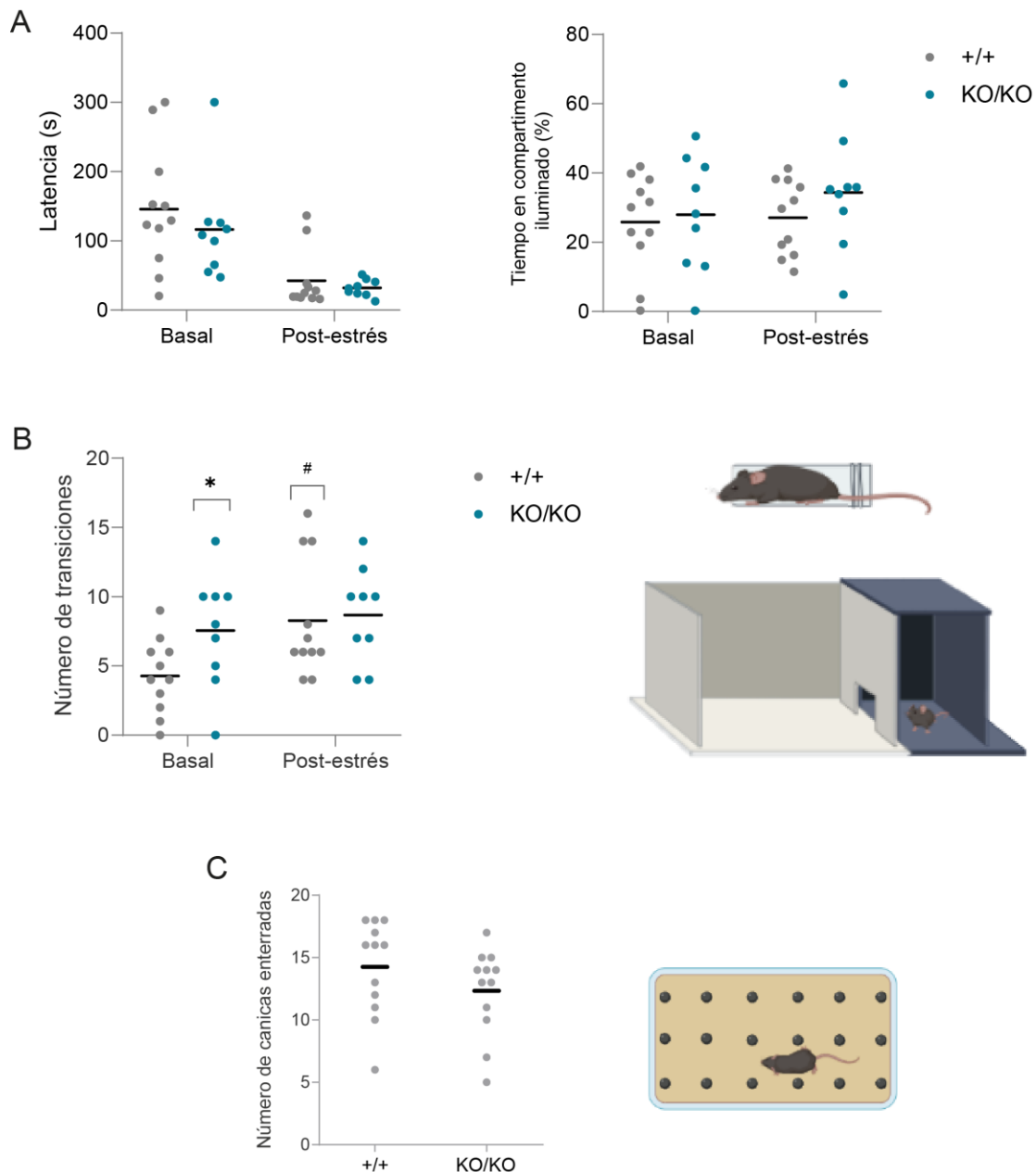


Figura 10. Los ratones circTulp4-KO presentan un aumento en el número de transiciones entre compartimentos, comportamiento asociado a la ansiedad. (A) No se observó alterada la latencia entre los grupos dentro de la condición basal y posterior a protocolo de estrés agudo (post-estrés). No obstante, el efecto del protocolo estresante disminuyó la latencia de los ratones *wild type* y *knockout* por igual (izquierda) (ANOVA de 2 vías, $p < 0,0001$). El porcentaje de tiempo que los animales permanecieron en el compartimento iluminado es semejante entre los genotipos y condiciones (derecha). **(B)** Se observó un aumento en el número de transiciones entre compartimentos en condición basal por parte de los ratones circTulp4-KO, no así luego del protocolo de estrés agudo. Sin embargo, los animales *wild type* muestran una diferencia significativa al desempeño observado en condiciones basales. En cada gráfico, los puntos representan el valor de cada individuo y las barras, la media. Se realizó la prueba de U Mann-Whitney, $*p < 0,05$. Se realizó ANOVA de 2 vías, con el post-test de comparaciones múltiples de Sidak, $\#p < 0,05$, # diferencias significativas del efecto del protocolo por estrés (+/+ : $n = 11$, KO/KO : $n = 9$). **(C)** El número de canicas enterradas por cada grupo de animales es semejante en la prueba de *Marble burying*. Cada punto en el gráfico representa el valor individual de cada ratón, mientras que la barra representa la media. Se realizó la prueba t de Student, $p = 0,2147$. (+/+ : $n = 12$; KO/KO : $n = 12$).

Para explorar el comportamiento relacionado a la depresión en los ratones, se evaluó el endofenotipo de anhedonia, que está definida como la incapacidad de experimentar placer

(Liu *et al.*, 2018; Klein, 1974; Papp *et al.*, 1991), se llevó a cabo una evaluación de la misma por medio de la prueba de preferencia por la sacarosa, que en este caso es el estímulo placentero. La forma de administrarla en esta prueba fue con el uso de una solución de sacarosa al 1%, y se midió mediante el índice de preferencia. Se observó una marcada tendencia en aumento de la preferencia por la sacarosa por parte de los ratones *circTulp4-KO*, evidenciada con mayor solidez en los últimos cuatro días del experimento (Figura 11A). Cabe destacar que en el día cinco se observa un decrecimiento en el índice de ambos grupos de ratones y que corresponde a la renovación de las soluciones y botellas realizada el día anterior, a la que los animales tuvieron que habituarse nuevamente. Teniendo presente esta tendencia observada en la Figura 11A, se realizó un análisis comparativo del índice de preferencia total de cada genotipo, pareando los datos de cada día (Figura 11B). En esta comparación, se observa que los ratones *knockout* presentan una mayor preferencia por la solución azucarada que los *wild type*, sobre todo en los últimos cuatro días, tal como se observa en el gráfico anterior. A pesar de que el índice de preferencia se independiza del peso de los animales (Liu *et al.*, 2018) y de la ingesta total de cada ratón, se pesaron los animales y no se observaron diferencias significativas entre los grupos (datos no mostrados), como así tampoco hubo diferencias en la ingesta total de líquido (Figura 11C). Notablemente, los resultados de esta prueba muestran que los ratones *knockout* no presentan características de la anhedonia, endofenotipo depresivo, sino que sugieren una alteración en el comportamiento asociado a la recompensa, observado por esta tendencia incremental de preferencia por la sacarosa.

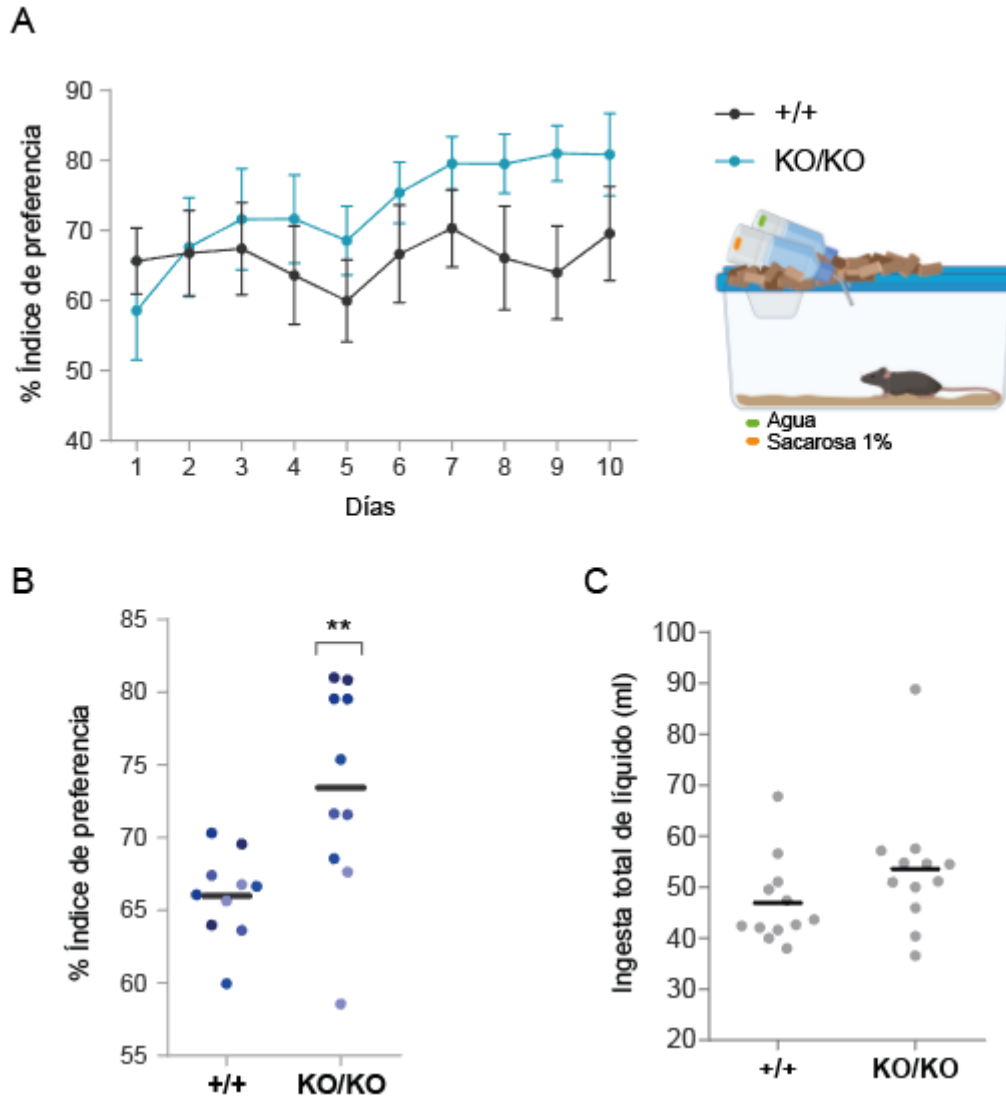


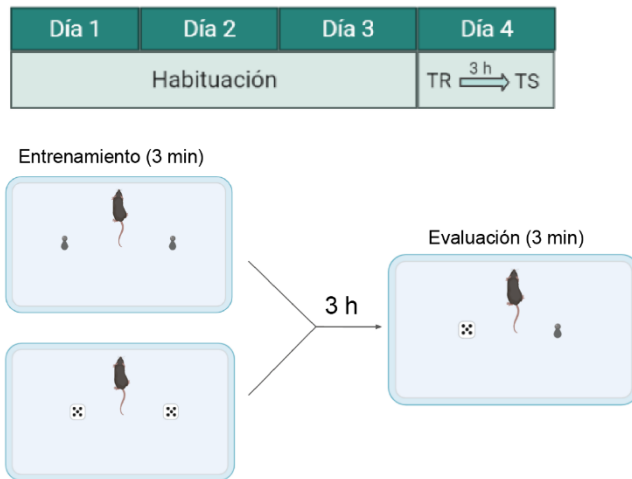
Figura 11. Alteración en el comportamiento relacionado a la recompensa en los ratones circTulp4-KO. (A) Se cuantificó el índice de preferencia por la sacarosa ($\frac{\text{solución de sacarosa ingerida (ml)}}{\text{solución de sacarosa ingerida (ml)} + \text{agua ingerida (ml)}} \times 100\%$) a lo largo de diez días. En este tipo de análisis, se observa que la preferencia por la sacarosa no difiere significativamente entre ambos grupos de ratones. Sin embargo, a partir del día 7 se observa una tendencia de mayor preferencia por parte de los ratones KO. Cada punto representa la media \pm SEM del índice de cada genotipo por día. Se realizó un ANOVA de dos vías con medidas repetidas. **(B)** Índice de preferencia por la sacarosa a lo largo de diez días. Los ratones circTulp4-KO muestran una preferencia por la sacarosa total. Cada punto representa la media del índice de preferencia por día en la línea de tiempo del experimento (escala de colores del más claro al más oscuro conforme avanzan los días, ej: punto más claro día 1, punto más oscuro día 10). Se realizó la prueba de t pareada, $**p=0,0071$. **(C)** Cantidad total de líquido ingerido (solución de sacarosa + agua) por los ratones a lo largo de los 10 días del experimento. La ingesta total de líquido de cada animal no presenta diferencias entre los *wild type* y KO. Cada punto representa el volumen de líquido total ingerido de un individuo. Se realizó la prueba de t de Student. (+/+ : n=12; KO/KO: n=12).

Memoria de corto y largo término

Al tener como antecedente los resultados previos del laberinto en forma de Y (*Y-maze*) en el cual se observaron alteraciones en la memoria de corto término en los ratones *circTulp4-KO*, se decidió evaluar este mismo aspecto cognitivo mediante la prueba de Reconocimiento del Objeto Novedoso (NOR, por sus siglas en inglés) a corto y largo término. Este ensayo consiste en que el ratón en una primera fase de entrenamiento explore dos objetos iguales entre sí, y que al momento de poner a prueba la memoria en la fase de evaluación uno de estos objetos es cambiado por uno desconocido para el animal (Figura 12A). Si el animal recuerda el primer objeto, pasará más tiempo explorando el novedoso y si no lo recuerda, explorará los dos objetos por igual ya que ambos serían considerados como novedosos. Esta prueba se realizó a corto término, donde entre el entrenamiento y la evaluación transcurrieron 3 horas, mientras que en el de largo término el tiempo fue de 24 horas. La forma de medir la memoria fue a través del índice de discriminación que se calcula como la diferencia de tiempo que el animal explora el objeto novedoso y el familiar sobre el tiempo total. En el caso del experimento de corto término, se observa que el índice de discriminación entre el *grupo wild type* y *knockout* es semejante (Figura 12B). Con lo cual se puede concluir que los ratones *circTulp4-KO* no manifestaron alteraciones en la memoria de corto término.

Por otra parte, al momento de analizar los datos obtenidos en la prueba a 24 horas, se observó que en la fase de entrenamiento había una marcada preferencia de los ratones por uno de los objetos en particular. Este suceso impide que sea confiable el índice de discriminación mediante el cual se evalúa esta memoria, ya que de por sí uno de los objetos fue explorado diferencialmente por los ratones. Debido a esto, a los resultados obtenidos en la prueba de largo término se los excluyó del análisis ya que se encontraban sesgados por esta marcada preferencia por uno de los objetos.

A



B

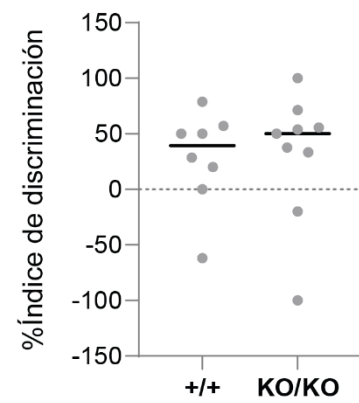


Figura 12. La memoria de corto término permaneció inalterada en los ratones circTulp4-KO. (A) Protocolo correspondiente a la prueba de NOR evaluado a corto término. Del día 1 al 3, se llevó a cabo la habituación al contexto y a la manipulación del experimentador. El entrenamiento (TR) a los objetos y la evaluación (TS) a las 3 horas posteriores, se implementaron en el día 4. **(B)** Los ratones circTulp4-KO presentaron un índice de discriminación $\left(\frac{t_{\text{novedoso}} - t_{\text{familiar}}}{t_{\text{novedoso}} + t_{\text{familiar}}} \times 100\%\right)$ semejante a los *wild type*. En el gráfico, cada punto representa el valor individual, y las barras corresponden a la mediana. Se realizó la prueba de U Mann-Whitney. (+/+ : n=8; KO/KO : n=9).

DISCUSIÓN

El principal objetivo de este trabajo es caracterizar los efectos de la pérdida de función de circTulp4 en un modelo *in vivo*. Debido al déficit en la neurotransmisión excitatoria observada en el hipocampo de ratones circTulp4-KO, la hipótesis que guió el diseño experimental se basó en que este fenómeno podría estar asociado a una variación en la densidad de las espinas dendríticas como así también a alteraciones morfológicas del árbol dendrítico de las neuronas piramidales. Como consecuencia de esto, también esperábamos que las alteraciones en la neurotransmisión tuvieran un correlato a nivel del comportamiento.

Sobre la caracterización morfológica:

Con el fin de explorar qué efectos trae en la neurotransmisión la pérdida de función de este ARN circular, previamente en el laboratorio se realizaron experimentos electrofisiológicos con distintos abordajes experimentales. En los ratones circTulp4-KO los resultados han demostrado que estos presentan un déficit en la neurotransmisión excitatoria, reflejada en la disminución del balance excitación/inhibición y en la frecuencia de las corrientes miniatura excitatorias (mEPSCs), sin afectar las inhibitorias (mIPSCs). En los ratones *knockout* además se observaron alteraciones pre-sinápticas a través de la inhibición de pulsos pareados. (Figura A1). Estos registros fueron medidos en las sinapsis hipocámpales entre las colaterales de Schaffer y neuronas de la región CA1. Una reducción en la frecuencia de mEPSC puede ser interpretada tanto como una baja en la probabilidad de liberación de vesículas pre-sinápticas (Murthy et al., 2001) como una reducción en el número de sinapsis funcionales (Malenka & Nicoll, 1997). Esto nos motivó a explorar el componente postsináptico de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo *in vivo*. Nuestra hipótesis inicial en el presente trabajo proponía que este fenómeno podría estar asociado a una variación en la morfología neuronal. En particular, suponíamos que una disminución en la densidad y/o volumen de las espinas dendríticas -correlacionada con una disminución en el número de sinapsis- explicaría el fenotipo electrofisiológico. Sin embargo, observamos un aumento del 17% (IC = 30 - 3%) en la densidad de espinas y del 13% (IC = 22 - 4%) en su volumen (Figura 8). Cabe mencionar que el moderado incremento de estos parámetros está medido por el amplio rango del intervalo de confianza (IC).

Las espinas dendríticas son los principales *loci* de las sinapsis excitatorias en el sistema nervioso central y están asociadas con la plasticidad neuronal (Harris & Kater, 1994). Por otro lado, teniendo en consideración que el volumen de las espinas es proporcional al área de PSD, al número de receptores sinápticos de AMPA (AMPA-Rs), a la amplitud de las

corrientes mediadas por AMPARs y el área presináptica de la neurona presináptica, el volumen como aspecto morfométrico de la espina se encuentra estrechamente asociado con la función sináptica. El *input* excitatorio total que una neurona puede recibir es dependiente, además de la densidad y el tamaño de las espinas, de la complejidad de la arborización dendrítica. Como correlato a lo observado en las espinas dendríticas, tanto la complejidad de la arborización como la longitud dendrítica total fueron similares en los ratones *wild type* y *circTulp4-KO* (Figura 7).

En forma paralela a la caracterización electrofisiológica de los ratones *circTulp4-KO*, se realizaron experimentos regulando negativamente a *circTulp4* mediante la utilización de shARNs. A diferencia del ratón KO, en donde la pérdida de función es crónica y generalizada, los experimentos realizados en cultivos primarios de neuronas fueron agudos, y los que se realizaron mediante electroporación *in utero* afectaron a un número reducido de neuronas. En cultivo primario de neuronas se reguló negativamente la expresión de *circTulp4* utilizando el sh-*circTulp4* en neuronas post-sinápticas y se observó una reducción en la frecuencia de mEPSPs (Figura A2). De modo similar, en los experimentos en los cuales las neuronas hipocámpales de la CA1 fueron transfectadas con sh-*circTulp4* vía electroporación *in utero* (IUE), la frecuencia de mEPSPs también estaba reducida (Figura A3), demostrando que este efecto es intrínseco celular (*cell intrinsic*). En conjunto estos resultados demuestran un efecto consistente de la pérdida de función de *circTulp4* en la disminución de la frecuencia de mEPSPs: se observa con distintas metodologías, en forma aguda o crónica, y es un efecto intrínseco celular.

El incremento en la densidad de espinas dendríticas ha sido descrito como rasgo característico en modelos patológicos como en el trastorno del espectro autista (ASD) y el síndrome de frágil X (Hutsler & Zhang, 2010; Nishiyama, 2019; Irwin *et al.*, 2001). Sin embargo, consideramos que –a diferencia de los efectos en la neurotransmisión–, los efectos de la pérdida de función de *circTulp4* en los ratones KO sobre la densidad y el volumen de las espinas obedecen a un fenómeno compensatorio, y no a un efecto primario. Hemos observado que, en los experimentos estructurales realizados previamente en condiciones de regulación negativa aguda en cultivo primario (Figura A2) y mediante transfección via electroporación *in utero* (Figura A3), la densidad de espinas no presentó alteraciones por la ausencia de *circTulp4*. Consideramos que esto sustenta la hipótesis de que los cambios observados en la morfología neuronal en los ratones *knockout* se deben a que en estos animales ocurren fenómenos homeostáticos durante el desarrollo que contribuyen a mantener la excitabilidad de todo el circuito (Turrigiano & Nelson, 2004). Los mecanismos de plasticidad homeostática promueven cambios compensatorios en la excitabilidad celular en respuesta a cambios crónicos en la actividad del circuito neuronal. Uno de los fenómenos homeostáticos más estudiados es el sináptico, que para poder restablecer la actividad neuronal a un rango

fisiológico ocurren modulaciones de los receptores, neurotransmisores y morfología (Moulin *et al.*, 2021). Sin embargo, en los ratones *circTulp4-KO* esta compensación mediante el aumento en la densidad de espinas y su volumen, no revierte completamente el efecto en la neurotransmisión.

Ante la posibilidad de que el número de espinas no refleje exactamente el número de sinapsis que hay en esta línea de ratones en particular, planeamos a futuro realizar una cuantificación de la sinapsis propiamente dicha, por medio de inmunofluorescencia con marcadores pre- y postsinápticos. Adicionalmente, otros mecanismos o alteraciones de tipo funcionales, como por ejemplo la presencia de sinapsis silentes, podrían explicar este fenómeno observado. El concepto de sinapsis silente surge de que puede existir esta discordancia entre el número de sinapsis morfológicas identificadas y el número de sinapsis funcionales (Hanse *et al.*, 2013), tal como sucede en el cerebelo adulto, donde alrededor del 95% de las 100.000 sinapsis entre las células granulares y las de Purkinje podrían ser silentes (Dean *et al.*, 2009; Hanse *et al.*, 2013). Este fenómeno está explicado fundamentalmente por un tipo de sinapsis silente mediada por receptores de tipo AMPA (AMPA), las cuales en su mayoría son explicadas por la ausencia de AMPARs funcionales y su expresión en la membrana post-sináptica (Bhattacharyya *et al.*, 2009; Hanse *et al.*, 2013). Con el objetivo de intentar explicar estos resultados de forma más precisa, exploraremos en un futuro si *circTulp4* afecta la proporción de sinapsis silentes.

Respecto de la metodología utilizada, resulta importante mencionar que en el presente trabajo hemos analizado la morfología de las espinas dendríticas mediante parámetros exclusivamente cuantitativos como lo es el volumen y no en la clasificación cualitativa basada en clases morfológicas: *mushroom*, *stubby* y *thin*. Típicamente las espinas han sido analizadas en función de esta clasificación clásica morfológica, probablemente porque la mayoría de los estudios clásicos se basan en el análisis de imágenes 2D en las que el volumen no puede medirse en forma directa. Tal como se discute en Pchitskaya & Bezprozvanny, 2020, el enfoque de la clasificación clásica de las espinas dendríticas en *mushroom*, *stubby* y *thin* tiene serias limitaciones. La transición entre estos tres subtipos de espinas ocurre de forma abrupta en la clasificación, cuando en realidad existe un continuo de formas y tamaños de las mismas (Yuste & Bonhoeffer, 2004; Berry & Nedivi, 2017). En el trabajo de Berry & Nedivi 2017, muestran de forma clara como los avances tecnológicos en la visualización de imágenes *in vivo* permitieron analizar la dinámica morfológica de las espinas dendríticas a través del tiempo, la cual reveló propiedades únicas de plasticidad. Incluso las espinas estables y persistentes se encuentran continuamente cambiando su forma y orientación, lo cual también apoya la existencia de un espectro continuo de formas. Desde un punto de vista técnico, el análisis de la morfología de las espinas también está limitado por el límite de resolución de la microscopía óptica, confocal y de dos fotones. No obstante, el límite estimado para la

microscopía confocal es de $0,2 - 0,3 \mu\text{m}^3$ (Tonnesen *et al.*, 2014) y coincide con el valor máximo del volumen encontrado en nuestro análisis. El límite de resolución de los microscopios típicamente utilizados provoca mediciones inexactas de las formas de las espinas, la cual lleva a una errónea clasificación de las mismas. Por ejemplo, el ancho del cuello de la espina se cree que es un factor clave a la hora de la compartimentalización y la eficiencia en la transducción de la señal (Tonnesen *et al.*, 2014). Sin embargo, la visualización de estructuras tan pequeñas solo puede realizarse en forma precisa mediante *imaging* de superresolución, que provee información más detallada acerca de las formas de las espinas que los métodos estándar de microscopía. Los estudios de superresolución sugieren que las espinas *stubby* están significativamente sobrerrepresentadas en la literatura y que es consecuencia de la baja resolución en el cuello (Tonnesen *et al.*, 2014). Debido a la falta de límites claros entre las diferentes clases de espinas, una misma muestra de cerebro puede arrojar diferente proporción de espinas *mushroom*, *thin* y *stubby*, dependiendo del criterio usado para separar entre sí estas clases. Esto significa que los análisis a menudo suelen estar sesgados y ser poco reproducibles. Un intento de ajustar la distribución continua de la morfología de las espinas en una categoría rígida y pre-definida puede resultar en potenciales errores, como por ejemplo el caso de las espinas *thin* y *mushroom* que son muy similares en forma y que el parámetro crítico que las distingue es el tamaño de la cabeza. Se ha propuesto que la dependencia en parámetros objetivos y definidos en vez de grupos subjetivos basados en la forma de la espina, puede ayudar a resolver algunos de estos problemas (Mancuso *et al.*, 2013). Por ejemplo, en Ruszczycki *et al.*, 2012 se realiza una comparación de la precisión de la clasificación clásica y de las mediciones morfométricas, en la cual se ha demostrado que este último enfoque es más sensible. Debido a este extenso soporte bibliográfico, nos resultó adecuado basar el análisis en el volumen de las espinas como parámetro morfométrico.

Sobre la caracterización comportamental:

En el campo de los ARN circulares es muy poco frecuente la exploración de la conducta debido a la escasez de los modelos de estudio. Sin embargo existen antecedentes de un modelo de ratón KO para el circARN Cdr1as, el transcripto circular más caracterizado y con mayor expresión en el cerebro. Estos ratones han sido estudiados a nivel comportamental, presentando actividad locomotora normal, niveles de ansiedad inalterados, comportamiento social y memoria de reconocimiento normal (Piwecka *et al.*, 2017). Sin embargo, estos ratones *knockout* sí revelaron un fenotipo conductual relacionado con los trastornos neuropsiquiátricos: una disminución sustancial (entre el 30-50%) en la inhibición del pre-pulso en la prueba de *startle response* (respuesta de sobresalto frente a un estímulo aversivo) en comparación con los controles *wild type*. En comparación, el análisis

comportamental de la línea circTulp4-KO es más abarcativo y detallado, ya que realizamos una batería de pruebas que exploran distintos aspectos de la conducta.

El segundo objetivo de este trabajo radicó en extender la exploración de las consecuencias funcionales de la pérdida de función de circTulp4 a nivel comportamental en los ratones de la línea circTulp4-KO. Resultados previos, obtenidos en colaboración con la German Mouse Clinic (GMC, Múnich, Alemania), demostraron que estos ratones no presentaban alteraciones en ningún parámetro neurológico analizado, incluyendo fuerza muscular, sensibilidad auditiva, nocicepción, coordinación motora y equilibrio. Además, se observó que los ratones *knockout* presentaban un fenotipo de actividad locomotora aumentada en condiciones de alta luminosidad (factor estresante) (Figura 9) como así también una respuesta de sobresalto incrementada en el ensayo *Acoustic Startle Response* (Figura A4). En un segundo conjunto de animales analizados previamente en nuestro laboratorio, se observó que los ratones circTulp4-KO pasaban menos tiempo en los brazos abiertos en la prueba de laberinto en cruz elevado al compararlos con los *wild type* (Figura A4).

Los resultados obtenidos en esta tesis en combinación con los resultados previos sugieren que la pérdida de circTulp4 confiere una sensibilidad mayor a estímulos estresantes. Esta interpretación está basada en los siguientes elementos:

1. El aumento en la actividad locomotora no tiene *per se* una interpretación unívoca: podría reflejar un aumento generalizado de la actividad motriz, un incremento en la exploración o una reacción a un estímulo estresante o ansiogénico, que puede provocar conductas de congelamiento (más conocido como *freezing*) o de escape. Una de nuestras interpretaciones -en función de los resultados obtenidos en esta tesis- es que este aumento en la actividad locomotora podría estar reflejando un intento de escape a este estímulo que resulta aversivo. Consideramos que el aumento en la locomoción no refleja un incremento de la actividad exploratoria, porque la locomoción de los ratones circTulp4-KO es similar a los *wild type* cuando se presenta un ambiente novedoso en condiciones de baja iluminación (Figura 9), es decir, cuando se elimina el factor estresante (iluminación alta).

Los ratones *knockout* para el transportador de dopamina (DAT $-/-$), se caracterizan por tener altos niveles extracelulares de dopamina y una hiperlocomoción espontánea. Esta es la característica comportamental más importante de estos ratones la cual no disminuye a lo largo del tiempo y está presente en ambas fases del ciclo luz/oscuridad, en comparación con la habituación locomotora desempeñada por los ratones control (Giros *et al.*, 1996). En dicho estudio, realizaron la prueba de *open field* en condiciones de alta y baja iluminación, y observaron que en ambos contextos se mantiene el fenotipo de hiperlocomoción (Spielewoy *et al.*, 2000). En este caso, pareciera que la hiperlocomoción no está siendo un reflejo de un comportamiento ansiogénico sino que sería una hiperlocomoción más bien primaria. En este

contexto nuestra interpretación se distingue de este modelo porque el fenotipo de los DAT-/- se manifiesta en ambas condiciones (con y sin estímulo aversivo), mientras que en nuestro experimento solamente observamos este aumento en la actividad locomotora en los ratones circTulp4-KO si presentamos un factor estresante como la luz. Por otro lado, en un modelo de ratones *knockout* heterocigotas para la Neuregulina 1, gen vinculado a la esquizofrenia, se observa que en un *open field* en condiciones de baja iluminación estos ratones presentan un fenotipo de hiperlocomoción, pero a su vez manifiestan una leve reducción en el comportamiento asociado a la ansiedad en otra prueba realizada. En suma, estas observaciones demuestran que la hiperlocomoción no necesariamente se encuentra estrechamente relacionada al comportamiento vinculado a la ansiedad, y que deben considerarse elementos adicionales –a veces, obtenidos por otras pruebas comportamentales- para hacer una interpretación adecuada.

2. En la prueba de *acoustic-startle response*, los ratones circTulp4-KO presentaron una respuesta de sobresalto incrementada. Además de evaluar el reclutamiento sensoriomotriz, esta prueba puede utilizarse como herramienta para el estudio de aspectos emocionales debido a que esta respuesta de sobresalto se ve aumentada en estados aversivos y disminuida en estados hedónicos (Marchette *et al.*, 2018). Permite además identificar los niveles de activación o *arousal* de los individuos, una dimensión que se expresa en un rango que va de la excitación a la calma y tiene un impacto en el resto de las emociones, tales como la ansiedad o el miedo.

3. En la prueba de *Dark-light box*, el número de transiciones refleja la actividad locomotora del animal y que si no está acompañado por un incremento en la hiperlocomoción espontánea, es considerado un comportamiento asociado a la ansiedad (Bourin & Hascoët, 2003). Observamos que en la prueba realizada bajo condiciones basales los ratones KO tenían una aumentada actividad locomotora, la cual fue alcanzada por los ratones *wild type* en la prueba en la que previamente habían sido sometidos a un estrés agudo. Este aumento en el número de transiciones en los animales *wild type* sustenta la interpretación de que esta actividad locomotora incrementada podría reflejar un intento de escape frente a un estímulo aversivo, como se observó en *open field*. Bajo esta misma línea de razonamiento, se encuentra la disminución en la latencia luego del protocolo de estrés en ambos genotipos.

La respuesta a eventos estresantes requiere numerosas acciones adaptativas comprometiendo cambios integrales en el sistema nervioso y neuroendocrino. En algunos estudios se propone que la desregulación de los mecanismos de la respuesta a estrés subyace a una variedad de psicopatologías relacionadas con el estrés (De Kloet *et al.*, 2005; McEwen, 2007). En un estudio realizado hace más de una década (Neufeld-Cohen *et al.*,

2010), se utilizó un modelo transgénico de ratón el cual era triple KO para los tres genes de la urocortina, neuropéptido que forma parte de la familia del factor liberador de corticotrofina y está asociado con la respuesta a estrés. En dicho estudio estos ratones KO manifestaron un incremento en el comportamiento de tipo ansioso a las 24 horas posteriores de exposición al estrés, no así en un protocolo de estrés inmediatamente previo a la prueba o en condiciones no estresantes.

Otro de los enfoques que inicialmente decidimos abordar dentro de la caracterización comportamental fue el comportamiento relacionado a la depresión. Evaluamos la anhedonia y, llamativamente, observamos que los ratones circTulp4-KO tenían un aumento en el índice de preferencia por la sacarosa (Figura 11), sugiriendo una alteración en los mecanismos de recompensa. Este resultado nos motiva a explorar en un futuro aquellos núcleos específicos asociados a la recompensa tanto en nivel de expresión de circTulp4 como en otras pruebas comportamentales que sustenten o descarten la hipótesis de una alteración en el comportamiento asociado a la recompensa.

Sobre los modelos in vivo para la caracterización funcional de ARNs circulares:

La mayoría de los estudios dirigidos a explorar la funcionalidad de los circRNAs se basan en la utilización de la ARNs de interferencia dirigidos contra la unión cabeza-cola del ARN circular. Una limitación de estas herramientas al ser usadas *in vivo* es que su efecto en el animal está acotado por la eficiencia de la transfección -o transducción, en caso de usar vectores virales. Si bien pueden otorgar especificidad, pudiendo, por ejemplo, afectar la expresión de un ARN circular en una región particular del cerebro, no dan información sobre el efecto de la pérdida de función global del mismo.

Otro abordaje, como el utilizado en este trabajo, implica la generación de ratones *knockout* para un ARN circular de interés. Sin embargo, dado que la mayoría de los ARNs circulares deriva de secuencias génicas que también codifican proteínas, la generación de *knockout* específicos para la forma circular es técnicamente desafiante. Por lo tanto, este enfoque requiere de una validación cuidadosa para que la expresión del gen *host* no se altere. En nuestro caso, la mutación del sitio aceptor de *splicing* consistió en una alternativa viable porque, debido a las particularidades del *locus* Tulp4, el transcripto lineal mayoritario, aquel que codifica para la proteína Tulp4, no se ve afectado por esa mutación (Figura 4C). Sin embargo, esta estrategia no puede ser generalizada a otros *loci* ya que lo frecuente es que las isoformas lineales y circulares compartan los mismos sitios consenso de *splicing*.

Hasta el momento, sólo se han reportado tres trabajos que utilizan ratones *knockout* para caracterizar la función de ARNs circulares:

1. Cdr1as es el ARN circular más abundante en el sistema nervioso, y debido a que se lo consideraba un transcrito generado a partir de una región no codificante, los ratones *knockout* se generaron mediante la delección de ese *locus*. Los ratones Cdr1as-KO manifiestan una atenuación en la sincronización sensoriomotriz –un déficit en la capacidad de filtrar información no relevante- y alteraciones electrofisiológicas que demuestran una disfunción en la transmisión sináptica (Piwecka *et al.* 2017). Sin embargo, análisis recientes han identificado un ARN lineal que se genera del mismo *locus* que Cdr1as y que presenta sus niveles basales incrementados en el modelo de ratón Cdr1as-KO (Barret *et al.*, 2017). Estos hallazgos originaron el interrogante de si este fenotipo observado en los ratones era debido a la pérdida de Cdr1as o al aumento en la expresión del ARN lineal.

2. Cia-cGAS es un ARN circular altamente expresado en células madre hematopoyéticas (HSCs) que se encuentra codificado en el *locus* D430042O09Rik. Recientemente, se han generado ratones deficientes de cia-cGAS mediante la delección de la secuencia intrónica complementaria de D430042O09Rik, mediante tecnología CRISPR/Cas9. Las secuencias reversas complementarias que se encuentran en los intrones que flanquean los exones de la circularización han demostrado tener un rol crucial en la generación de los circARN. La ausencia de Cia-cGAS en los ratones *knockout* produjo un aumento en la expresión de IFNs de tipo I en la médula ósea y una disminución en el número de HSCs quiescentes (Xia *et al.*, 2018).

3. Un método similar al anterior fue utilizado para generar un ratón deficiente en circKcnt2 sin afectar al mRNA de Kcnt2. CircKcnt2 es inducido en las células linfoides innatas de tipo 3 (ILC3s), importantes reguladoras de la inmunidad, durante la inflamación intestinal. La delección de este circARN causa una activación de las ILC3s del intestino y colitis severa en ratones (Liu *et al.*, 2020).

Una limitación extensamente reportada de los ratones KO constitutivos es que pueden dar lugar a importantes mecanismos homeostáticos que resulten en efectos compensatorios (El-Brolosy & Stainier, 2017), tal como los observados en este trabajo. En consecuencia, muchos fenotipos asociados a la pérdida de función del gen de interés pueden ser inadvertidos o manifestarse atenuados. En el otro extremo, los ratones KO constitutivos no son adecuados para estudiar la función de transcritos cuya deficiencia está asociada a letalidad embrionaria. Consideramos que el diseño de nuevas estrategias para la generación de líneas de ratones

transgénicas inducibles y/o condicionales para estudiar las consecuencias de la pérdida de función de ARNs circulares específicos pueden contribuir a superar las limitaciones mencionadas.

En conclusión, los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permitieron identificar un aumento en el volumen y densidad de espinas, interpretado como un mecanismo compensatorio de los déficits en la neurotransmisión excitatoria, y que la pérdida de circTulp4 conduce, desde el punto de vista comportamental, a un aumento en la sensibilidad ante estímulos estresantes o ansiogénicos.

ANEXO

En esta sección se incluyen resultados que fueron obtenidos en el contexto del proyecto de investigación sobre circTulp4 pero por fuera de esta tesis. Su inclusión pretende facilitar el acceso a datos que son relevantes para interpretar globalmente los resultados que forman parte del trabajo de tesis.

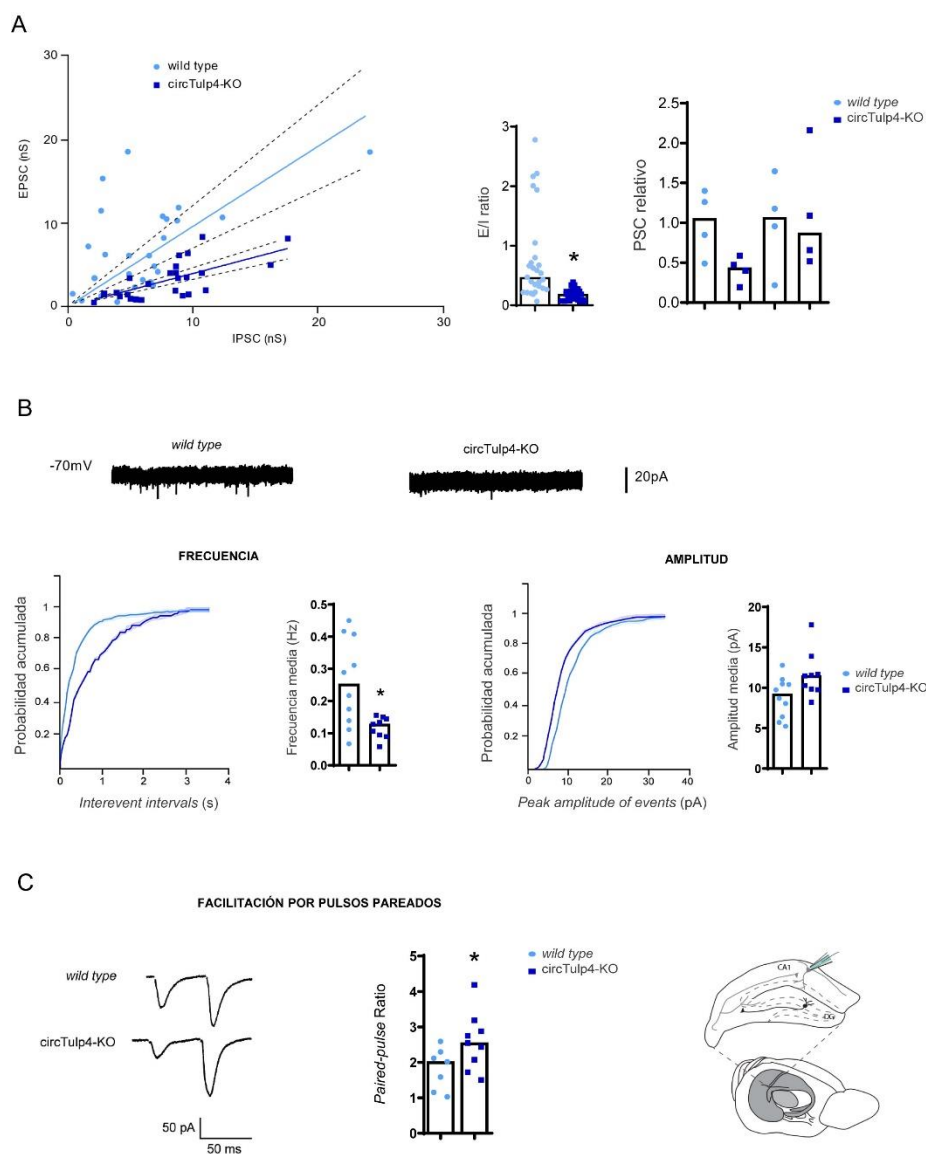


Figura A1. Los ratones circTulp4-KO presentan alteraciones en la neurotransmisión excitatoria. Mediciones realizadas en la sinapsis entre colaterales de Schaffer y CA1 de los ratones *wild type* y circTulp4-KO. **(A)** El balance excitación/inhibición se encuentra fuertemente disminuido en los ratones circTulp4-KO a lo largo de distintas intensidades de estimulación. Izquierda: pendiente de los ratones *wild type*: 0,3514 – 0,6095; pendiente circTulp4-KO: 0,1609 – 0,2344 (IC 95%). Medio: Media del E/I ratio bajo diferentes intensidades de estimulación (t test no pareado, $p = 0,0002$; $n = 27$ / genotipo). Derecha: EPSC e IPSC en el 35% de fEPSP, donde se muestra que la disminución del balance E/I está explicado por el decrecimiento en las corrientes excitatorias. (Mann-Whitney test, $p = 0,057$; $n = 4$ *wild type*, $n = 3$ *knockout*). **(B)** Arriba: registros representativos de mEPSC. En comparación con los ratones *wild type*, la media de la frecuencia de las mEPSCs se encuentra fuertemente disminuida en los ratones circTulp4-KO (Mann-Whitney test, $p = 0,0172$). No se registraron cambios en la amplitud (Mann-Whitney test, $p = 0,0535$) ($n = 10$ *wild type*, $n = 9$ *knockout*). Las mIPSCs no presentaron cambios significativos (datos no mostrados). **(C)** Los ratones circTulp4-KO muestran un aumento en el *paired-pulse ratio* (PPR). Ejemplos de respuestas evocadas bajo la estimulación de la vía de las colaterales de Schaffer (2 pulsos con 50 ms de intervalo entre pulsos). Cambios en la probabilidad basal de liberación de neurotransmisores en el estado estacionario podrían explicar el aumento en el PPR en los ratones circTulp4-KO (t test con la corrección de Welch, $p = 0,0472$)

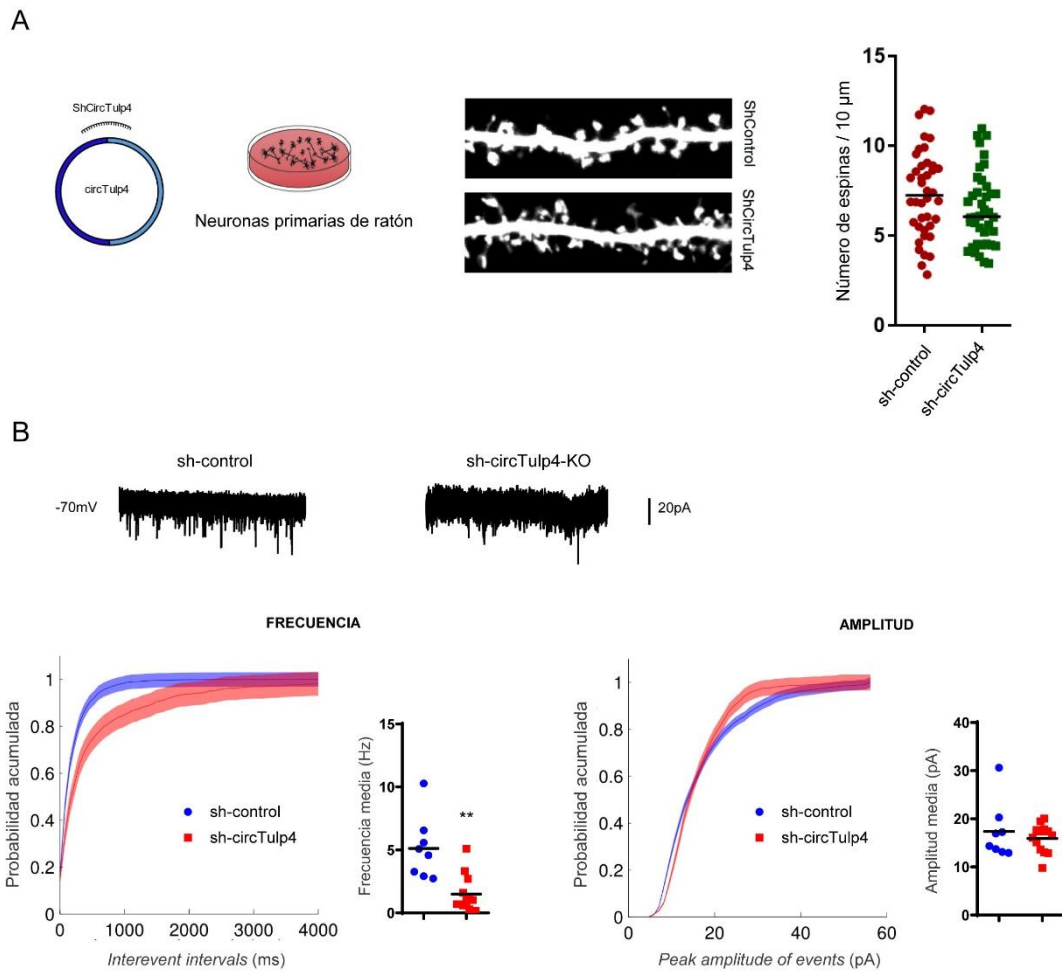


Figura A2. Regulación negativa de circTulp4 mediante un sh-ARN en cultivos primarios de neuronas disminuye la frecuencia de mEPSC sin afectar la densidad de espinas dendríticas. (A) Izquierda: Neuronas primarias hipocámpicas fueron transfectadas en DIV 12-13 con sh-circTulp4 o sh-control. Los análisis morfológicos y electrofisiológicos fueron medidos en DIV 21-25. Derecha: Se observó que la densidad de espinas dendríticas entre las neuronas transfectadas con sh-circTulp4 y sh-control fue similar (prueba t, $p = 0,0894$; $n = 40$ dendritas por tratamiento (provenientes de 4 cultivos independientes)). (B) Arriba: registros representativos de mEPSC, realizados mediante *patch-clamp*. La frecuencia de las mEPSCs disminuyó significativamente en las neuronas transfectadas con sh-circTulp4 en comparación con las transfectadas con sh-control. (Prueba de U Mann-Whitney, $p < 0,01$; $n = 8$ para sh-control, $n = 13$ neuronas para sh-circTulp4). Las mIPSCs no presentaron cambios significativos (datos no mostrados).

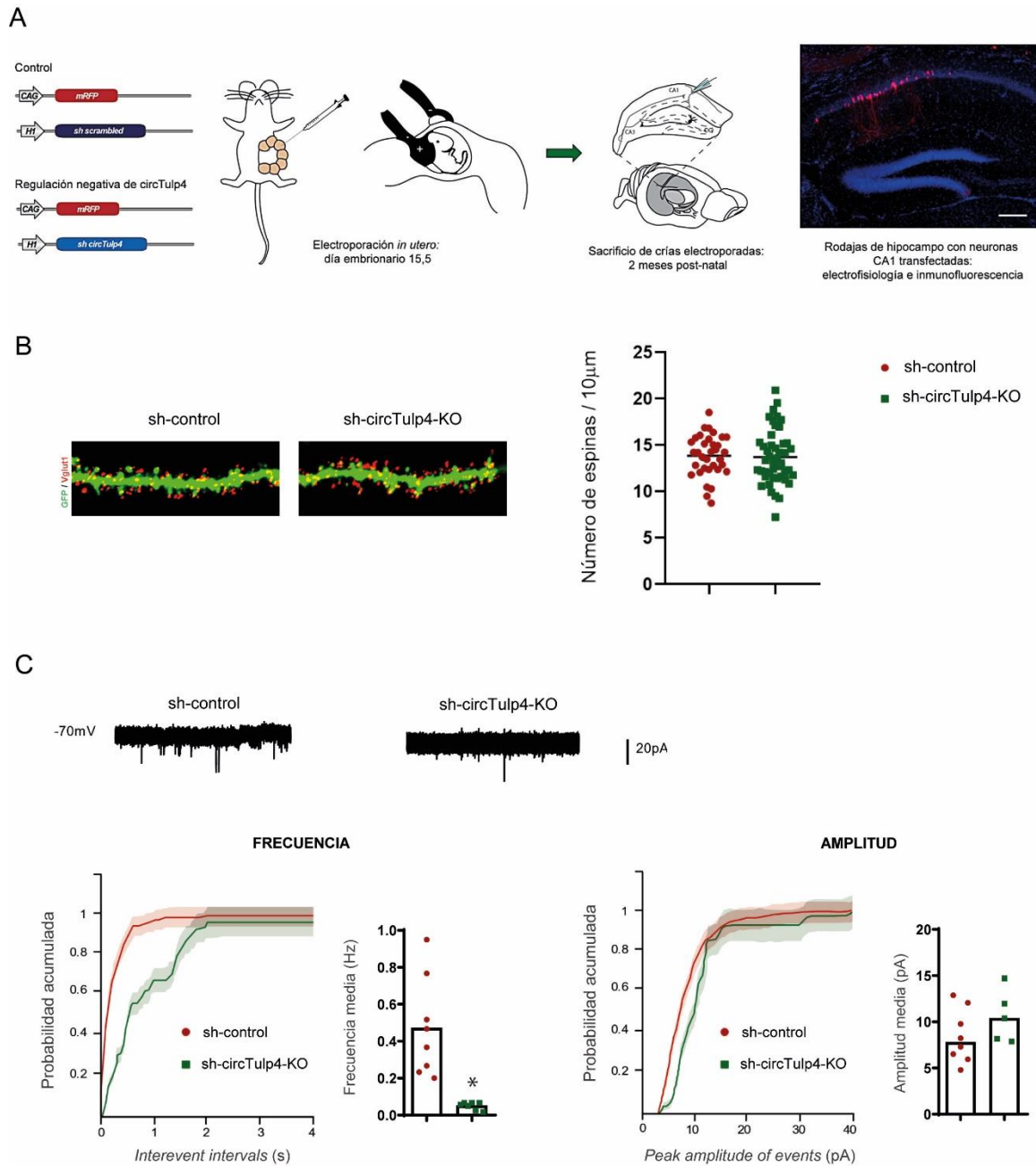


Figura A3. CircTulp4 regula la frecuencia de mEPSC sin alterar la densidad de las espinas dendríticas en neuronas de CA1 transfectadas por electroporación *in utero*. (A) Esquema de trabajo. Se transfectaron neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo con vectores conteniendo sh-circTulp4 o sh-control a través de la técnica de electroporación *in utero* (IUE). Estas se identifican mediante la transfección de la proteína fluorescente RFP. Las neuronas transfectadas se evaluaron en cortes de hipocampo de ratones de 6 semanas de edad. Se muestra una imagen representativa de la eficiencia de transfección. Barra de escala: 200 μ m. (B) La densidad de espinas dendríticas fue semejante entre las neuronas transfectadas con sh-circTulp4 y sh-control. (Prueba de t con la corrección de Welch, $p = 0,7774$; sh-control: 34 dendritas / sh-circTulp4: 47 dendritas). (C) Se evaluaron las corrientes miniatura post-sinápticas de las neuronas transfectadas mediante la técnica de *patch clamp*. En comparación con las neuronas sh-control, las transfectadas con sh-circTulp4-KO muestran una frecuencia de mEPSCs fuertemente disminuida. (Prueba U de Mann-Whitney, $p = 0,0003$; sh-control: 8 neuronas, sh-circTulp4-KO: 7 neuronas). No se registraron cambios en la amplitud (Prueba U de Mann-Whitney, $p = 0,2844$; sh-control: 8 neuronas, sh-circTulp4-KO: 5 neuronas). Las mIPSCs no presentaron cambios significativos (datos no mostrados). N= 3 ratones / condición experimental.

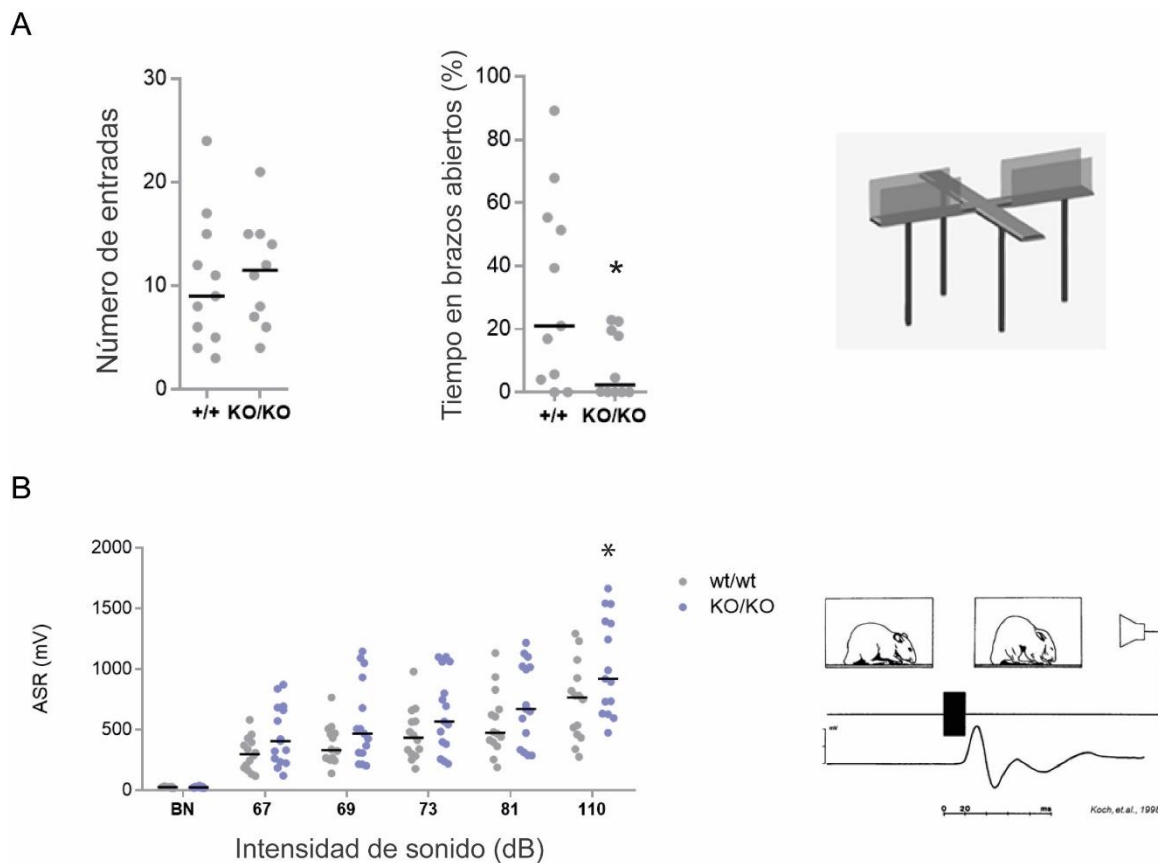


Figura A4. Los ratones *circTulp4*-KO presentan un incremento en el comportamiento asociado a la ansiedad. (A) Los animales *circTulp4*-KO muestran una reducción en la cantidad de tiempo que pasan en los brazos abiertos de un laberinto en cruz elevado (Prueba de t con corrección de Welch, $p = 0,035$), comportamiento asociado a la ansiedad. El número de entradas a los brazos abiertos fue similar en los ratones *wild type* y *circTulp4*-KO (Prueba de t, $p = 0,717$; $n = 12$ ratones por genotipo). **(B)** En el test *Acoustic-startle response* (ASR), se observa una respuesta de sobresalto incrementada en los ratones mutantes a los 110 dB. (ANOVA de medidas repetidas, nivel de sonido x genotipo, $p < 0.0001$; genotipo, $p = 0.0011$, Bonferroni post-test, $p < 0.001$; $n = 15$ ratones por genotipo).

BIBLIOGRAFÍA

- Abdelmohsen, K., Panda, A. C., Munk, R., Grammatikakis, I., Dudekula, D. B., De, S., ... Gorospe, M. Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by CircPABPN1. (2017). *RNA Biology*, 14(3), 361–369.
- Antunes, M., & Biala, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. (2011). *Cognitive Processing*, 13(2), 93–110.
- Arellano, J. I., Benavides-Piccione, R., Defelipe, J., & Yuste, R. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. (2007). *Frontiers in Neuroscience*, 1, 131–143
- Ashwal-Fluss, R., Meyer, M., Pamudurti, N. R., Ivanov, A., Bartok, O., Hanan, M., ... Kadener, S. CircRNA biogenesis competes with pre-mRNA Splicing. (2014). *Molecular Cell*, 56(1), 55–66.
- Asrican, B., Lisman, J., & Otmakhov, N. Synaptic strength of individual spines correlates with bound Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase II. (2007). *Journal of Neuroscience*, 27(51).
- Bachmayr-Heyda, A., Reiner, A. T., Auer, K., Sukhbaatar, N., Aust, S., Bachleitner-Hofmann, T., ... Pils, D. Correlation of circular RNA abundance with proliferation – exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis and normal human tissues. (2015). *Scientific Reports*, 5(1), 1-10.
- Bannerman, D. M., Grubb, M., Deacon, R. M. ., Yee, B. ., Feldon, J., & Rawlins, J. N. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. (2003). *Behavioural Brain Research*, 139(1-2), 197–213.
- Bannerman, D. M., Sprengel, R., Sanderson, D. J., McHugh, S. B., Rawlins, J. N. P., Monyer, H., & Seeburg, P. H. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. (2014). *Nature Reviews Neuroscience*, 15(3), 181–192.
- Barrett, S. P., Wang, P. L., & Salzman, J. Circular RNA biogenesis can proceed through an exon-containing lariat precursor. (2015). *ELife* 4, 1–18.
- Basu, S., Saha, P. K., Roszkowska, M., Magnowska, M., Baczynska, E., Das, N., ... Wlodarczyk, J. Quantitative 3-D morphometric analysis of individual dendritic spines. (2018). *Scientific Reports*, 8(1).
- Beique, J.-C., Lin, D.-T., Kang, M.-G., Aizawa, H., Takamiya, K., & Huganir, R. L. Synapse-specific regulation of AMPA receptor function by PSD-95. (2006). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(51), 19535–19540.
- Berry, K. P., & Nedivi, E. Spine Dynamics: Are They All the Same? (2017). *Neuron*, 96(1), 43–55.
- Bhattacharyya, S., Biou, V., Xu, W., Schlüter, O., & Malenka, R. C. A critical role for PSD-95/AKAP interactions in endocytosis of synaptic AMPA receptors. (2009). *Nature Neuroscience*, 12(2), 172–181.

- Birney, E. et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. (2007). *Nature*, 447, 799–816.
- Black, D. L. Mechanisms of Alternative Pre-Messenger RNA Splicing. (2003). *Annual Review of Biochemistry*, 72, 291–336.
- Bliss, T. V. P., & Lømo, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. (1973). *The Journal of Physiology*, 232(2), 331–356.
- Bourin, M., & Hascoët, M. The mouse light/dark box test. (2003). *European Journal of Pharmacology*, 463(1-3), 55–65.
- Bourne, J., & Harris, K. M. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember? (2007). *Current Opinion in Neurobiology*, 17(3), 381-6.
- Bouwknegt JA, Paylor R. Pitfalls in the interpretation of genetic and pharmacological effects on anxiety-like behaviour in rodents. (2008). *Behavioral Pharmacology*, 19:385–402.
- Burns, M. E., & Augustine, G. J. Synaptic structure and function: Dynamic organization yields architectural precision. (1995). *Cell*, 83(2), 187-94.
- Capel, B., Swain, a, Nicolis, S., Hacker, a, Walter, M., Koopman, P., ... Lovell-Badge, R. Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis. (1993). *Cell*, 73, 1019–1030.
- Carmell, M. A., Z. Xuan, M. Q. Zhang and G. J. Hannon. The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. (2002). *Genes & Development*, 16(21), 2733-2742.
- Chen, N., Zhao, G., Yan, X., Lv, Z., Yin, H., Zhang, S., ... Cui, J. A novel FLI1 exonic circular RNA promotes metastasis in breast cancer by coordinately regulating TET1 and DNMT1. (2018). *Genome Biology*, 19(1).
- Clark, M. B., Amaral, P. P., Schlesinger, F. J., Dinger, M. E., Taft, R. J., Rinn, J. L., ... Mattick, J. S. The Reality of Pervasive Transcription. (2011). *PLoS Biology*, 9(7), e1000625.
- Cocquerelle, C., Daubersies, P., Majérus, M. a, Kerckaert, J. P., & Bailleul, B. Splicing with inverted order of exons occurs proximal to large introns. (1992). *The EMBO Journal*, 11(3), 1095–1098.
- Conn, S. J., Pillman, K. A., Toubia, J., Conn, V. M., Salmanidis, M., Phillips, C. A., ... Goodall, G. J. (2015). The RNA Binding Protein Quaking Regulates Formation of circRNAs. *Cell*, 160(6), 1125–1134.
- Corkin S. Lasting consequences of bilateral medial temporal lobectomy: clinical course and experimental findings in H.M. (1984). *Seminars in Neurology*, 4, 249–259.
- Cryan, J. F., Mombereau, C. & Vassout, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. (2005). *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29, 571–625
- De Kloet, E. R., Joëls, M., & Holsboer, F. Stress and the brain: from adaptation to disease. (2005). *Nature Reviews Neuroscience*, 6(6), 463–475.

- Deacon, R. M. J. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. (2006). *Nature Protocols*, 1(1), 122–124.
- Dean, P., Porrill, J., Ekerot, C.-F., & Jörntell, H. The cerebellar microcircuit as an adaptive filter: experimental and computational evidence. (2009). *Nature Reviews Neuroscience*, 11(1), 30–43
- Dellu, F., Contarino, A., Simon, H., Koob, G. F., & Gold, L. H. Genetic differences in response to novelty and spatial memory using a two-trial recognition task in mice. (2000). *Neurobiology of Learning and Memory*, 73(1), 31-48.
- Deussing, J. M. Animal models of depression. (2006). *Drug Discovery Today: Disease Models*. 3, 375–383.
- Dickstein, D. L., Dickstein, D. R., Janssen, W. G. M., Hof, P. R., Glaser, J. R., Rodriguez, A., ... Tappan, S. J. Automatic Dendritic Spine Quantification from Confocal Data with Neurolucida 360. (2016). *Current Protocols in Neuroscience*, 77(1), 1.27.1–1.27.21.
- Du, W. W., Yang, W., Chen, Y., Wu, Z. K., Foster, F. S., Yang, Z., ... Yang, B. B. Foxo3 circular RNA promotes cardiac senescence by modulating multiple factors associated with stress and senescence responses. (2017). *European Heart Journal*, 38(18), 1402-1412.
- Du, W. W., Yang, W., Liu, E., Yang, Z., Dhaliwal, P., & Yang, B. B. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2. (2016). *Nucleic Acids Research*, 44(6), 2846–2858.
- Dudekula, D. B., Panda, A. C., Grammatikakis, I., De, S., Abdelmohsen, K., & Gorospe, M. CirclInteractome: A web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs. (2015). *RNA Biology*, 13(1), 34–42.
- Dumitriu, D., Hao, J., Hara, Y., Kaufmann, J., Janssen, W. G. M., Lou, W., ... Morrison, J. H. Selective Changes in Thin Spine Density and Morphology in Monkey Prefrontal Cortex Correlate with Aging-Related Cognitive Impairment. (2010). *Journal of Neuroscience*, 30(22), 7507–7515.
- Charles Duyckaerts, C., Potier MC. & Delatour B. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. (2008). *Acta Neuropathologica*, 115, 5–38.
- Emoto, K. Dendrite remodeling in development and disease. (2011). *Development, Growth & Differentiation*, 53(3), 277–286.
- Engert, F., & Bonhoeffer, T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. (1999). *Nature*, 399, 66–70.
- Ennaceur, A., & Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. (1988). *Behavioural Brain Research*, 31(1), 47–59.
- Enuka, Y., Lauriola, M., Feldman, M. E., Sas-Chen, A., Ulitsky, I., & Yarden, Y. (2016). Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor. *Nucleic Acids Research*, 44(3), 1370–1383.

- Feng, G., Mellor, R. H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q. T., Wallace, M., ... Sanes, J. R. Imaging Neuronal Subsets in Transgenic Mice Expressing Multiple Spectral Variants of GFP. (2000). *Neuron*, 28(1), 41–51.
- Fiala JC, Spacek J, Harris KM. Dendritic spine pathology: Cause or consequence of neurological disorders? (2002). *Brain Research Reviews*, 39, 29-54.
- Forbes, N. F., Stewart, C. A., Matthews, K. & Reid, I. C. Chronic Mild Stress and Sucrose Consumption: Validity as a Model of Depression. (1996). *Physiology Behavior*, 60, 1481–1484.
- Forrest, M. P., Parnell, E. & Penzes, P. Dendritic structural plasticity and neuropsychiatric disease. (2018). *Nature Reviews Neuroscience*, 19, 215–234.
- Fuchs, E. Remodeling of neuronal networks by stress. (2006). *Frontiers in Bioscience*, 11(1), 2746.
- Ganeshina, O., Berry, R. W., Petralia, R. S., Nicholson, D. A., and Geinisman, Y. Differences in the expression of AMPA and NMDA receptors between axospinous perforated and nonperforated synapses are related to the configuration and size of postsynaptic densities. (2004). *Journal of Comparative Neurology*, 468, 86–95.
- Gao, J., Wang, W.-Y., Mao, Y.-W., Gräff, J., Guan, J.-S., Pan, L., ... Tsai, L.-H. A novel pathway regulates memory and plasticity via SIRT1 and miR-134. (2010). *Nature*, 466(7310), 1105–1109.
- Garneau, N. L., Wilusz, J. & Wilusz, C. J. The highways and byways of mRNA decay. (2007). *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8, 113–126.
- Ghani, M. U., Mesadi, F., Kanık, S. D., Argunşah, A. Ö., Hobbiss, A. F., Israely, I., ... Çetin, M. Dendritic spine classification using shape and appearance features based on two-photon microscopy. (2017). *Journal of Neuroscience Methods*, 279, 13–21.
- Giros, B., Jaber, M., Jones, S. R., Wightman, R. M., & Caron, M. G. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. (1996). *Nature*, 379(6566), 606–612.
- Goldwater, D. S., Pavlides, C., Hunter, R. G., Bloss, E. B., Hof, P. R., McEwen, B. S., & Morrison, J. H. Structural and functional alterations to rat medial prefrontal cortex following chronic restraint stress and recovery. (2009). *Neuroscience*, 164(2), 798–808.
- Goshen I, Kreisel T, Ben-Menachem-Zidon O, Licht T, Weidenfeld J, Ben-Hur T, Yirmiya R. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. (2008). *Molecular Psychiatry*, 13, 717-728.
- Gotlib, I. H., & Joormann, J. Cognition and Depression: Current Status and Future Directions. (2010). *Annual Review of Clinical Psychology*, 6(1), 285–312.
- Gray, J. A. The Neuropsychology of Anxiety 1st edition. (1982). *Oxford University Press*.
- Gray, J. A. & McNaughton, N. The Neuropsychology of Anxiety 2nd edition. (2000). *Oxford University Press*.

- Griebel, G., Simiand, J., Serradeil-Le Gal, C., Wagnon, J., Pascal, M., Scatton, B., ... Soubrie, P. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the non-peptide vasopressin V1b receptor antagonist, SSR149415, suggest an innovative approach for the treatment of stress-related disorders. (2002). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(9), 6370–6375.
- Gruart, A. Involvement of the CA3-CA1 Synapse in the Acquisition of Associative Learning in Behaving Mice. (2006). *Journal of Neuroscience*, 26(4), 1077–1087.
- Gruner, H., Cortés-lópez, M., Cooper, D. A., Bauer, M. & Miura, P. CircRNA accumulation in the aging mouse brain. (2016). *Scientific Reports*, 6, 1–14.
- Guo, J. U., Agarwal, V., Guo, H., & Bartel, D. P. Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. (2014). *Genome Biology*, 15, 409.
- Hanse, E., Seth, H., & Riebe, I. AMPA-silent synapses in brain development and pathology. (2013). *Nature Reviews Neuroscience*, 14(12), 839–850.
- Hansen, K. F., Karelina, K., Sakamoto, K., Wayman, G. A., Impey, S., & Obrietan, K. miRNA-132: a dynamic regulator of cognitive capacity. (2012). *Brain Structure and Function*, 218(3), 817–831.
- Hansen, T. B., Jensen, T. I., Clausen, B. H., Bramsen, J. B., Finsen, B., Damgaard, C. K., & Kjems, J. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. (2013). *Nature*, 495(7441), 384–388.
- Harris, K. M. Structure, development, and plasticity of dendritic spines. (1999). *Current Opinion in Neurobiology*, 9(3), 343–348.
- Harris, K. M, Jensen, F. E., & Tsao, B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. (1992). *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(7), 2685–2705.
- Harris, K. M., & Kater, S. B. Dendritic Spines: Cellular Specializations Imparting Both Stability and Flexibility to Synaptic Function. (1994). *Annual Review of Neuroscience*, 17(1), 341–371.
- Hayashi, Y., and Majewska, A. K.. Dendritic spine geometry: functional implication and regulation. (2005). *Neuron* 46, 529–532.
- Häusser, M., Spruston, N. & Stuart, G. J. *Diversity and Dynamics of Dendritic Signaling*. (2000). *Science*, 290(5492), 739–744.
- Hering, H., & Sheng, M. Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. (2001). *Nature Reviews Neuroscience*, 2(12), 880–888.
- Hickmott PW, Ethell IM. Dendritic plasticity in the adult neocortex. (2006). *Neuroscientist*, 12, 16-28.
- Ho, V. M., Lee, J. A., & Martin, K. C. The cell biology of synaptic plasticity. (2011). *Science*, 334(6056), 623-8.
- Hollmann, M. Cloned Glutamate Receptors. (1994). *Annual Review of Neuroscience*, 17(1), 31–108.

- Holtmaat, A., & Svoboda, K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. (2009). *Nature Reviews Neuroscience*, 10(9), 647–658.
- Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. (1996) *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 54:21–30.
- Hosokawa, T., Rusakov, D. a, Bliss, T. V, & Fine, A. Repeated confocal imaging of individual dendritic spines in the living hippocampal slice: evidence for changes in length and orientation associated with chemically induced LTP. (1995). *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(8), 5560–5573.
- Hotulainen, P., & Hoogenraad, C. C. Actin in dendritic spines: Connecting dynamics to function. (2010). *Journal of Cell Biology*, 189 (4), 619–629.
- Hsu, M. T., & Coca-Prados, M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. (1979). *Nature*, 280, 339–340.
- Huang, R., Zhang, Y., Han, B., Bai, Y., Zhou, R., Gan, G., ... Yao, H. Circular RNA HIPK2 regulates astrocyte activation via cooperation of autophagy and ER stress by targeting MIR124–2HG. (2017). *Autophagy*, 13(10): 1722–1741.
- Hutsler, J. J., & Zhang, H. Increased dendritic spine densities on cortical projection neurons in autism spectrum disorders. (2010). *Brain Research*, 1309, 83–94.
- Ikeda, A, Nishina, P. M., & Naggert, J. K. The tubby-like proteins, a family with roles in neuronal development and function. (2002a). *Journal of Cell Science*, 115(1), 9–14.
- Irwin, S. A., Patel, B., Idupulapati, M., Harris, J. B., Crisostomo, R. A., Larsen, B. P., ... Greenough, W. T. Abnormal dendritic spine characteristics in the temporal and visual cortices of patients with fragile-X syndrome: A quantitative examination. (2001). *American Journal of Medical Genetics*, 98(2), 161–167.
- Ivanov, A., Memczak, S., Wyler, E., Torti, F., Porath, H. T., Orejuela, M. R., ... Rajewsky, N. Analysis of Intron Sequences Reveals Hallmarks of Circular RNA Biogenesis in Animals. (2015). *Cell Reports*, 10(2), 170–177.
- Jackman, S. L., & Regehr, W. G. The Mechanisms and Functions of Synaptic Facilitation. (2017). *Neuron*, 94(3), 447–464.
- Jeck, W. R., & Sharpless, N. E. Detecting and characterizing circular RNAs. (2014). *Nature Biotechnology*, 32(5), 453-61.
- Jeck, W. R., Sorrentino, J. A., Wang, K., Slevin, M. K., Burd, C. E., Liu, J., ... Sharpless, N. E. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. (2013). *RNA*, 19(2), 141-57.
- Jones, E. G. Santiago Ramón y Cajal and the croonian lecture, March 1894. (1994). *Trends in Neurosciences*, 17(5), 192–193.
- Kandel, E. R. The molecular biology of memory storage: A dialogue between genes and synapses. (2001). *Science*, 294(5544), 1030-8.

- Karl T., et al. Altered motor activity, exploration and anxiety in heterozygous neuregulin 1 mutant mice: implications for understanding schizophrenia. (2007). *Genes, Brain and Behavior*, 6:677–687.
- Kauer, J. A. Learning Mechanisms in Addiction: Synaptic Plasticity in the Ventral Tegmental Area as a Result of Exposure to Drugs of Abuse. (2004). *Annual Review of Physiology*, 66(1), 447–475.
- Kharazia, V. N., and Weinberg, R. J. Immunogold localization of AMPA and NMDA receptors in somatic sensory cortex of albino rat. (1999). *Journal of Comparative Neurology*, 412, 292–302.
- Kile, B. T., Schulman, B. A., Alexander, W. S., Nicola, N. A., Martin, H. M., & Hilton, D. J. The SOCS box: a tale of destruction and degradation. (2002). *Trends in Biochemical Sciences*, 27(5), 235–241.
- Kirov, S. A., & Harris, K. M. Dendrites are more spiny on mature hippocampal neurons when synapses are inactivated. (1999). *Nature Neuroscience*, 2(10), 878–883.
- Klein, D. F. Endogenomorphic Depression. (1974). *Archives of General Psychiatry*, 31(4), 447.
- Koh, I. Y. Y., Lindquist, W. B., Zito, K., Nimchinsky, E. A., and Svoboda, K. An image analysis algorithm for dendritic spines. (2002). *Neural Computation*, 14, 1283–1310.
- Kramer, M. C., Liang, D., Tatomer, D. C., Gold, B., March, Z. M., Cherry, S., & Wilusz, J. E. Combinatorial control of *Drosophila* circular RNA expression by intronic repeats, hnRNPs, and SR proteins. (2015). *Genes & Development*, 29(20), 2168–2182.
- Lambert KG, Buckelew SK, Staffiso-Sandoz G, Gaffga S, Cappenter W, Fisher J, Kinsley CH. Activity-stress induces atrophy of apical dendrites of hippocampal pyramidal neurons in male rats. (1998) *Physiology & Behavior*, 65, 43-49.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., ... Morgan, M. J. Initial sequencing and analysis of the human genome. (2001) *Nature*, 409(6822), 860–921.
- Lang, C., Barco, A., Zablow, L., Kandel, E.R., Siegelbaum, S.A., and Zakharenko, S.S. Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation. (2004). *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 101, 16665–16670.
- Legnini, I., Di Timoteo, G., Rossi, F., Morlando, M., Briganti, F., Sthandier, O., ... Bozzoni, I. Circ-ZNF609 is a circular RNA that can be translated and functions in myogenesis. (2017). *Molecular Cell*, 66(1), 22–37.e9.
- LeVay, S. Synaptic patterns in the visual cortex of the cat and monkey. Electron microscopy of Golgi preparations. (1973). *The Journal of Comparative Neurology*, 150(1), 53–85.
- Li, F., Zhang, L., Li, W., Deng, J., Zheng, J., An, M., ... Zhou, Y. Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/ β -catenin pathway. (2015). *Oncotarget*, 6(8).
- Li, Q. Z., Wang, C. Y., Shi, J. Da, Ruan, Q. G., Eckenrode, S., Davoodi-Semiromi, A., ... She, J. X. Molecular cloning and characterization of the mouse and human TUSP gene, a novel member of the tubby superfamily. (2001). *Gene*, 273(2), 275–284.

- Li, X., Liu, C. X., Xue, W., Zhang, Y., Jiang, S., Yin, Q. F., ... Chen, L. L. Coordinated circRNA Biogenesis and Function with NF90/NF110 in Viral Infection. (2016). *Molecular Cell*, 67(2), 214-227.
- Li, Z., Huang, C., Bao, C., Chen, L., Lin, M., Wang, X., ... Shan, G. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. (2015). *Nature Structural & Molecular Biology*, 22(3), 256–264.
- Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. (1990). *Pharmacology & Therapeutics*, 46:321–40.
- Liu, B., Ye, B., Zhu, X., Yang, L., Li, H., Liu, N., ... Fan, Z.. An inducible circular RNA circKcnt2 inhibits ILC3 activation to facilitate colitis resolution. (2020). *Nature Communications*, 11(1).
- Liu, M.-Y., Yin, C.-Y., Zhu, L.-J., Zhu, X.-H., Xu, C., Luo, C.-X., ... Zhou, Q.-G. Sucrose preference test for measurement of stress-induced anhedonia in mice. (2018). *Nature Protocols*, 13(7), 1686–1698.
- Liu, X.-L., Luo, L., Mu, R.-H., Liu, B.-B., Geng, D., Liu, Q., & Yi, L.-T. Fluoxetine regulates mTOR signalling in a region-dependent manner in depression-like mice. (2015). *Scientific Reports*, 5(1).
- Loewenstein, Y., Yanover, U., & Rumpel, S. Predicting the dynamics of network connectivity in the neocortex. (2015). *Journal of Neuroscience*, 35, 12535–12544.
- London, M., & Häusser, M. Dendritic Computation. (2005). *Annual Review of Neuroscience*, 28(1), 503–532.
- Lu, D., & Xu, A.-D. Mini Review: Circular RNAs as Potential Clinical Biomarkers for Disorders in the Central Nervous System. (2016). *Frontiers in Genetics*, 7.
- Luebke, J. I., Weaver, C. M., Rocher, A. B., Rodriguez, A., Crimins, J. L., Dickstein, D. L., ... Hof, P. R. Dendritic vulnerability in neurodegenerative disease: insights from analyses of cortical pyramidal neurons in transgenic mouse models. (2010). *Brain Structure and Function*, 214(2-3), 181–199.
- Lukiw, W. J.. Circular RNA (circRNA) in Alzheimer's disease (AD). (2013). *Frontiers in Genetics*, 4.
- Magarinos AM, McEwen BS, Saboureaux M, Pevet P. Rapid and reversible changes in intrahippocampal connectivity during the course of hibernation in European hamsters. (2006). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 18775-18780.
- Malenka, R. C., & Nicoll, R. A. Silent synapses speak up. (1997). *Neuron*, 19, 473-476.
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R., & Svoboda, K. Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. (1999). *Science*, 283(5409), 1923–1927.
- Mancuso, J. J., Chen, Y., Li, X., Xue, Z., and Wong, S. T.. Methods of dendritic spine detection: from Golgi to high-resolution optical imaging. (2013). *Neuroscience*, 251, 129–140.
- Marchette, R. C. N., Bicca, M. A., Santos, E. C. da S. & de Lima, T. C. M. Distinctive stress sensitivity and anxiety-like behavior in female mice: Strain differences matter. (2018). *Neurobiology of Stress* 9, 55–63

- Martin, S. J., Grimwood, P. D., & Morris, R. G. M. Synaptic plasticity and memory: An Evaluation of the Hypothesis. (2000). *Annual Review of Neuroscience*, 23 (Hebb 1949), 649–711
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., & Kasai, H. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. (2001). *Nature Neuroscience*, 4(11), 1086–1092
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C., & Kasai, H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. (2004). *Nature*, 429, 761–766.
- Mattick, J. S. Challenging the dogma: The hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. (2003) *BioEssays*, 25(10), 930–939.
- McEwen, B. S. Physiology and Neurobiology of Stress and Adaptation: Central Role of the Brain. (2007). *Physiological Reviews*, 87(3), 873–904.
- Meister, G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. (2013). *Nature Reviews Genetics*, 14, 447–459.
- Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., ... Rajewsky, N. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. (2013). *Nature*, 495(7441), 333–338.
- Moore, M. J., & Proudfoot, N. J. Pre-mRNA Processing Reaches Back to Transcription and Ahead to Translation. (2009). *Cell*, 136(4), 688–700.
- Morris, R. G. . D.O. Hebb: The Organization of Behavior, Wiley: New York; 1949. (1999). *Brain Research Bulletin*, 50(5-6), 437.
- Moulin, T. C., Rayée, D. & Schiöth, H. B. Dendritic spine density changes and homeostatic synaptic scaling: a meta-analysis of animal studies. (2021). *Neural Regeneration Research*, 17, 20–24
- Murthy, V. N., Schikorski, T., Stevens, C. F., & Zhu, Y. Inactivity Produces Increases in Neurotransmitter Release and Synapse Size. (2001). *Neuron*, 32(4), 673–682.
- Nägerl, U. V., Eberhorn, N., Cambridge, S. B., & Bonhoeffer, T. *Bidirectional Activity-Dependent Morphological Plasticity in Hippocampal Neurons*. (2004). *Neuron*, 44(5), 759–767.
- Neff, A. T., Lee, J. Y., Wilusz, J., Tian, B. & Wilusz, C. J. Global analysis reveals multiple pathways for unique regulation of mRNA decay in induced pluripotent stem cells. (2012). *Genome Research*, 22(8): 1457-67.
- Neufeld-Cohen, A., Tsoory, M. M., Evans, A. K., Getselter, D., Gil, S., Lowry, C. A., ... Chen, A. A triple urocortin knockout mouse model reveals an essential role for urocortins in stress recovery. (2010). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), 19020–19025.
- Neves, G., Cooke, S. F., & Bliss, T. V. Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. (2008). *Nature Reviews Neuroscience*, 9(1), 65–75.
- Nigro, J. M., Cho, K. R., Fearon, E. R., Kern, S. E., Ruppert, J. M., Oliner, J. D., ... Vogelstein, B. Scrambled exons. (1991). *Cell*, 64(3), 607–613.

- Nishiyama, J. Plasticity of dendritic spines: Molecular function and dysfunction in neurodevelopmental disorders. (2019) *Psychiatry and Clinical Neurosciences*.
- Noguchi, J., Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C. R., & Kasai, H. Spine-neck geometry determines NMDA receptor-dependent Ca²⁺ signaling in dendrites. (2005). *Neuron*, 46(4), 609–622.
- North, M. A., Naggert, J. K., Yan, Y., Noben-Trauth, K., & Nishina, P. M. Molecular characterization of TUB, TULP1, and TULP2, members of the novel tubby gene family and their possible relation to ocular diseases. (1997). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 3128-3133.
- Pamudurti, N. R., Bartok, O., Jens, M., Ashwal-Fluss, R., Stottmeister, C., Ruhe, L., ... Kadener, S. Translation of CircRNAs. (2017). *Molecular Cell*, 66(1), 9–21.e7.
- Papp, M., Willner, P. & Muscat, R. An animal model of anhedonia: attenuation of sucrose consumption and place preference conditioning by chronic unpredictable mild stress. (1991). *Psychopharmacology* 104, 255–259.
- Parrish, J. Z., Emoto, K., Kim, M. D., & Jan, Y. N. Mechanisms that Regulate Establishment, Maintenance, and Remodeling of Dendritic Fields. (2007). *Annual Review of Neuroscience*. 30(1), 399–423.
- Pchitskaya, E. & Bezprozvanny, I. Dendritic Spines Shape Analysis—Classification or Clusterization? Perspective. (2020). *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, 12 (31).
- Pennington, Z. T., Dong, Z., Feng, Y., Vetere, L. M., Page-Harley, L., Shuman, T., & Cai, D. J. ezTrack: An open-source video analysis pipeline for the investigation of animal behavior. (2019). *Scientific Reports*, 9(1).
- Peters, A., & Kaiserman-Abramof, I. R. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. (1970). *American Journal of Anatomy*, 127(4), 321–355.
- Phillips, G. R., Huang, J. K., Wang, Y., Tanaka, H., Shapiro, L., Zhang, W., ... Colman, D. R. The presynaptic particle web: Ultrastructure, composition, dissolution, and reconstitution. (2001). *Neuron*, 32(1), 63–77.
- Piwecka, M., Glažar, P., Hernandez-Miranda, L. R., Memczak, S., Wolf, S. A., Rybak-Wolf, A., ... Rajewsky, N. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. (2017). *Science*, 357, 1–14.
- Popov, V. I., & Bocharova, L. S. Hibernation-induced structural changes in synaptic contacts between mossy fibres and hippocampal pyramidal neurons. (1992) *Neuroscience*, 48(1), 53–62.
- Popov, V. I., Bocharova, L. S., & Bragin, A. G. Repeated changes of dendritic morphology in the hippocampus of ground squirrels in the course of hibernation. (1992). *Neuroscience*, 48(1), 45–51.
- Porsolt, R. D., Le Pichon, M. & Jalfre, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. (1977). *Nature*, 266, 730–732.

- Radley, J. J., Rocher, A. B., Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Dammann, M., McEwen, B. S., ... Hof, P. R. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. (2008). *Journal of Comparative Neurology*, 507(1), 1141–1150.
- Rocheffort, N. L., & Konnerth, A. Dendritic spines: From structure to *in vivo* function. (2012). *EMBO Reports*. 13(8), 699-708.
- Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. (1997). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 30:289–304.
- Roelandse, M. Hypothermia-Associated Loss of Dendritic Spines. (2004). *Journal of Neuroscience*, 24(36), 7843–7847.
- Rodriguez, A., Ehlenberger, D. B., Dickstein, D. L., Hof, P. R., and Wearne, S. L. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. (2008). *PLoS One*, 3:e1997.
- Ruan YW, Zou B, Fan Y, Li Y, Lin N, Zeng YS, Gao TM, Yao Z, Xu ZC Dendritic plasticity of CA1 pyramidal neurons after transient global ischemia. (2006). *Neuroscience*, 140, 191-201.
- Ruszczycki, B., Szepesi, Z., Wilczynski, G. M., Bijata, M., Kalita, K., Kaczmarek, L., & Wlodarczyk, J. Sampling issues in quantitative analysis of dendritic spines morphology. (2012). *BMC Bioinformatics*, 13:213.
- Rybak-Wolf, A., Stottmeister, C., Glažar, P., Jens, M., Pino, N., Giusti, S., ... Rajewsky, N. Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. (2015). *Molecular Cell*, 58(5), 870-885.
- Salzman, J., Chen, R. E., Olsen, M. N., Wang, P. L. & Brown, P. O. Cell-type specific features of circular RNA expression. (2013). *PLoS Genetics*. 9 (9), e1003777.
- Salzman, J., Gawad, C., Wang, P. L., Lacayo, N., & Brown, P. O.. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types. (2012). *PLoS ONE*, 7(2), e30733.
- Santagata, S., Boggon, T. J., Baird, C. L., Gomez, C. A., Zhao, J., Wei Song Shan, ... Shapiro, L. G-protein signaling through tubby proteins. (2001). *Science*, 292(5524), 2041-50.
- Scott EK, Luo LQ. How do dendrites take their shape? (2001). *Nature Neuroscience*, 4, 359-365.
- Scoville, W. B., & Milner, B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. (1957). *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 20(1), 11–21.
- Shabalina, S. A. & Spiridonov, N. A. The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences. (2004). *Genome Biology*, 5, 104.
- Sheng, M., & Hoogenraad, C. C. The Postsynaptic Architecture of Excitatory Synapses: A More Quantitative View. (2007). *Annual Review of Biochemistry*, 76(1), 823–847.
- Simon, P., Dupuis, R., & Costentin, J. Thigmotaxis as an index of anxiety in mice. Influence of dopaminergic transmissions. (1994). *Behavioural Brain Research*, 61(1), 59–64.

- Son, J., Song, S., Lee, S., Chang, S., and Kim, M. Morphological change tracking of dendritic spines based on structural features. (2011). *Journal of Microscopy* 241, 261–272.
- Spigelman, I., Yan, X.-X., Obenaus, A., Lee, E. Y.-S., Wasterlain, C. ., & Ribak, C. . Dentate granule cells form novel basal dendrites in a rat model of temporal lobe epilepsy. (1998). *Neuroscience*, 86(1), 109–120.
- Stagsted, L.V., Nielsen, K.M., Daugaard, I. & Hansen, T. B. Noncoding AUG circRNAs constitute an abundant and conserved subclass of circles. (2019). *Life Science Alliance*, 2, e201900398.
- Stanford SC. The open field test: reinventing the wheel. (2007). *Journal of Psychopharmacology*, 21:134–5.
- Starke, S., Jost, I., Rossbach, O., Schneider, T., Schreiner, S., Hung, L.-H., & Bindereif, A. Exon Circularization Requires Canonical Splice Signals. (2015). *Cell Reports*, 10(1), 103–111.
- Steimer T. The biology of fear - and anxiety - related behaviors. (2002). *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 4:123–137.
- Steimer T. Animal models of anxiety disorders in rats and mice: some conceptual issues. (2011). *Dialogues in clinical neuroscience*, 13(4), 495–506.
- Takumi, Y., Ramirez-Leon, V., Laake, P., Rinvik, E., and Ottersen, O. P. Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nature Neuroscience*, 2, 618–624.
- Tanti, A., & Belzung, C. Open questions in current models of antidepressant action. (2010). *British Journal of Pharmacology*, 159(6), 1187–1200.
- Tonnesen, J., Katona, G., Rozsa, B., and Nagerl, U. V. Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. (2014). *Nature Neuroscience*, 17, 678–685.
- Turrigiano, G. G., & Nelson, S. B. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. (2004). *Nature Reviews Neuroscience*, 5(2), 97–107.
- Van Elburg, R. A. J., & van Ooyen, A. Impact of Dendritic Size and Dendritic Topology on Burst Firing in Pyramidal Cells. (2010). *PLoS Computational Biology*. 6(5), e1000781.
- Van Gaalen, M. M., & Steckler, T. Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. (2000). *Behavioural Brain Research*, 115(1), 95-106.
- Venø, M. T., Hansen, T. B., Venø, S. T., Clausen, B. H., Grebing, M., Finsen, B., ... Kjems, J. Spatio-temporal regulation of circular RNA expression during porcine embryonic brain development. (2015). *Genome Biology*, 16, 245.
- Vetter P, Roth A, Häusser M Propagation of action potentials in dendrites depends on dendritic morphology. (2001). *Journal of Neurophysiology*. 85: 926 –937.
- Wall, P. M., Blanchard, R. J., Yang, M., & Blanchard, D. C. Infralimbic D2 receptor influences on anxiety-like behavior and active memory/attention in CD-1 mice. (2003). *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(3), 395–410.

- Wallace, W., and Bear, M. F. A morphological correlate of synaptic scaling in visual cortex. (2004). *Journal of Neuroscience*, 24, 6928–6938.
- Wang, G., Cheng, Y., Gong, M., Liang, B., Zhang, M., Chen, Y., ... Xu, J. Systematic correlation between spine plasticity and the anxiety/depression-like phenotype induced by corticosterone in mice. (2013). *NeuroReport*, 24(12), 682–687.
- Wang, P. L., Bao, Y., Yee, M.-C., Barrett, S. P., Hogan, G. J., Olsen, M. N., ... Salzman, J. Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life. (2014). *PLoS One*, 9(3), e90859.
- Wang, Y., & Wang, Z. Efficient backsplicing produces translatable circular mRNAs. (2015). *RNA*, 21(2), 172–179.
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., ... Lander, E. S. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. (2002). *Nature*, 420(6915), 520–562.
- Wefelmeyer, W., Puhl, C. J. & Burrone, J. Homeostatic plasticity of subcellular neuronal structures: from inputs to outputs. (2016). *Trends in Neurosciences*, 39, 656–667.
- Westholm, J. O., Miura, P., Graveley, B. R., Lai, E. C., Olson, S., Shenker, S., ... Celniker, S. E. Genome-wide analysis of Drosophila Circular RNAs Reveals Their Structural and Sequence Properties and Age-Dependent Neural accumulation. (2014). *Cell Reports*, 9(5), 1966–1980.
- Whitlock, J. R., Heynen, A. J., Shuler, M. G., & Bear, M. F. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. (2006). *Science*, 313(5790), 1093–1097.
- Willner, P. & Healy, S. Decreased hedonic responsiveness during a brief depressive mood swing. (1994). *Journal of Affective Disorders*, 32, 13–20.
- Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S. & Muscat, R. Psychopharmacology Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. (1987). *Psychopharmacology*, 93, 358–364.
- Wilusz, J. E. A 360° view of circular RNAs: From biogenesis to functions. (2018). *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 9(4), 1478.
- Woolley, C. S., Gould, E., Frankfurt, M., & McEwen, B. S. Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. (1990). *Journal of Neuroscience*, 10(12), 4035–4039.
- Xia, P., Wang, S., Ye, B., Du, Y., Li, C., Xiong, Z., ..., Fan, Z. A Circular RNA Protects Dormant Hematopoietic Stem Cells from DNA Sensor cGAS-Mediated Exhaustion. (2018). *Immunity*, 48(4), 688–701.e7.
- Xu, C. & Zhang, J. Mammalian circular RNAs result largely from splicing errors. (2021). *Cell Reports*, 36, 109439.
- Xu, P., Wang, K., Lu, C., Dong, L., Chen, Y., Wang, Q., ..., Liu, X. Effects of the chronic restraint stress induced depression on reward-related learning in rats. (2017). *Behavioural Brain Research*, 321, 185–192.

- Yang, Y., Fan, X., Mao, M., Song, X., Wu, P., Zhang, Y., Jin, Y., Yang, Y., Chen, L., Wang, Y., Wong, C., Xiao, X., Wang, Z. Extensive translation of circular RNAs driven by N6-methyladenosine. (2017). *Cell Research*, 27, 626-641.
- Yang, Yibing, Gao, X., Zhang, M., Yan, S., Sun, C., Xiao, F.,..., Zhang, N. Novel Role of FBXW7 Circular RNA in Repressing Glioma Tumorigenesis. (2018). *Journal of the National Cancer Institute*, 110(3), 304–315.
- Yoshihara, Y., De Roo, M., and Muller, D. Dendritic spine formation and stabilization. (2009). *Current Opinion in Neurobiology*, 19, 146–153
- You, X., Vlatkovic, I., Babic, A., Will, T., Epstein, I., Tushev, G.,..., Chen, W. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity. (2015). *Nature Neuroscience*, 18(4), 603–610.
- Yu, C.-Y., Li, T.-C., Wu, Y.-Y., Yeh, C.-H., Chiang, W., Chuang, C.-Y., & Kuo, H.-C. The circular RNA circBIRC6 participates in the molecular circuitry controlling human pluripotency. . (2017) *Nature Communications*, 8(1).
- Yuste, R., & Bonhoeffer, T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. (2001). *Annual Review of Neuroscience*, 24(1862), 1071–1089.
- Yuste, R., & Bonhoeffer, T. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. (2004). *Nature Reviews Neuroscience*, 5, 24–34.
- Zaphiropoulos, P. G. Circular RNAs from transcripts of the rat cytochrome P450 2C24 gene: correlation with exon skipping. (1996). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6536–6541.
- Zeng, Y., Du, W. W., Wu, Y., Yang, Z., Awan, F. M., Li, X., ... Yang, B. B. A Circular RNA Binds To and Activates AKT Phosphorylation and Nuclear Localization Reducing Apoptosis and Enhancing Cardiac Repair. (2017). *Theranostics*, 7(16), 3842–3855.
- Zenke, F., Gerstner, W. & Ganguli, S. The temporal paradox of Hebbian learning and homeostatic plasticity. (2017). *Current Opinion in Neurobiology*, 43, 166–176.
- Zhang, M., Huang, N., Yang, X., Luo, J., Yan, S., Xiao, F., ... Zhang, N. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis. (2018a). *Oncogene*, 37(13), 1805–1814.
- Zhang, M., Zhao, K., Xu, X., Yang, Y., Yan, S., Wei, P., ... Zhang, N. A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma. (2018b). *Nature Communications*, 9(1).
- Zhang, X. O., Dong, R., Zhang, Y., Zhang, J. L., Luo, Z., Zhang, J., ... Yang, L. Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. (2016). *Genome Research*, 26, 1277-1287.
- Zhang, Y., Xue, W., Li, X., Zhang, J., Chen, S., Zhang, J.-L., ... Chen, L.-L. (2016). The Biogenesis of Nascent Circular RNAs. *Cell Reports*, 15(3), 611–624.
- Zhang, Y., Zhang, X.-O., Chen, T., Xiang, J.-F., Yin, Q.-F., Xing, Y.-H., ... Chen, L.-L. Circular Intronic Long Noncoding RNAs. (2013). *Molecular Cell*, 51(6), 792–806.

Zheng, Q., Bao, C., Guo, W., Li, S., Chen, J., Chen, B., ... Huang, S. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. (2016). *Nature Communications*, 7, 11215.

Zhou, Q., Homma, K. J., & Poo, M. Shrinkage of Dendritic Spines Associated with Long-Term Depression of Hippocampal Synapses. (2004). *Neuron*, 44(5), 749–757.

Zhou, Q.-G., Hu, Y., Wu, D.-L., Zhu, L.-J., Chen, C., Jin, X., ... Zhu, D.-Y. Hippocampal Telomerase Is Involved in the Modulation of Depressive Behaviors. (2011). *Journal of Neuroscience*, 31(34), 12258–12269.

Zhou, T., Xie, X., Li, M., Shi, J., Zhou, J., Knox, K., ... Gu, W. Rat BodyMap transcriptomes reveal unique circular RNA features across tissue types and developmental stages. (2018). *RNA* 24, 1443–1456.

Zito, K., Scheuss, V., Knott, G., Hill, T., & Svoboda, K. Rapid Functional Maturation of Nascent Dendritic Spines. (2009). *Neuron*, 61(2), 247–258.

Zucker, R. S., & Regehr, W. G. Short-term synaptic plasticity. (2002). *Scholarpedia*, 8(10), 3153.