

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

Colegio de Ciencia y Tecnología

Doctorado en Ciencias Genómicas

**Análisis de la expresión de los genes *drd2* y *drd3* en un modelo animal de
esquizofrenia**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS GENÓMICAS

PRESENTA

C. ALMA DELIA GENIS MENDOZA

Director de tesis: Dr. HUMBERTO NICOLINI SÁNCHEZ

Codirectora de tesis: Dra. CAROLINA LÓPEZ RUBALCAVA

MÉXICO D.F. AGOSTO 2013

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

COMITÉ TUTORIAL:

Dra. Carolina López Rubalcava. Profesora investigadora, Centro de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV-SUR).

Dr. Humberto Nicolini, Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México. Grupo de Estudios Médicos y Familiares Carracci.

ASESORES:

Dra. Elisa Azuara Liceaga, Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dra. Sara Frías Vázquez, Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México. Instituto Nacional de Pediatría.

Dr. Cesar López Camarillo, Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Dra. Lucia Martínez Mota Investigadora en Ciencias Médicas, Instituto Nacional de Psiquiatría (IPN).

Dra. Lorena Orozco, Profesor Investigador, Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México. Instituto Nacional de Medicina Genómica.

DEDICATORIA

A Emiliano:

Mi pequeño tesoro,
Mi pequeño trocito de vida....

Mi máspreciado proyecto; gracias por acompañarme y recordarme el valor del amor y la incondicionalidad, contigo los días difíciles fueron menos desafortunados.

Gracias por existir y alegrar mi vida día a día ¡¡¡TE AMO!!!

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al universo infinito y a su energía....

A la Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM), por la oportunidad y apoyo económico otorgado.

Al posgrado en Ciencias Genómicas por la formación, aprendí un poco de cada uno...se los agradezco.

A mi comité asesor; Dra. Sara Frías, Dra. Lorena Orozco, Dra. Lucia Martínez, Dra. Elisa Azuara, Dr. Cesar López, por su paciencia, consejos y orientación.

Al Dr. Humberto Nicolini, agradezco su apoyo y confianza en cada de mis iniciativas. Así como por la oportunidad de colaborar en su grupo de trabajo, es un honor ser parte de este.

A Nuria, Daniel, Julio, Mariana, gracias!!!, sin ustedes esto hubiese sido más complicado.

A la Dra. Carolina López Rubalcava, por su confianza y apoyo, y al Centro de estudios avanzados del IPN (CINVESTAV) sede sur, por darme las facilidades para realizar parte de este trabajo en sus instalaciones.

A todos los chicos del laboratorio 17 del CINEVSTAV sur por apoyarme, en especial a Isabel Beltrán por todo lo que me enseñaste, por tu amistad y complicidad.

A la Dra. Mavil, por darme las facilidades y confianza de trabajar en tu laboratorio y por la orientación y amistad que siempre encontraba en ti, gracias!!!

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Análisis de ADN, Mariana, Karla, Lucy, me hicieron la estancia divertida y acogedora.

A todos los chicos de los laboratorios de genómicas, fue un placer conocerlos y trabajar con ustedes (en especial a Helios y a Olga ...gracias).

A la Dra. Patricia Ostrosky, por la disposición de ayudarme, Paty Men, gracias por tu apoyo y amistad.

A la Dra. Patricia De Gortari, y al Dr. Hernández Pando, que me abrieron su laboratorio y me permitieron aprender.

A mi familia, a mis padres Rosa María Mendoza y Fernando Genis, a mi hermano Fernando, a mis abuelos, tíos, primos. Por la confianza, amor, apoyo y constancia que siempre me han mostrado, el esfuerzo lo realizamos juntos, sin ustedes no lo hubiese logrado... mil gracias, los quiero mucho!!!!.

A mis amigos de generación, que seguimos juntos a pesar de los pesares, Nona, Vero, Mauro, Elvis, Paty, Bety, Carlitos, fueron y siguen siendo, mi apoyo en los días de frustración académica.

A los amigos que encontré en este andar, Manuelito, Lilia, Sandra, Enrique, Mauricio Cuartas, Yaumara, Alan, Andrea, Ileana, Azucena, Mirna, Oscar... Gracias!!!, se que seguiremos caminando juntos.

A mis amigos de toda la vida, Paty, Sonia, Luisa, Ivonne, Vero, gracias por estar siempre al pendiente.

A Caty, Viviana y Lulú, gracias por estar siempre dispuestas a ayudar.

A Alfonso[†]. En su recuerdo.

A los que me faltaron y no mencioné por mi Alzheimer juvenil.... mil Gracias!!!!

CONTENIDO	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
1 ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA	10
1.1 ESQUIZOFRENIA	10
1.2 MODELOS ANIMALES	11
1.2.1 Modelos farmacológicos de esquizofrenia	13
1.2.2 Modelos genéticos de esquizofrenia	13
1.2.3 Modelos de neurodesarrollo de esquizofrenia	14
2 ESTADO DEL ARTE	15
2.1 GENETICA DE LA ESQUIZOFRENIA	15
2.2 HIPÓTESIS ETIOLÓGICAS DE LA ESQUIZOFRENIA	16
2.3 ESQUIZOFRENIA Y DOPAMINA	17
2.4 ÁREAS CEREBRALES RELACIONADAS CON LA ESQUIZOFRENIA	19
3 ANTECEDENTES PARTICULARES DEL TEMA	21
3.1 GENÉTICA Y EXPRESIÓN DE DOPAMINA EN ESQUIZOFRENIA	21
3.2 MODELO DE LESIÓN NEONATAL EN HIPOCAMPO VENTRAL (LNHV)	22
4. JUSTIFICACIÓN	26
5. HIPÓTESIS	26
6 OBJETIVOS	27
6.1 OBJETIVO GENERAL	27
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES	27

7 METODOLOGÍA	28
7.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
7.2 SUJETOS EXPERIMENTALES	29
7.3 LESIÓN NEONATAL EN HIPOCAMPO VENTRAL	29
7.4 PRUEBAS CONDUCTUALES	30
7.4.1 Prueba de coordinación motora	30
7.4.2 Campo abierto	31
7.4.3 Reconocimiento de objetos	31
7.4.4 Interacción social	33
7.4.5 inhibición de prepulso	33
7.4.6 Nado forzado	34
7.4.7 Enterramiento defensivo	34
7.4.8 Plancha caliente	35
7.5 Verificación de la lesión	
7.6 CUANTIFICACIÓN DE DOPAMINA	36
7.7 ENSAYOS DE EXPRESIÓN DE <i>drd2</i> Y <i>drd3</i>	36
7.7.1 Extracción de RNA total	37
7.7.2 Cuantificación de RNA total	37
7.7.3 Síntesis de ADNc	38
7.7.4 Ensayos de expresión de <i>drd2</i> y <i>drd3</i>	38
7.8 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EL MODELO DE LESIÓN NEONATAL EN HIPOCAMPO VENTRAL MEDIANTE MICROARREGLOS DE ADN	38
7.8.1 Impresión de las matrices	38
7.8.2 Marcaje del ADNc e hibridación de los microarreglos de ADN	39
7.8.3 Lectura del microarreglo	39

8 RESULTADOS	41
8.1 EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA EN EL MODELO DE LESIÓN NEONATAL EN HIPOCAMPO VENTRAL	41
8.2 VERIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LA LESIÓN NEONATAL EN HIPOCAMPO VENTRAL	49
8.3 EVALUACIÓN DE NIVELES DE DOPAMINA DEL MODELO DE LNHV	51
8.4 EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE <i>drd2</i> Y <i>drd3</i>	52
8.5 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE MICROAREGLOS	58
9 DISCUSIÓN	65
9.1 PARÁMETROS CONDUCTUALES	66
9.2 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA	74
9.3 EVALUACIÓN DE NIVELES DE DOPAMINA (NEUROQUÍMICA)	75
9.4 EXPRESIÓN DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS	77
9.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EL MODELO DE LESIÓN NEONATAL EN HIPOCAMPO VENTRAL MEDIANTE MICROARREGLOS DE ADN	81
10 CONCLUSIONES	88
11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89
12 ANEXO 1: ÉTICA EN EL MANEJO DE ANIMALES DE LABORATORIO	101
13 ANEXO 3: ARTÍCULOS PUBLICADOS	104
14 ANEXO 4: PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS INTERNACIONALES	117
15 ANEXO 5: PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS NACIONALES	118

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características de los microarreglos de expresión de ADN	39
Tabla 2. Resultados estadísticos de las pruebas conductuales, efecto de la interacción de la edad y grupo.	41
Tabla 3. Resultados estadísticos de las pruebas conductuales.	42
Tabla 4. El comportamiento de enterramiento defensivo y nado forzado en el grupo de animales juveniles y adultos lesionados en hipocampo ventral	47
Tabla 5. Nocicepción en los grupos de ratas juveniles y adultos, lesionadas en hipocampo neonatal en el día postnatal (EP 7), en comparación con sus controles.	48
Tabla 6: Niveles de dopamina en <i>hipocampo, corteza, núcleo acumbens</i> , y estriado en el grupo de ratas juveniles	51
Tabla 7: Niveles de dopamina en <i>hipocampo, corteza, núcleo acumbens</i> , y estriado en el grupo de ratas adultas.	52
Tabla 8. Resultados globales de la expresión en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral mediante microarreglos de ADN.	58
Tabla 9. Descripción de los genes propuestos como candidatos a partir del análisis del transcriptoma de los modelos de lesión neonatal en hipocampo ventral.	63
Tabla 10. Evaluación de la locomoción en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral.	61
Tabla 11. Evaluación de memoria en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral.	68
Tabla 12. Evaluación de interacción social en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral.	70
Tabla 13. Evaluación de inhibición de prepulso en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral.	72
Tabla 14. Evaluación de la expresión de receptores dopaminérgicos en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral.	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo del trabajo experimental de este proyecto.	28
Figura 2. Prueba de campo abierto.	43
Figura 3: Reconocimiento de objetos.	44
Figura 4. Interacción social	45
Figura 5: Inhibición de prepulso.	46
Figura 6. Verificación de la lesión neonatal en hipocampo ventral en ratas juveniles y adultas.	50
Figura 7. Niveles de expresión del gen <i>drd2</i> en los linfocitos de los grupos ratas juveniles y adultos	53
Figura 8. Niveles de expresión del gen <i>drd3</i> en los linfocitos de los grupos ratas juveniles y adultos	54
Figura 9. Niveles de expresión de los genes <i>drd2</i> y <i>drd3</i> en hipocampo en el grupo de animales juveniles y adultos	55
Figura 10. Niveles de expresión de los genes <i>drd2</i> y <i>drd3</i> en corteza prefrontal en el grupo de animales juveniles y adultos	56
Figura 11. Niveles de expresión de los genes <i>drd2</i> y <i>drd3</i> en núcleo <i>acumbens</i> en el grupo de animales juveniles y adultos	57
Figura 12. Regulación de la expresión mediante microarreglos por área evaluada.	59
Figura 13. Rutas metabólicas de interés diferencialmente expresadas en el grupo de ratas juveniles.	60
Figura 14. Rutas metabólicas de interés diferencialmente expresadas en el grupo de ratas adultas.	61
Figura15. Genes diferencialmente expresados en las rutas de interés.	62

1 ANTECEDENTES GENERALES DEL TEMA

1.1 ESQUIZOFRENIA

La esquizofrenia es una de las enfermedades mentales con más alto costo para la sociedad, se encuentra en el 1% de la población mundial y por lo general se desarrolla en la etapa reproductiva del individuo, entre los 15 y 20 años de edad incidiendo en éste, durante toda su vida (Szoke., 2013). La esquizofrenia es una de las patologías donde más claramente se ha establecido una vulnerabilidad genética, con una heredabilidad mayor al 80%. Aunque su etiología aún es discutida, se han propuesto diversas teorías, como la dopaminérgica, de neurodesarrollo y de factores ambientales asociados (Ochoa y cols., 2012).

Los síntomas de la esquizofrenia, se dividen en positivos, negativos y cognitivos (Poreh y cols., 1994). Los síntomas “positivos” reflejan un exceso o distorsión en el comportamiento, se relacionan con la pérdida de contacto con la realidad, lo cual se manifiesta con la presencia de creencias falsas (delirios) y experiencias perceptuales no experimentadas por otros (alucinaciones). Los delirios más comunes que presentan los pacientes con esquizofrenia son: de persecución, de control y de grandiosidad. Las alucinaciones también se presentan de diferentes tipos: visuales, auditivas, olfativas, gustativas y táctiles, siendo las más comunes las auditivas (Jablensky y cols., 1999).

Por otro lado, los síntomas negativos reflejan una disminución o pérdida de funcionamiento “normal”, corresponden a un estado de déficit; el término es utilizado para describir una reducción en conducta del paciente relacionada a un comportamiento hipotéticamente “normal”. Cuando se presentan los síntomas negativos las emociones básicas y los procesos conductuales están disminuidos o ausentes, lo que se manifiesta como un empobrecimiento o disminución del pensamiento, de la afectividad, de la conducta y del lenguaje en el paciente (Poreh y cols., 1994, Jablensky y cols., 1999).

1.2 MODELOS ANIMALES

En el terreno de la neurología como en el de los trastornos del ánimo o en procesos cognitivos, la aproximación biológica al conocimiento de los mecanismos neuronales utiliza múltiples modelos animales como analogías experimentales de dichas enfermedades.

La creación y empleo de modelos animales en psiquiatría tiene claras limitaciones, ya que se trata de reproducir en un animal sano, conductas y alteraciones humanas complejas. No obstante, los modelos animales de trastornos psiquiátricos han permitido explorar el potencial terapéutico de medicamentos específicos, siendo también herramientas valiosas en el estudio de los trastornos psiquiátricos (Martínez-Mota y cols., 2008)

Los modelos animales de los trastornos psiquiátricos tradicionalmente han sido útiles para los siguientes propósitos (Porsolt y cols., 1977):

1. Detectar el potencial terapéutico de fármacos específicos para el tratamiento de los desordenes.
2. Proporcionar datos relevantes acerca de los mecanismos de acción de dichos fármacos.
3. Constituir una herramienta para la determinación de los sustratos neurobiológicos en los desordenes psiquiátricos.

La contribución de los modelos animales a la neurobiología de los trastornos psiquiátricos depende de su validez, por lo que se propone que los modelos animales cumplan con los siguientes criterios (Willner y cols., 1994):

1. Criterio de validez predictiva, implica que los fármacos que modifican el estado patológico en los humanos también deben hacerlo en el modelo animal, cubriendo los requisitos de sensibilidad, selectividad y potencia relativa.
2. Criterio de validez de apariencia, se refiere a la similitud fenomenológica entre el modelo y el desorden estudiado, se propone que el modelo debe de mostrar los síntomas más representativos del desorden.

3. Criterio de validez de constructo o validez hipotética, este criterio establece que la hipótesis que explica el trastorno psiquiátrico también debe servir como fundamento del modelo.

Se han propuesto varios modelos animales para el estudio de los trastornos psiquiátricos, como el Trastorno Obsesivo Compulsivo (TOC), los trastornos de la conducta alimentaria, la depresión, la esquizofrenia, entre otros.

Por ejemplo, los modelos animales de TOC, han ayudado a predecir la eficacia de los medicamentos (Kreiss y cols., 2013), así como la regulación e implicación de algunas moléculas blanco, como algunos receptores de glutamato (Fineberg y cols., 2011; Wu y cols., 2013). Los modelos animales propuestos para los trastornos de la conducta alimentaria son una herramienta esencial en la investigación de estos comportamientos y sus formas patológicas, sin embargo, el desarrollo de un modelo animal adecuado para estos trastornos sigue siendo difícil debido al conocimiento limitado de la regulación molecular del trastorno (Kim y cols., 2012). En cuanto a los modelos animales utilizados para el estudio de la depresión, existen modelos de depresión bien fundamentados, como el modelo de nado forzado, el cual se usa para investigar la etiología y las bases moleculares de esta enfermedad (Liou y cols., 2012), estos modelos han ayudado a probar nuevos medicamentos o terapias con antidepresivos, previo a su ensayo en voluntarios sanos o en pacientes (Tye y cols., 2013).

Para el estudio de la esquizofrenia se han propuesto varios modelos animales los cuales pueden ser divididos en tres categorías: Los modelos farmacológicos, los modelos genéticos (inducidos por mutaciones o deleciones genéticas) y los modelos de neurodesarrollo (inducidos por una lesión física o neurotóxica y por factores ambientales durante el neurodesarrollo) (Rubinstein y cols., 1993, Lubow y cols., 2005, Rideout y cols., 2009, Young y cols., 2010).

1.2.1 Modelos farmacológicos de esquizofrenia

Generalmente para este grupo de modelos se utilizan fármacos que pueden inducir cuadros psicóticos en humanos sanos. Uno de los modelos más usados es el inducido por la administración sistémica de fenciclidina o de ketamina. Estos compuestos, al bloquear a los receptores N-metil D-aspartato, estimulan la liberación de dopamina, principalmente en la vía mesolímbica, provocando una conducta de hiperlocomoción en el roedor, mediada posiblemente por el exceso de dopamina, misma que se ha relacionado con los síntomas positivos de la esquizofrenia (Borison y cols., 1977, Javitt y cols., 2012).

1.2.2 Modelos genéticos de esquizofrenia

La esquizofrenia es una enfermedad multifactorial con un evidente componente genético, se han asociado varios genes relacionados con los sistemas de neurotransmisión afectados en la enfermedad. También se ha propuesto que con la manipulación de estos genes (ya sea por delección o silenciamiento) se pueden obtener modelos animales que simulen la enfermedad.

Por ejemplo, se utilizaron ratones “knockout” deficientes de la proteína Nogo-A expresada en oligodendrocitos (proteína relacionada con esquizofrenia por su actividad en la mielinización y en el remodelamiento neuronal). La deficiencia de esta proteína provocó un fenotipo conductual similar a la esquizofrenia, ya que los animales no respondieron correctamente en la prueba de inhibición de prepulso, presentando déficits de memoria y de la interacción social (Weinmann y cols., 2006). De igual manera, varios modelos animales con manipulación genética, son utilizados en el estudio de la esquizofrenia (O'Tuathaigh y cols., 2010). Como es el caso del gen *reelin* que codifica para una glicoproteína secretada por neuronas GABAérgicas, por medio de la manipulación de este gen, se obtuvo un modelo animal de esquizofrenia, el cual se observó un decremento de aproximadamente el 50% en la expresión del RNAm en corteza e hipocampo, además de una baja expresión de la enzima GAD67 (enzima descarboxilasa 67 del glutamato), cuya expresión también se ha encontrado

disminuida en los pacientes (Pappas y cols., 2003). De la misma manera se han desarrollado ratones *knockout* para el gen *Disc1*, (este gen participa en la migración y remodelamiento neuronal y se ha asociado con la esquizofrenia), el roedor logra reproducir algunas de las características conductuales asociadas con la esquizofrenia (Haque y cols., 2012), igual que ratones modificados genéticamente para el gen *neuregulina-1* que codifica para una proteína relacionada con la migración y diferenciación neuronal (Desbonnet et al., 2012). Los genes *csmd1* y *tcf4* son genes de susceptibilidad (predisposición mayor a desarrollar la enfermedad), recientemente asociados con la esquizofrenia, han sido propuestos para la creación de ratones *knockout*, aunque los estudios poblacionales indicaban que estos genes podrían ser candidatos asociados a la enfermedad, en los modelos animales no se han conseguido reproducir las conductas relacionadas con la esquizofrenia (Brzózka y cols., 2010, Distler y cols., 2012).

1.2.3 Modelos de neurodesarrollo de esquizofrenia

Se ha sugerido que la esquizofrenia puede ser inducida por eventos o “lesiones” durante el desarrollo temprano del individuo, que traen como consecuencia una reducción en las conexiones neuronales en diferentes regiones cerebrales como la corteza prefrontal; así como una disminución de las sinapsis en sitios de proyección como el cíngulo, la corteza y el estriado ventral (Powell y cols., 2010). Basándose en esta idea, se han desarrollado modelos en los que se afecta el desarrollo del cerebro, ya sea durante la etapa prenatal o neonatal por lesiones mecánicas o químicas (Lipska y cols., 2000).

2 ESTADO DEL ARTE

2.1 GENÉTICA DE LA ESQUIZOFRENIA

La investigación de genes asociados con la esquizofrenia se ha desarrollado con múltiples estudios de “ligamiento” y “asociación”, estudios que manejan marcadores de ADN y que son utilizados para la búsqueda de genes que pudieran tener un papel importante en la susceptibilidad de la enfermedad.

Por ejemplo, los estudios de asociación de casos-contróles han ayudado a indagar el efecto de la variabilidad genética y la susceptibilidad de la esquizofrenia. Esta metodología tiene el objetivo de buscar genes asociados con la enfermedad, a la fecha en la literatura se hace referencia a aproximadamente 500 genes candidatos con asociación positiva o negativa para la esquizofrenia. Por ejemplo: existen varios polimorfismos asociados a los receptores dopaminérgicos, como el polimorfismo tipo VNTR del gen *DRD4*, el cual presenta mayor frecuencia de alelos largos en pacientes con esquizofrenia (Genis y cols., 2011). Otro ejemplo, es el haplotipo -250A/Ser9 del gen *DRD3*, este haplotipo de susceptibilidad se encontró con mayor frecuencia en pares de hermanos afectados con esquizofrenia (Urraca y cols., 2012). Recientemente estudios de asociación del genoma complejo gwas (del inglés; Genome-wide association studies) y de expresión génica por medio de microarreglos han mostrado nuevos genes candidatos que podrían estar involucrados en la esquizofrenia (Ng y cols., 2009; Woelk y cols., 2011).

Los estudios de ligamiento a lo largo del genoma (genome-wide) han ayudado a identificar varias regiones cromosomales que presentan ligamiento, en el meta-análisis más reciente, se proponen tres cromosomas con alelos y genes asociados: 1q (*NOS1AP*, *RGS4*, *UHMK1*), 8p (*PPP3CC* Y *NRG1*) y 2q (*ZNF804*) (Ng y cols., 2009). En el mismo sentido, recientemente analizamos el polimorfismo VNTR del gen *DRD4* en 60 familias con al menos un par de hermanos con esquizofrenia, en las familias seleccionadas de la Ciudad de México se encontró que, el polimorfismo puede estar etiológicamente asociado con la esquizofrenia (Genis y cols., 2011).

El uso de estas metodologías, nos demuestran lo complejo que es poder detectar genes etiológicos de la enfermedad, la falta de reproducibilidad de los

resultados en estos estudios no permite asociar de manera consistente un gen con la esquizofrenia.

Otro abordaje para la búsqueda de genes candidatos han sido los estudios de expresión génica a partir de la técnica de microarreglos de ADN, una valiosa herramienta genómica que permite el abordaje de enfermedades complejas, que facilita la evaluación global de la expresión de un gran número de genes en diferentes tejidos y/o condiciones fisiológicas, para determinar la expresión de genes en todo el genoma. En el mismo sentido, también se ha estudiado la expresión génica individual de genes de interés relacionados con la esquizofrenia con técnicas como el RT-PCR y PCR tiempo real; sin embargo, los estudios son pocos e inconsistentes por lo que es necesario analizar más a fondo la regulación de los genes que han sido asociados con esta enfermedad.

Debido a esto, y en la búsqueda de los genes responsables de las enfermedades complejas, se ha buscado reproducir estas enfermedades en modelos animales, con la ventaja de poder trabajar directamente con el cerebro del animal como órgano blanco.

2.2 HIPÓTESIS ETIOLÓGICAS DE LA ESQUIZOFRENIA

La esquizofrenia se ha tratado de explicar mediante varias hipótesis que plantean disfunción metabólica en diferentes sistemas de neurotransmisión (neuroquímica), así como alteraciones estructurales en el sistema nervioso central, resultado de anomalías en el desarrollo temprano del cerebro (neurodesarrollo) o por factores de riesgo de tipo ambiental (por ejemplo, en los casos donde la madre, durante el segundo trimestre de gestación fue expuesta a virus de influenza y de rubiola, a malnutrición, diabetes, tabaco o drogas de abuso), aumentando así el riesgo de complicaciones obstétricas y lesiones cerebrales en el feto, aunado a una heredabilidad genética mayor al 80%.

Recientemente se ha planteado que la esquizofrenia es un problema de neurodesarrollo genéticamente programado, que afecta la migración neuronal y varios de los sistemas de neurotransmisión, alterando genes y vías metabólicas. Es importante recordar que el neurodesarrollo no termina con el nacimiento, sino que

continúa a lo largo de la vida, aunque su extensión y características probablemente varían de etapa en etapa (Kirkbride y cols., 2012).

Se propone que, el individuo con esquizofrenia tiene un neurodesarrollo anormal, o de susceptibilidad a la enfermedad, al ser portador de variantes o *locus* heredados asociados a la esquizofrenia; y que si además, si en su gestación, éste fue afectado por algún patógeno o lesión, la respuesta neuroinflamatoria anormal impide la migración y diferenciación neuronal, haciéndolo más vulnerable a factores de estrés ambientales, que promueven la aparición de los síntomas de la esquizofrenia, principalmente durante la adolescencia (Walker y cols., 2002; Kirkbride y cols., 2012; Venkatasubramanian y cols., 2013).

2.3 ESQUIZOFRENIA Y DOPAMINA

La dopamina es uno de los neurotransmisores que más se han estudiado en relación con la esquizofrenia, pues algunos de sus receptores son blancos farmacológicos de los antipsicóticos, es decir, aquellos tratamientos utilizados en el manejo de la esquizofrenia.

Las neuronas dopaminérgicas se sitúan en varias regiones cerebrales y transmiten información de una región a otra, mediante los axones que recorren todo el trayecto de la vía hasta los distintos destinos sinápticos (Jaber y cols., 1996; Bahena-Trujillo y cols., 2000). La vía dopaminérgica mesolímbica (conexiones neuronales que se proyectan y comunican) comienza en el área tegmental ventral (VTA, por sus siglas en inglés) y se conecta con el sistema límbico. La vía mesolímbica participa en procesos de recompensa, como la respuesta conductual frente a estímulos de gratificación emocional y motivación. Se considera que el incremento en la actividad de la vía mesolímbica puede causar los síntomas positivos de la esquizofrenia (Jaber y cols., 1996, Bahena-Trujillo y cols., 2000). Los receptores a dopamina están asociados con la etiopatogenia de varios padecimientos psiquiátricos, como la esquizofrenia, el trastorno bipolar y la depresión, entre otros.

Se han identificado cinco receptores a dopamina (D1, D2, D3, D4, D5), los receptores D1 y D5 pertenecen a la familia D1 y los receptores D2, D3 y D4,

pertenecen a la familia D2; algunos receptores como el DRD2, el DRD3 y el DRD4 han sido identificados como blancos terapéuticos para el tratamiento de algunas enfermedades mentales como la esquizofrenia.

Los receptores DRD2 se localizan, principalmente en el núcleo *acumbens*, en el estriado, en terminales dopaminérgicas, dendritas y en el soma. El gen *DRD2* está compuesto por 7 exones y 6 intrones, codifica para una proteína transmembranal, localizada en el cromosoma 11q23. Se han identificado diferentes isoformas producidas por *splicing* alternativo a este gen, la isoforma pequeña tiene la función de regular la liberación de dopamina (autoreceptor). A este receptor se le ha asociado con trastornos mentales como la esquizofrenia (Serreti y cols., 2004) y el desorden obsesivo compulsivo en pacientes mexicanos (Nicolini y cols., 1996).

El receptor DRD3 está localizado en el área límbica, en amígdala, corteza parietal, núcleo *acumbens*, y estriado (Sigala y cols., 1998). Se distribuye principalmente en corteza parietal y temporal. El gen está formado por 5 intrones y 6 exones, se localiza en el cromosoma 3q13.3, regulado por GTP. El polimorfismo ser9gly del gen *DRD3* ha sido ampliamente asociado con la esquizofrenia por medio de estudios de asociación, así como también en estudios de expresión génica (Ilani y cols., 2001; Urraca y cols., 2011).

El gen *DRD4* fue clonado y mapeado en el brazo corto del cromosoma 11 (11p15.5), está constituido por 4 exones y 3 intrones. La secuencia nucleotídica presenta regiones polimórficas tipo VNTR y SNP, en distintas regiones del gen, como en el promotor y en los exones 1 y 3 (Van Tol y cols., 1992). En la secuencia del exon III se encuentra una región polimórfica tipo VNTR con unidades de 48 pares de bases, estas pueden estar repetidas de 2 a 11 unidades (Van Tol y cols., 1992; Franke y cols., 2000). Este polimorfismo ha sido uno de los más estudiados ya que forma una asa citoplasmática en donde el receptor se une a la proteína Gi para la inhibición de la adenilato ciclasa. Este receptor se ha asociado con trastornos psiquiátricos, como la esquizofrenia, el desorden obsesivo compulsivo, el Parkinson, y el trastorno de déficit por atención.

2.4 ÁREAS CEREBRALES RELACIONADAS CON LA ESQUIZOFRENIA

Se han descrito algunas áreas cerebrales que se ven afectadas mayoritariamente en la esquizofrenia, como las que a continuación se describen:

El núcleo *accumbens* es un componente del estriado ventral y está conectado al núcleo caudado y putamen. Se compone de neuronas espinosas medianas que reciben información de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral. La liberación de dopamina en esta estructura regula al sistema mesolímbico que participa en procesos de respuesta conductual frente a estímulos de gratificación emocional y motivación; en la esquizofrenia estos estados de ánimo se ven afectados (síntomas negativos) (Patestas y cols., 2008).

La amígdala es un grupo de núcleos en forma de almendra localizados justo debajo de la corteza del polo medial anterior de cada lóbulo temporal, cada uno tiene conexiones y funciones diferentes. Tiene abundantes conexiones bidireccionales con el hipotálamo, así como con otras áreas del sistema límbico. Se ha asociado con la asignación de las emociones, especialmente el miedo y la ansiedad (Patestas y cols., 2008). Por medio de estudios de imágenes, se ha determinado que en pacientes con esquizofrenia el tamaño de la amígdala es discretamente más pequeño respecto a controles sanos (Mahon y cols., 2012).

El hipocampo está ubicado en la porción medial del lóbulo temporal, se extiende anterior a la amígdala y luego se estrecha conforme cruza de manera posterior la superficie inferior del cuerpo calloso. El hipocampo (y las estructuras contiguas del lóbulo temporal, denominadas en conjunto formación hipocámpica) posee numerosas conexiones con muchas porciones de la corteza cerebral, así como las estructuras basales del sistema límbico. Es conocido también por su asociación con la memoria y el aprendizaje (Patestas y cols., 2008), funciones que se encuentran mermadas en la esquizofrenia.

La corteza prefrontal es la parte anterior de los lóbulos frontales del cerebro, y se ubica frente a las áreas motora y pre-motora. Esta región cerebral está involucrada en la planificación de comportamientos cognitivamente complejos, en la expresión de la personalidad, en los procesos de toma de decisiones y en la adecuación del comportamiento social. Se considera que la actividad fundamental

de esta región cerebral es la coordinación de pensamientos y acciones de acuerdo con metas internas. La corteza prefrontal es una de las áreas más afectadas en esquizofrenia, pues el paciente presenta decremento de actividad cognitiva en varios dominios cognitivos, como en memoria inmediata o en funciones ejecutivas (Harvey y cols., 2001).

3 ANTECEDENTES PARTICULARES DEL TEMA

3.1 GENÉTICA Y EXPRESIÓN DE DOPAMINA EN ESQUIZOFRENIA

El estudio tradicional de la esquizofrenia en humanos abarca estudios en gemelos (Petronis y cols., 2003; Bönsch y cols., 2012), en individuos dados en adopción (Wicks y cols., 2010) y en familias; estos estudios han presentado evidencias de la existencia de un componente genético en la etiología de la enfermedad, sin embargo, al buscar *locus* que pudieran estar participando en la etiología mediante estudios de ligamiento, los estudios son poco consistentes (Escamilla y cols., 2009; Ng y cols., 2011; Genis y cols., 2012). Por lo cual, la búsqueda de genes candidatos para el desarrollo de la esquizofrenia, se ha centrado en genes que quizá están relacionados con alguna dimensión de la enfermedad o características clínicas (endofenotipos) como la gravedad de los síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia (Glahn y cols., 2010).

La mayoría de los estudios reportados a la fecha son del tipo casos-controles (Fanous y cols., 2012; Xu y cols., 2013), este tipo de estudios permite observar si un alelo está asociado o no con la enfermedad, sin embargo estos estudios presentan algunas limitaciones, como la necesidad de grandes tamaños de muestra, y la estratificación poblacional, por lo que es necesario utilizar nuevas metodologías, que ayuden a seguir estudiando las bases moleculares de la esquizofrenia y poder proponer un biomarcador de la enfermedad. Una de la técnicas propuestas para esto, es el estudio de la expresión genética a través de diferentes técnicas, como PCR punto final, PCR tiempo real y microarreglos de expresión en modelos animales.

El uso de microarreglos de expresión génica para la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico para los trastornos neuropsiquiátricos, es todavía un reto. Sin embargo, recientemente una revisión de los estudios que han analizado la expresión génica en las células de sangre de pacientes con trastornos neuropsiquiátricos aceptó la factibilidad de generar un marcador de diagnóstico para la esquizofrenia a través de esta metodología (Woelk y cols., 2011; Chen y cols., 2013).

El estudio de la expresión de los receptores dopaminérgicos en pacientes con esquizofrenia ha sido poco estudiado, por la dificultad inherente al acceso al tejido de estudio (el cerebro), sin embargo, estudios *postmortem* de pacientes tratados con antipsicóticos han revelado que existe mayor abundancia de receptores D2, a diferencia de controles sanos no tratados (Barbanti y cols., 2000). En otro trabajo se reporta que la expresión de los receptores D3 y D2 disminuye en áreas límbicas de pacientes con esquizofrenia (Zhang y cols., 2007).

Se han tratado de utilizar otros tejidos para el estudio de la expresión génica, como el sanguíneo, pero a pesar de que la relación comparativa entre las células de la sangre periférica y de los tejidos cerebrales todavía es polémica, algunos investigadores han descrito datos experimentales a favor de este paralelismo como una posibilidad para el estudio de los trastornos neuropsiquiátricos (Zvara y cols., 2005; Kurian y cols., 2011). Se han documentado varios estudios en linfocitos de pacientes de origen húngaro con esquizofrenia, donde se encontró sobreexpresión del gen *DRD2* (Zvara y cols., 2005; Kurian y cols., 2011). También el ARNm del gen *DRD3* se encontró subexpresado en pacientes esquizofrénicos de diferentes poblaciones (española, alemana, suiza e israelí) (Tallerico y cols., 2001; Känzig y cols., 2001; Ilani y cols., 2001; Vogel y cols., 2004; Padín y cols., 2006). Recientemente Kawano y colaboradores compararon la expresión de los genes de los receptores *DRD3* y *DRD4* en pacientes con esquizofrenia, pero no encontraron diferencias (Kawano y cols., 2012).

3.2 MODELO DE LESIÓN NEONATAL EN HIPOCAMPO VENTRAL (LNHV)

El modelo de lesión en el hipocampo ventral en neonatos fue propuesto y probado por Lipska y colaboradores en 1995, en este modelo se reproducen algunas características, relacionadas con los síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia como la inhibición del prepulso sensorial, la hiperlocomoción, el déficit de memoria y el decremento en interacción social, comparados con algunos de los síntomas en pacientes con esquizofrenia (Lillrank y cols., 1995; Lipska y cols., 2000).

El modelo de Lesión Neonatal en Hipocampo Ventral (LNHV), fue validado en el año 2000, mostrando que cumple con los tres criterios más importantes a saber en modelos animales:

a) Validez predictiva: Se han realizado varios trabajos, para comprobar la irreversibilidad del modelo, se les han aplicado fármacos como anfetaminas para exacerbar su conducta, revirtiendo los déficits al aplicar antipsicóticos, con los que se comprueba la reversibilidad del modelo

b) Validez de apariencia: Se observan algunos síntomas positivos (hiperlocomoción) y negativos (decremento en interacción social), así como deficiencia en la filtración de las percepciones por medio de la inhibición del prepulso sensorial, y deterioro en la memoria.

c) Validez hipotética: El modelo está sustentado sobre la hipótesis del neurodesarrollo, mostrando que el daño provocado en las primeras etapas de vida (estado neonato) puede afectar la conducta del individuo a largo plazo (Lipska y cols., 2000).

El modelo de LNHV se induce por una lesión excitotóxica en el hipocampo de ratas neonatas, dando oportunidad a su posterior maduración. Se ha observado que en la etapa adulta, los animales lesionados presentan conductas relacionadas con los síntomas positivos y negativos de la enfermedad, como es el caso de la hiperlocomoción, la reducción en la inhibición por prepulso, el déficit de memoria y el decremento en la interacción social, entre otras (Le Pen y cols., 2000).

Como se mencionó anteriormente, el modelo de LNHV está basado en la hipótesis del neurodesarrollo, postulando que, en la esquizofrenia la migración neuronal está alterada en el segundo trimestre de gestación (primeros días neonatales en roedores), afectando varios de los sistemas de neurotransmisión relacionados en esquizofrenia (Lipska y cols., 2000). Se sabe que normalmente la migración neuronal y la formación dendrítica y sináptica comienza en el segundo

trimestre de gestación y que continúa a lo largo de la niñez, hasta finales de la adolescencia.

El modelo de LNHV tiene la ventaja de no utilizar fármacos, como en la mayoría de los modelos utilizados en el estudio de la esquizofrenia y psicosis, por el contrario se induce con una pequeña lesión excitotóxica (afectando cualquier tipo celular) en el cerebro inmaduro y neuroplástico de los animales, dando oportunidad a su posterior maduración y re-acomodo (Lipska y cols., 2000, Genis y cols., 2011)

Dada la dificultad de estudiar pacientes, el estudio de la expresión de los receptores a dopamina en modelos animales es más reciente, en modelos animales de psicosis inducidos con endocannabinoides se reportó que no hay cambios en los niveles de expresión del receptor D2 (Malone y cols., 2007). En animales a los que se les administró anfetaminas, ketamina o cocaína para simular la esquizofrenia, se observó un incremento de la expresión del receptor D1 (Borowski., 1998, Seeman y cols., 2007), Con respecto a la expresión de estos receptores en el modelo animal de LNHV, Flores y colaboradores realizaron un estudio de expresión de receptores dopaminérgicos (D1,D2 y D3) por medio de autoradiografía a los 41 días de edad en el modelo animal de LNHV y no observaron cambios en la expresión de esas proteínas (Flores el al., 1996). El-rawas y cols, evaluaron la expresión de D2 por medio de inmunohistoquímica en varias regiones cerebrales, pero sólo observaron sobre-expresión a los 35 días en el núcleo putamen, y sub-expresión a los 65 días de edad (El-rawas y cols., 2009). Por lo que aun existe un campo importante de estudio, la expresión de los genes dopaminérgicos y la búsqueda de nuevos marcadores mediante otras técnicas moleculares usando modelos animales con características que simulen la enfermedad.

Por otro lado, la investigación de la esquizofrenia en modelos animales se ha beneficiado con el estudio de la conducta animal, ya que las herramientas están disponibles para medir y evaluar cualitativamente y cuantitativamente el comportamiento con la atención y el detalle necesario, así como para la

evaluación de áreas y estructuras que en los pacientes se dificultaría estudiar, como en el análisis del cerebro.

El modelo animal de LNHV se basa en hipótesis del neurodesarrollo, probablemente la lesión temprana simule el proceso de la enfermedad produciendo características similares a las que se encuentran en los pacientes (Lillrank y cols., 1995), por lo que es un modelo ideal para estudiar características conductuales, moleculares y genómicas asociadas con la esquizofrenia.

4. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que se han reportado varios genes asociados a la esquizofrenia, los trabajos no son del todo concluyentes debido a la dificultad de replica poblacional o a la dificultad para obtener suficientes muestras del órgano blanco (cerebro humano). Los modelos animales nos permiten realizar estudios farmacéuticos, conductuales y genómicos en donde es posible efectuar la búsqueda de genes candidatos en las enfermedades que modelan utilizando el cerebro como órgano principal de estudio (Dean y cols., 2004, Levine y cols., 2005, Torrey y cols., 2005).

Dado que el modelo animal con lesión neonatal en hipocampo ventral (LNHV) presenta características conductuales parecidas a la esquizofrenia, tales como reducción en la sociabilidad y en la memoria, proponemos que este modelo sería, un candidato experimental para observar las alteraciones moleculares, como la expresión génica, tanto a nivel periférico como en el sistema nervioso central. Por lo que, si en los animales con LNHV es posible observar la regulación de la expresión de algunos genes en el cerebro, entonces a través del estudio con este modelo, se podrá proponer nuevos genes candidatos para la esquizofrenia, que podrán ser corroborados mediante las técnicas de expresión, asociación o mapeo mediante *linkage* en humanos.

5 HIPÓTESIS:

Los animales con lesión neonatal en el hipocampo ventral presentarán diferencias dependientes de la edad en las conductas tipo esquizofrenia y cambios en los niveles de dopamina y de expresión génica en diferentes áreas cerebrales.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL:

Estudiar los efectos de la LNHV sobre la conducta, los niveles de dopamina y la expresión génica en ratas Wistar de 45 y 90 días.

6.2 Objetivos particulares:

- 1.- Realizar un análisis comparativo del efecto de la lesión neonatal en hipocampo ventral (LNHV) sobre el comportamiento de ratas macho, de 45 y 90 días.
- 2.- Cuantificar la concentración de dopamina en hipocampo, corteza prefrontal, hipotálamo, estriado y núcleo *acumbens* de ratas con LNHV de 45 y 90 días y sus posibles implicaciones en esquizofrenia.
- 3.- Comparar los niveles de expresión génica del ARNm de *drd2* y *drd3* en hipocampo, corteza prefrontal y núcleo *acumbens* de ratas con LNHV de 45 y 90 días.
- 4.- Obtener y comparar los perfiles de expresión génica del hipocampo, la corteza prefrontal y el núcleo *acumbens* de ratas macho con LNHV, de 45 y 90 días mediante microarreglos.

7 METODOLOGÍA:

7.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:

En el presente trabajo se estandarizó el modelo animal de esquizofrenia por lesión neonatal en el hipocampo ventral (LNHV). Una vez lesionados los animales se sometieron a pruebas conductuales y bioquímicas en las etapas juvenil y adulta (45 y 90 días de edad, respectivamente). Estos animales fueron comparados con un grupo falsamente lesionado (grupo “*sham*”) y uno sin manipulación (grupo “*naïve*”).

Los grupos experimentales se subdividieron para los siguientes estudios: a) análisis conductual; b) obtención de tejido cerebral y medición de niveles de dopamina mediante la técnica de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en varias regiones cerebrales; c) verificación de la lesión en animales jóvenes y adultos; d) extracción de tejido cerebral para la evaluación de los perfiles de expresión génica mediante PCR-tiempo real y microarreglos. En el siguiente esquema se presenta el diagrama de flujo seguido en el presente trabajo.

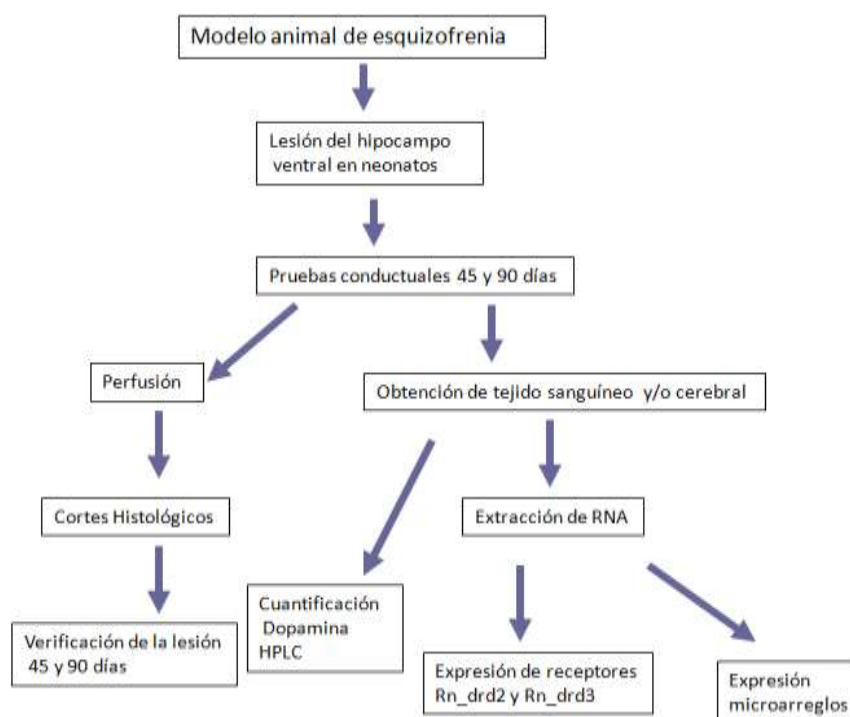


Figura 1. Diagrama de flujo del trabajo experimental de este proyecto

7.2 SUJETOS EXPERIMENTALES

Se trabajó con ratas Wistar preñadas, colocadas individualmente en cajas de acrílico (27 x 33 x 16 cm), con libre acceso al alimento y agua. El bioterio de estancia se mantuvo en un ciclo de luz-oscuridad invertido (12 x 12 horas, la luz fue encendida a las 10:00 PM). El manejo de los animales se llevó a cabo según la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, para el cuidado de los animales de laboratorio (anexo 2).

7.3 LESIÓN NEONATAL EN HIPOCAMPO VENTRAL (LNHV)

Después del nacimiento de las crías se formaron camadas con tres o cuatro machos cada una, y entre los días postnatales 5 al 7, cada cría (de un peso aproximado de 15-17g) se asignó aleatoriamente a uno de los siguientes grupos: a) grupo de ratas falsamente lesionadas o “*sham*”, b) grupo de ratas con lesión de hipocampo ventral y c) grupo “*naïve*” ratas sin manipulación (como control de los grupos *sham* y lesionados).

Lesión del Hipocampo ventral: Las crías de 5-7 días de nacidos fueron anestesiadas por hipotermia colocándolas en hielo por 12 a 15 minutos. Posteriormente, se colocaron en un estereotáxico con un adaptador especial para animales neonatos; a cada cría se le realizó una incisión en la piel del cráneo y se le administró 0.3 µl de ácido iboténico (disuelto en buffer de fosfatos 0.1M, pH 7.4) directamente en el hipocampo ventral en un periodo de 2 minutos, con una cánula de acero inoxidable de 30-ga de grosor. Las coordenadas del hipocampo ventral, de acuerdo con el atlas de Paxinos y Watson (1997): antero-posterior (AP)-2.0 mm, mediolateral (ML) $\pm$ 2.5 mm relativo a bregma y ventrodorsal (VD) -3.3 mm de la duramadre. Posteriormente los animales se suturaron con hilo quirúrgico e inmediatamente se pusieron bajo el calor indirecto de una lámpara (40w) hasta la recuperación de su temperatura corporal. Posteriormente, los animales se regresaron con sus respectivas madres hasta el momento del destete a los 21 días de edad.

La evaluaciones se realizaron entre los 45 días de nacidos, precisamente al inicio de la etapa puberal, en ratas macho se presenta entre los 40 y 45 días (juveniles) y a los 90 días de nacidos, cuando los animales llegan a la etapa adulta (adultos) (Knobil y cols., 2008). Se trabajaron estas edades porque en los pacientes con esquizofrenia, los síntomas se empiezan a manifestar en la adolescencia, consolidándose hasta la etapa adulta (DSM-IV-R., 2000).

7.4 PRUEBAS CONDUCTUALES

Cuando los animales cumplieron 45 y 90 días de nacidos se realizaron las pruebas conductuales, en el siguiente orden: prueba de coordinación motora, prueba de campo abierto, prueba de reconocimiento de objetos, prueba de inhibición de prepulso, prueba de enterramiento defensivo, prueba de nado forzado, prueba de interacción social y prueba de plancha caliente. Antes de iniciar con las pruebas, las ratas se aislaron (según requerimientos de las pruebas conductuales) durante 4 días en cajas individuales (34 x 16 x 24 cm) y al quinto día se iniciaron las pruebas que a continuación se describen.

7.4.1 Prueba de coordinación motora

Dado que al realizar la lesión neonatal, no teníamos la certeza de alterar centros motores, se decidió medir la coordinación motora de los animales lesionados *sham* y *naïve* mediante un equipo llamado rotarod. Este consiste en un rotor de 7 cm de diámetro girando a 11 rpm de velocidad. Los animales fueron puestos a caminar sobre estos cilindros durante 5 min. Previo a la prueba, se realizaron dos sesiones de entrenamiento de la misma duración. En la prueba se contaron el número de caídas del animal durante 5 min. (López-Rubalcava y cols., 1996). De tal modo, que si el animal permanecía caminando de forma coordinada en el cilindro en movimiento, se podría afirmar que el animal presentaba buena coordinación motriz y que seguiría con las siguientes evaluaciones.

7.4.2 Campo abierto

Para analizar la actividad locomotora, los animales se sometieron a la prueba de campo abierto. Las ratas se colocaron individualmente en una caja de acrílico (30 x 60 x 15 cm) con el piso dividido en 24 cuadrados. Se registró el número de veces que el animal entró en cada cuadro con las cuatro patas, por un período de 5 min. Las mediciones se realizaron en un ambiente de oscuridad, iluminado por una lámpara roja (para no perturbar al animal y permitir la observación), colocada por encima (aproximadamente a 70 cm.) del campo abierto. La prueba se grabó para su posterior registro (Barros y cols., 2006, Mello y cols., 2008). La prueba de campo abierto mide la locomoción del roedor, las alteraciones de la ambulación tienen relación con los síntomas positivos de la esquizofrenia (indicador de “schizophrenia-like behavior”) (Zendehrouh y cols., 2009), debido al aumento de dopamina, causante de las alucinaciones y delirios, por lo que esta prueba es la que más se ha medido en los diferentes modelos animales de esquizofrenia (Guo y cols., 2010; Sigurdsson y cols., 2010).

7.4.3 Reconocimiento de objetos

Esta prueba se basa en el comportamiento espontáneo de las ratas a explorar diferencialmente objetos familiares y nuevos (Ennaceur y Delacour, 1988), esta prueba se utiliza para estudiar memoria de trabajo y atención. La prueba se dividió en tres sesiones (la habituación, la familiarización, y las sesiones de retención) que se llevaron a cabo durante dos días consecutivos en un espacio libre de ruidos y en oscuridad con luz roja. La sesión de habituación es necesaria para que todos los animales se adapten al escenario experimental, para ello se colocó a la rata en la caja experimental (40 x 30 x 20 cm) sin ningún estímulo específico durante 15 minutos, 24 horas antes de la prueba.

En el segundo día, se llevó a cabo la sesión de familiarización, en este caso se colocó al animal en la caja de experimentación con la presencia de dos objetos idénticos (hechos de metal o madera, cilíndricos y cúbicos de 12 cm de altura por 6 cm de ancho). Los objetos fueron colocados en el centro del piso, los

animales exploraron los objetos libremente durante 10 minutos. Inmediatamente después de la sesión de familiarización, las ratas se retiraron de la caja; 60 minutos más tarde se realizó la sesión de retención para probar la memoria del animal. En este caso, uno de los objetos se cambió por un objeto nuevo y diferente. La rata se introdujo en la caja y se permitió que explorara libremente los objetos por diez minutos. Durante este tiempo se grabó la conducta del animal. Posteriormente se registró el tiempo de exploración (tiempo que pasan los animales explorando los objetos con la nariz y/o patas delanteras) para cada objeto. Para medir la función cognitiva se utilizó el índice de reconocimiento (RI), se dividió el tiempo de exploración del objeto nuevo por el tiempo total de exploración. El valor de $RI=0,5$ indica que los animales pasan una cantidad similar de tiempo explorando el objeto familiar y el objeto nuevo, mientras que si valores de RI es mayor a 0,5 indica preferencia de exploración del nuevo objeto (Huerta-Rivas y cols., 2012). La prueba de reconocimiento de objetos, mide la pérdida de memoria de trabajo (medida a través del tiempo de exploración de los objetos no familiares), característica frecuentemente descrita en la esquizofrenia (Casther y cols., 2004).

7.4.4 Interacción social

La prueba se realizó en un cilindro transparente de 70 cm de diámetro x 38 cm de altura colocado en piso de madera, en una habitación oscura. Sobre el cilindro se colocó una lámpara de luz blanca (22 watts), según parámetros de Flores y cols. Los animales se colocaron por parejas (un animal lesionado y uno control con pesos similares) y durante diez minutos se grabó la conducta con una cámara de video (marca Sony). Una vez terminada la prueba los animales regresaron al bioterio de estancia. En el video se registró el tiempo acumulado en que los animales presentaban contacto social. Se consideró interacción social activa a las siguientes conductas: montas, luchas, olfateo, e interacción lomo-abdomen (Silva-Gómez y cols., 2003; Flores y cols., 2005). Dado que la reducción de la Interacción social es uno de los síntomas negativos más representativos en la esquizofrenia, la prueba de interacción social mide el deterioro de la

sociabilidad de los animales, mediante la medición del tiempo acumulado de interacción.

7.4.5 inhibición de prepulso

La cámara de experimentación consiste en una caja oscura y sonoro-amortiguada que contiene un tubo de acrílico o inmovilizador (8,2 cm de diámetro, 22 cm de longitud) con un acelerómetro montado debajo del tubo. El acelerómetro está conectado a una computadora con un software especial que convierte la señal del acelerómetro en una señal digital. El animal se colocó en el inmovilizador cinco minutos antes de iniciar la pruebas (periodo de aclimatación), y por medio de la computadora se programaron los estímulos acústicos que se transmitieron a través de un altavoz colocado 10 cm por encima del tubo de acrílico. El ruido de fondo fue de 70 dB, después del periodo de aclimatación, da inicio la prueba con 6 ensayos que incluyen un estímulo sonoro de 120 dB de pulso (amplitud basal), y un pre-pulso, de 15 dB por encima del ruido de fondo. Los prepulsos siempre anteceden al estímulo de 120 dB por 100 ms. El intervalo entre cada ensayo fue de 10/37s. Después de las pruebas, los inmovilizadores se limpiaron con una solución de jabón suave antes de colocar al siguiente animal. La amplitud de sobresalto se calculó como el promedio de los 6 ensayos. El porcentaje de prepulso (PPI%), se calculó de la siguiente manera: $100 - (\text{amplitud de sobresalto} / \text{amplitud de sobresalto basal}) \times 100$. (Homberg y cols., 2011). La prueba de inhibición de prepulso, está asociada con anomalías en el procesamiento de la información, evalúa la capacidad de respuesta del individuo ante un estímulo auditivo, así como su procesamiento (Le pen y cols., 2002). De tal forma que esta prueba, representa las características conductuales asociadas a las alucinaciones auditivas en el animal con características tipo esquizofrenia con LNHV.

7.4.6 Nado forzado

Las sesiones de nado se llevaron a cabo en cilindros de vidrio individuales (46 cm X 20 cm) con agua tibia (23 a 25 ° C) y 30 cm de profundidad de tal forma que los animales no puedan tocar el fondo con sus patas. La prueba se realizó en dos sesiones, un entrenamiento inicial de 15 min y 24 horas más tarde se realizó una sesión de 5 minutos. Al terminar la prueba las ratas se retiraron de los cilindros, se secaron con toallas, y se colocan en cajas previamente calentadas durante 30 minutos, posteriormente las ratas se regresaron a sus respectivas cajas de estancia (Mostalac-preciado y cols., 2011). Cada sesión de nado fue video-grabada para su posterior análisis. El modelo de nado forzado, mide la desesperanza conductual en roedores, esta prueba fue aplicada en el modelo para evaluar la predisposición de adquirir esta conducta posterior a la lesión neonatal en hipocampo ventral; ya que la depresión no es una característica o síntoma presente en la esquizofrenia, se espera que no existan diferencias en la conducta tipo depresión entre lesionados y *naïve*.

7.4.7 Enterramiento defensivo

Esta prueba se realizó en un equipo de acrílico (34 x 16 x 24 cm). El equipo, contiene un electrodo de 7 cm de largo en un costado de la caja que emerge 2 cm por encima de una cama de aserrín fino. Cada vez que el animal toca el electrodo puede recibir una descarga eléctrica de 0.3 mA. Ya que la fuente del choque es un estímulo adverso, instintivamente el animal trata de esconder o enterrar al estímulo. La sesión fue grabada durante 10 minutos para posteriormente registrar el tiempo acumulado de enterramiento como indicador de la ansiedad (Gutiérrez-Mariscal y cols., 2008). La prueba de enterramiento defensivo mide ansiedad, ésta fue aplicada para evaluar la predisposición de adquirir esta conducta posterior a la lesión neonatal en hipocampo ventral; ya que la ansiedad no es una característica o síntoma presente en la esquizofrenia se espera que los animales lesionados no la presenten.

7.4.9 Plancha caliente

La prueba evalúa los cambios en la nocicepción, se utilizó en la batería conductual dado que en los pacientes con esquizofrenia se ha visto mayor resistencia al dolor. Cada animal se introdujo en un cilindro de vidrio (20 cm de diámetro y 25 cm de altura) colocado en el centro de una placa metálica a $53 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Dentro de los primeros segundos, el animal muestra la conducta de lamerse las patas como respuesta concreta evocada por el estímulo térmico. La latencia marca la aparición de esta respuesta y se determina que la prueba debe concluir antes de 30s para evitar daño al tejido (Yaksh 1997). Se espera que los animales con la lesión muestren incremento en la latencia al lamido de patas, es decir, menor nocicepción.

7.5 VERIFICACIÓN DE LA LESIÓN

Después de los ensayos conductuales, los animales fueron anestesiados para realizar la perfusión con paraformaldehído (4%) y solución salina. Posteriormente se obtuvieron los cerebros y se dejaron en paraformaldehído para facilitar los cortes histológicos. Se realizaron cortes histológicos coronales de (30 μ) en el área del hipocampo (-1,8 a -4,8 mm con respecto a bregma) con un microtómo. Se realizaron cortes del grupo de animales lesionados, *sham* y *naïve*, posteriormente fueron teñidos con violeta de cresilo-eosina, deshidratados, y montados con resina acrílica o bálsamo de Canadá, para su evaluación en un microscopio de luz (marca Zeiss).

7.6 CUANTIFICACIÓN DE DOPAMINA

Se cuantificó dopamina de diferentes aéreas del cerebro (en el hipocampo, la corteza prefrontal, el estriado, el hipotálamo y el núcleo *acumbens*) mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (BAS, West Lafayette, IN, EE.UU.) siguiendo la metodología ya estandarizada (Mostalac-Preciado y cols., 2011). Los animales fueron sacrificados por decapitación, los cerebros se retiraron y se diseccionaron sobre hielo; las muestras se colocaron en tubos Eppendorf, e inmediatamente se congelaron en hielo seco y se pesaron (el tubo vacío se pesó previamente para calcular el peso neto del tejido). A cada muestra se le agregó ácido perclórico (0.1N HClO₄) para posteriormente homogeneizar las muestras. Las muestras fueron centrifugadas a 14.000 rpm por 20 min a 4° C. Cada sobrenadante se separó y se almacenó a -80°C, hasta su análisis por HPLC. La fase móvil (0.64mM de sulfato octil de sodio, 0.52mM EDTA, 36.83mM NaH₂PO₄, 10 mM de NaCl, 100 mL de acetonitrilo, pH 4,0) se bombeó a través de una fase inversa-OD fase II 3-m en una columna para catecolaminas (Grace Davison Discovery Science, IL, EE.UU.) a una velocidad de flujo de 0.03ml/min. Las concentraciones de dopamina se expresaron en ng de peso por gramo de tejido (Kirby y cols., 1995; Mostalac-Preciado y cols., 2011).

7.7 ENSAYOS DE EXPRESIÓN DE *drd2* Y *drd3*

Después de realizar las pruebas conductuales, los animales se sacrificaron para obtener tejido cerebral de distintas áreas cerebrales (hipocampo, núcleo *acumbens* y corteza prefrontal) para cuantificar los niveles de expresión de genes dopaminérgicos (*drd2* y *drd3*) por medio de la técnica de PCR tiempo real.

La técnica de PCR cuantitativa, da la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación del gen de interés. Para llevar a cabo esta detección se utilizaron sondas taqman complementarias a una región intermedia de ADN. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia, de tal forma que, cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa, la molécula fluorescente se libera del *quencher* o

cebador, que permite la emisión de fluorescencia al ser iluminada por un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR es proporcional a la cantidad de ADNc que se está amplificando. Para que sea válida esta técnica se requiere en paralelo una curva con un gen endógeno que servirá como referencia basal de la fluorescencia.

7.7.1 Extracción de ARN total

Las regiones cerebrales disectadas (el hipocampo, el núcleo *acumbens* y la corteza prefrontal), fueron congeladas inmediatamente hasta su uso.

El ARN fue extraído a partir de las áreas de cerebro previamente congeladas, estas se homogenizaron con Trizol, se adicionó cloroformo frío y se dejaron reposar en hielo. Se centrifugaron por 15 minutos y se recuperó la fase acuosa a la que se le adicionó isopropanol, posteriormente se centrifugaron por 10 minutos, y se les adicionó etanol frío para nuevamente centrifugarse por 5 minutos. El botón de ARN presente en el fondo de los tubos, se re-suspendió con agua DPEC.

7.7.2 Cuantificación de ARN total

El ARN obtenido fue cuantificado mediante fluorimetría de placa en el equipo Fluoroskan Ascent (Thermo Electron Corporation, Vanta a Finland) usando el kit Quanty-iT Ribogreen Assay (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. La lectura del ARN se cuantificó en el fluorómetro (Ex= 485 nm, Em= 538 nm).

En todos los casos, se utilizaron 2 µl del RNA total para electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio para evaluar la integridad del ARN por detección de las bandas correspondientes a las subunidades ribosomales pequeña y grande, para descartar degradación.

7.7.3 Síntesis de ADNc

La síntesis de ADNc se realizó a partir de 500 ng de ARN total usando el SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen). Según instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido fue directamente procesado por RT-PCR y/o almacenado a -20 °C.

7.7.4 Ensayos de expresión de *drd2* y *drd3*

La expresión del gen *drd2* y *drd3* se determinó mediante PCR en tiempo real en un equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) a partir de 25 ng (50, 100 o 200ng) de ADNc usando sondas TaqMan® Human *drd2* FAM (Hs00241436-m1) y human *drd3* (Hs00945865_m1) (Applied Biosystems) en ensayos multiplex (por triplicado), usando como gen endógeno RNA ribosomal (TaqMan Ribosomal RNA Control Reagents (VIC® dye) (Applied Biosystems). Los datos obtenidos fueron analizados por el método del C_T comparativo.

7.8 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EL MODELO DE LESIÓN NEONATAL EN HIPOCAMPO VENTRAL MEDIANTE MICROARREGLOS DE ADN

7.8.1 Impresión de las matrices

Se utilizaron cinco mil oligos de *Rattus norvegicus* (70-mer) de la biblioteca Operon Oligo sets (http://www.operon.com/arrays/oligosets_overview.php) resuspendidos en una solución Micro Spotting 50 µM (Array Brand Products) (Tabla 1). Los portaobjetos de 25x75 mm (SuperAmine TeleChem Internacional INC), fueron impresos por duplicado, y fijados a 80°C. Para la pre-hibridación los portaobjetos se rehidrataron con vapor de agua a 60°C y se fijaron con dos ciclos de luz UV (1200J). Las láminas fueron lavadas y secadas antes del proceso de hibridación (procedimientos estándar del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM).

7.8.2 Marcaje del ADNc e hibridación de los microarreglos de ADN

Un total de 10 µg de ARN total fue usado para generar ADNc marcado con dUTP-Cy3 o Cy5-dUTP mediante el kit CyScribe First-Strand cDNA (Amersham). La incorporación de fluoróforo se analizó mediante el uso de la absorbancia a 555 nm para Cy3 y 655 nm para Cy5. Cantidades iguales de ADNc marcado fue sometido a hibridación en una solución UniHyb (TeleChem Internacional INC) sobre la matriz del microarreglo durante 14 horas a 42 ° C.

Tabla 1. Características de los microarreglos de expresión de ADN.

Número de genes	5000
Fuente de información	RGD/GenBank
Tamaño de las sondas	70 mer
Número de aplicaciones por gen	2
Número total de aplicaciones	10 368

*Oligos fabricados por compañía Operon

El listado completo de los genes incluidos en el microarreglo con su número de identificación y su localización dentro de la laminilla puede ser consultado en la página web de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (<http://microarrays.ifc.unam.mx/principal.html>).

7.8.3 Lectura del microarreglo

Los grupos experimentales de ratas lesionadas LNHV del grupo juvenil y adultas fueron marcadas con Cy5, mientras que los grupos experimentales *sham* juveniles y adultas, fueron marcados con Cy3. Cada laminilla fue escaneada bajo 2 longitudes de onda (532 y 635 nm) en un escáner con microscopía confocal. Las imágenes escaneadas fueron procesadas en el lector Virtek Chip mediante el uso del Array Pro Analyzer software (Media Cybernetics). Este programa localiza a cada spot o punto sobre el microarreglo con ayuda de retícula programada que

calcula la densidad promedio de cada una de estas señales, así como del área que rodea a cada punto.

El programa calcula las intensidades medias (densidad de los pixeles en el área definida), La razón entre los niveles de fluorescencia emitida por Cy3 y Cy5 en cada punto representa la expresión relativa de los transcritos de ARN que son comparados de manera competitiva sobre el microarreglo que está siendo analizado.

8 RESULTADOS:

8.1 EVALUACIÓN DE LA CONDUCTA EN EL MODELO DE LESIÓN NEONATAL EN HIPOCAMPO VENTRAL

Para evaluar los parámetros conductuales (rotarod, campo abierto, reconocimiento de objetos, interacción social, inhibición de prepulso, nado forzado, enterramiento defensivo, y nocicepción), dependientes de la edad en los grupos de ratas lesionadas, *sham* y *naïve*, se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 15 y el programa Sigma Plot versión 10.0.

Los resultados conductuales se analizaron con la prueba de ANOVA de dos vías con contrastes *post-hoc* y corrección de *Tukey*, para ver si las diferencias obedecían al efecto de la interacción entre la edad (45 o 90 días) y el tipo de conducta (tabla 2). Posteriormente se realizó un análisis de ANOVA con contrastes planeados por edad y el grupo de animales (*naïve*, *sham* y lesionados), dicha prueba indica el grupo que presentó diferencias estadísticas (tabla 3).

Tabla 2. Resultados estadísticos de las pruebas conductuales. Efecto de la interacción de la edad y el tipo de conducta.

Prueba	F	P
Campo abierto	5.460	0.006
Reconocimiento de objetos	1.71	0.018
Interacción Social	2.03	0.041
Inhibición de prepulso	2.56	0.049
Nado forzado	0.422	0.657
Enterramiento defensivo	0.132	0.876
Plancha caliente	0.65	0.87

Análisis estadístico de las pruebas conductuales, Anova $p < 0.005$ vs edad ($n \pm 10-12$ por grupo).

Como se observa, el análisis por edad (45 y 90 días) nos demuestra que el efecto de la interacción por edad es significativo para las pruebas de campo abierto, reconocimiento de objetos, interacción social e inhibición de prepulso (tabla 2).

Tabla 3. Resultados estadísticos de las pruebas conductuales.

Prueba	<i>P</i> naïve vs sham	<i>P</i> sham lesionados vs lesionados	<i>P</i> naïve vs sham	<i>P</i> sham lesionados vs lesionados	<i>P</i> lesionados juveniles vs lesionados adultos
	Juveniles		Adultos		
<i>Campo abierto</i>	1.0	1.0	1.0	0.001	0.001
<i>Reconocimiento de objetos</i>	1.0	1.0	1.0	0.023	0.021
<i>Interacción Social</i>	1.0	1.0	1.0	0.051	0.005
<i>Inhibición de prepulso</i>	1.0	1.0	1.0	0.048	0.038
<i>Nado forzado</i>	1.0	1.0	1.0	1.0	0.556
<i>Enterramiento defensivo</i>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.02
<i>Plancha caliente</i>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.05

Análisis estadístico de las pruebas conductuales, Se muestran los resultados del análisis estadístico con la prueba de ANOVA con contrastes planeados por edad y tipo de conducta. $p < 0.005$ naïve vs sham, sham vs lesionado y lesionado juvenil vs lesionado adulto ($n = \pm 10-12$ por grupo).

El análisis de contrastes planeados por grupo (lesionado, sham y naïve) y el tipo de conducta, describe que no existen diferencias conductuales entre el grupo de animales naïve y sham juveniles y adultos. Entre los grupos de animales sham y lesionados, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las pruebas de campo abierto, reconocimiento de objetos, inhibición de prepulso e interacción social (tabla 3).

Posteriormente, mediante la prueba estadística de “t” de student con el programa Sigma Plot 10.0., se realizaron análisis por grupo de edad, entre los grupos juveniles y adultos, con comparaciones específicas: grupo de animales lesionados vs grupo de animales sham, grupo de animales lesionados vs de animales naïve y grupo de animales naïve vs grupo de animales sham; análisis que a continuación se presentan.

- La evaluación de la coordinación motora mediante el rotarod en animales con LNHV.

Se evaluó cada uno de los animales para verificar que la lesión no tocara centros motores, el 95% de los animales superaron bien la prueba, por lo que siguieron con las evaluaciones conductuales. El 5% de los animales se descartaron del estudio, porque su coordinación motriz se vio alterada, al

realizarles la necropsia de cerebro, se observó que presentaban infección severa, posiblemente adquirida posterior o durante la cirugía. Los resultados muestran que la lesión realizada en hipocampo ventral en neonatos no afectó la coordinación motriz de los animales, ya que los animales respondieron adecuadamente a la prueba de rotarod sin caer.

- Evaluación de la actividad locomotora en animales con LNHV

En la prueba de campo abierto, se encontró que la actividad locomotora de los animales adultos con LNHV esta significativamente incrementada en aproximadamente 30%, comparada con la actividad locomotora del grupo de animales adultos *sham* y el *naïve* (Figura 2). En relación a los tres grupos de ratas juveniles no se observaron diferencias significativas para la prueba de actividad locomotora (Figura 2).

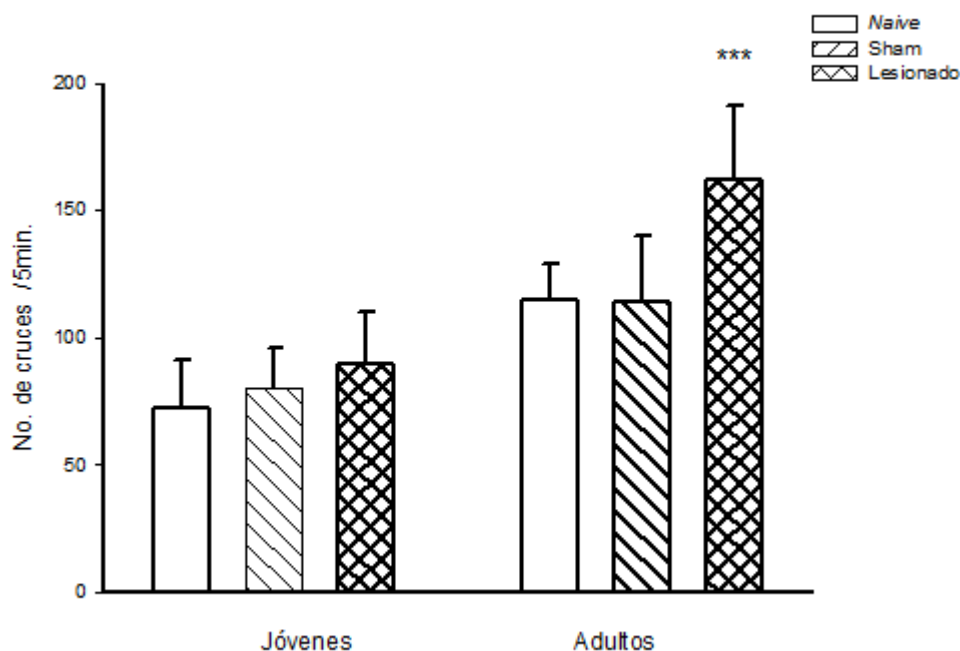


Figura 2. Campo abierto. Se muestra el número de cruces promedio por cada 5 min, en el grupo de ratas juveniles y adultas de 45 y 90 días, respectivamente. Prueba de "t". *** <0.005 frente al grupo control (n = 10 - 12 por grupo).

- Evaluación de la memoria mediante la prueba de reconocimiento de objetos en animales con LNHV

En el grupo de ratas adultas lesionadas, se encontró una reducción significativa de aproximadamente del 20% en la exploración hacia el objeto no familiar, lo que se traduce en una deficiencia de memoria en comparación con los grupos control (grupos *naïve* y *sham*). En el caso del grupo de ratas juveniles, el tiempo acumulado de exploración al objeto no familiar no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos experimentales (figura 3).

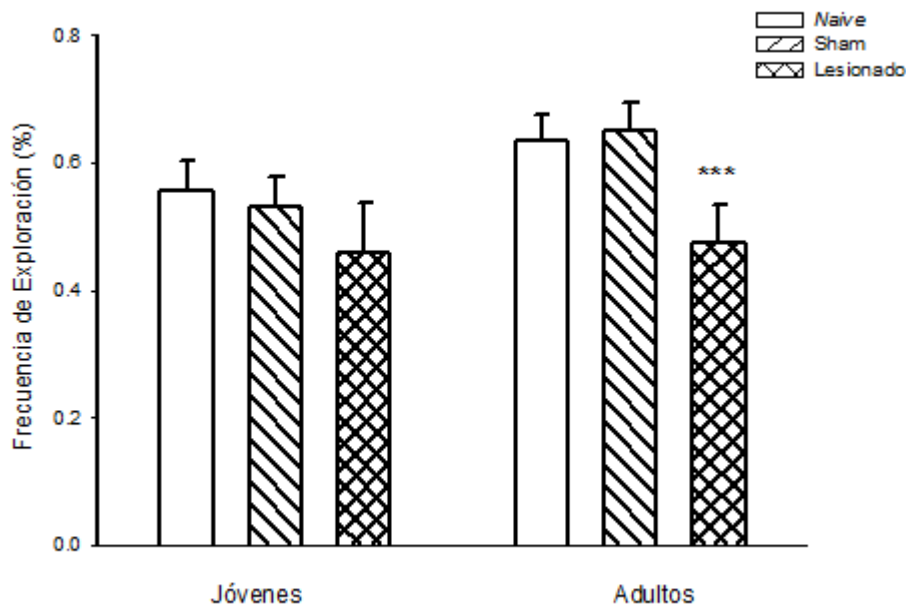


Figura 3: Reconocimiento de objetos. Efecto de la lesión neonatal en hipocampo ventral en la frecuencia de exploración, en el grupo de ratas juveniles y adultas de 45 y 90 días, respectivamente. Prueba de "t". *** <0.005 frente al grupo control (n = 10 - 12 por grupo).

- Evaluación de la interacción social en animales con LNHV

En el grupo de las ratas adultas lesionadas se encontró un decremento importante en la prueba, de aproximadamente del 50% en la interacción social en comparación con el grupo de ratas control: el grupo *sham* y el grupo *naïve*. Sin

embargo, en los tres grupos de animales juveniles, no se observan diferencias estadísticamente significativas en el tiempo acumulado de contacto social. (Figura 4).

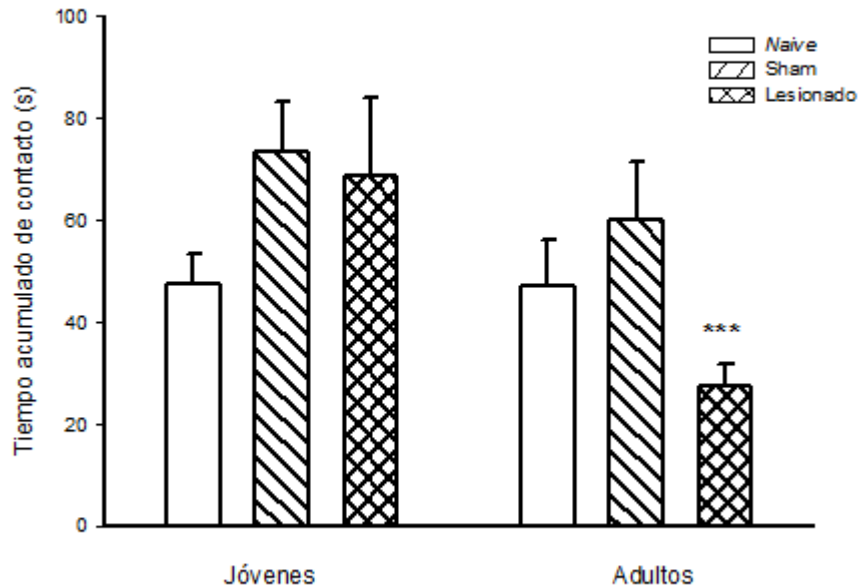


Figura 4. Interacción social. Efecto de la lesión neonatal en animales con LNHV. Tiempo de contacto social, en el grupo de ratas juveniles y adultas de 45 y 90 días, respectivamente. Prueba de "t" *** <0.005 frente al grupo control (n = 10 - 12 por grupo).

- Evaluación de inhibición de prepulso en el modelo de LNHV

En el grupo de animales adultos lesionados se observó una disminución en el porcentaje de inhibición de prepulso de aproximadamente el 65%, en comparación con los animales falsamente lesionados y del grupo *naïve*. En tanto que el grupo de animales juveniles no se observarán cambios significativos en la respuesta de inhibición por prepulso como respuesta al estímulo sonoro (prepulso o pulso) (Figura 5).

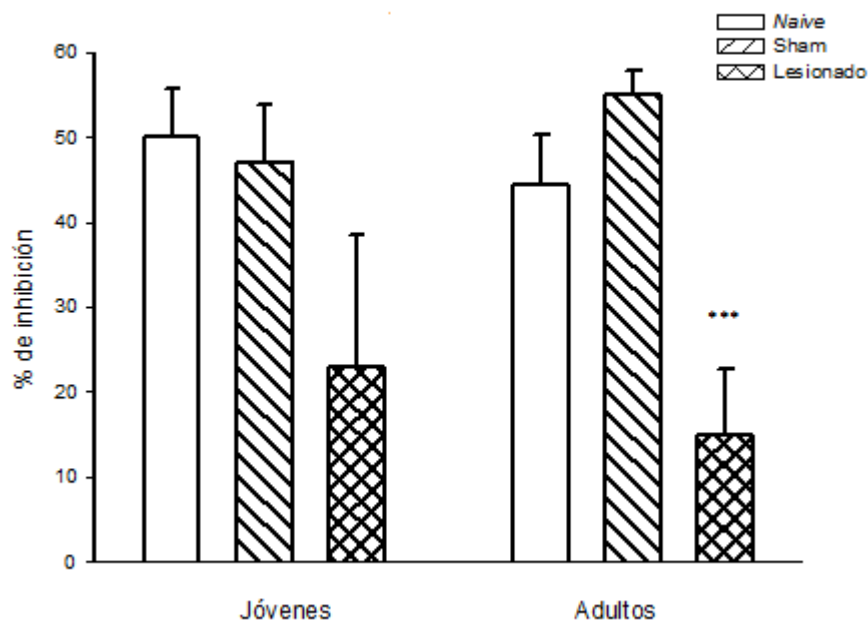


Figura 5: Inhibición de prepulso. Efecto de la lesión neonatal en hipocampo ventral en la prueba de inhibición de prepulso. El grupo de ratas juveniles y adultas de 45 y 90 días. Prueba de "t". *** <0.005 frente al grupo control (n = 10 - 12 por grupo).

- Evaluación de la conducta tipo ansiedad en animales con LNHV

Para la evaluación de una conducta tipo ansiedad en los animales con LNHV se utilizó el modelo de enterramiento defensivo, para ello se comparó el tiempo acumulado de enterramiento, se comparó entre los grupos de animales juveniles y adultos. Los resultados obtenidos mostraron que no hay diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos grupos (tabla 4). Cabe mencionar que los valores de las pruebas que se muestran en la tabla 4, son similares a las que se han observado en el laboratorio de conducta del CINVESTAV sede sur, donde fueron evaluadas.

- Evaluación de la conducta tipo depresión en animales con LNHV

Para la evaluación de la conducta tipo depresión en los animales con LNHV se realizó el modelo de nado forzado. Con respecto a esta prueba, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas del tiempo acumulado de inmovilidad, tanto en los grupos de animales juveniles lesionados, como en los grupos de animales adultos (tabla 4).

Tabla 4: Pruebas de enterramiento defensivo y nado forzado. El comportamiento de enterramiento defensivo y nado forzado en el grupo de animales juveniles y adultos lesionados en hipocampo ventral.

	Juveniles	Adultos
Enterramiento defensivo	Tiempo acumulado (s)	Tiempo acumulado (s)
<i>Naïve</i>	62.00 ± 29.27	99.00 ± 96.63
<i>Sham</i>	104.0 ± 83.93	125.75 ± 79.35
Lesionado	96.50 ± 69.70	119.45 ± 90.08
Nado forzado		
<i>Naïve</i>	64.41 ± 41.29	54.83 ± 22.11
<i>Sham</i>	75.00 ± 34.46	64.13 ± 30.27
Lesionado	72.36 ± 45.04	48.41 ± 33.53

Los datos se expresan como valores promedio ± S.E.M

- Evaluación de la nocicepción en animales con LNHV

Mediante la prueba de plancha caliente, se midió la nocicepción en animales juveniles y adultos del modelo LNHV. En esta prueba se evalúan tres conductas: el escalamiento, lamida de patas y el escape. Donde la lamida de patas es una reacción de reflejo al calor, el escalamiento es una reacción de escape y el escape es un signo de dolor, momento en que se debe parar la prueba. Los resultados obtenidos mostraron que no se detectaron diferencias estadísticas entre los grupos de animales juveniles ni entre los grupos de animales adultos, comparados con su grupo control. Para ninguna de las tres conductas evaluadas en la prueba (escalamiento, lamida de patas y escape) (tabla 5).

Tabla 5: Resultados de la prueba de plancha caliente entre los grupos de animales con LNHV. No se encontraron diferencias en la nocicepción entre las ratas juveniles y adultos, lesionadas comparados con sus controles *sham* y *naïve*.

Prueba de plancha caliente		
	Juveniles	Adultos
Lamida de patas		
<i>Naïve</i>	6.600±4.278	8.400±1.140
<i>Sham</i>	6.900±3.178	8.125±1.553
Lesionado	5.364±1.120	10.444±2.404
Escalamiento		
<i>Naïve</i>	2.200±0.447	4.400±1.140
<i>Sham</i>	2.200±0.632	4.111±1.364
	2.545±0.820	4.400±1.265
Lesionado		
<i>Naïve</i>	8.00 ± 2.00	8.400 ± 1.140
<i>Sham</i>	8.30 ± 2.83	8.125 ± 1.55
Lesionado	6.81± 1.40	10.444 ± 2.40

Los datos se expresan como valores promedio ± S.E.M

En resumen, los resultados conductuales obtenidos para los grupos juveniles con LNHV nos mostraron que no se observaron cambios conductuales en las ratas macho lesionadas, ya que los animales tienen comportamientos muy parecidos a los falsamente lesionados (*sham*), y a los no manipulados (*naïve*) para las diferentes pruebas, es hasta la etapa adulta cuando las diferencias conductuales se vuelven estadísticamente significativas.

Los grupos de animales adultos con LNHV vs *sham*, si presentaron conductas parecidas a la esquizofrenia, al ser evaluadas por medio de la prueba de locomoción, interacción social, reconocimiento de objetos e inhibición de prepulso.

Con respecto a las pruebas de nado forzado y enterramiento defensivo evaluadas en el modelo de LNHV, no se observaron características de depresión y de ansiedad tal y como se muestra en la tabla 4. Por lo que estas pruebas nos podrían hablar de la especificidad conductual del modelo de LNHV, pues en los pacientes con esquizofrenia no se presenta depresión ni ansiedad como característica de la enfermedad.

8.2 VERIFICACIÓN HISTOLÓGICA DE LA LESIÓN HISTOLOGÍA DE CEREBRO

Se evaluaron cortes histológicos de los tres grupos de animales trabajados (lesionados, *sham* y *naïve*) estos, se compararon entre sí, los animales falsamente lesionados se compararon con los del grupo *sham* y el grupo *naïve*, expuestos a las mismas condiciones y pruebas conductuales. En los cerebros de ratas lesionadas, se presenta pérdida de células por la atrofia, probablemente derivado del daño por la lesión neonatal y en respuesta a una posible regeneración, comparados con cortes de los grupos *sham* y *naïve*.

La lesión que se observa en los cortes histológicos del grupo juvenil, es mayor, se observan cavidades o regiones ausentes de células, comparadas con los cortes de los grupos *sham* y *naïve*; probablemente estas cavidades se observen más grandes porque el lapso de tiempo que ha pasado desde la lesión es más corto, y su cerebro ha tenido menos tiempo para regenerar otras células, por lo que la lesión se observa más grande en el grupo de ratas juveniles en comparación con el daño observado en el grupo de ratas adultas (figura 15)

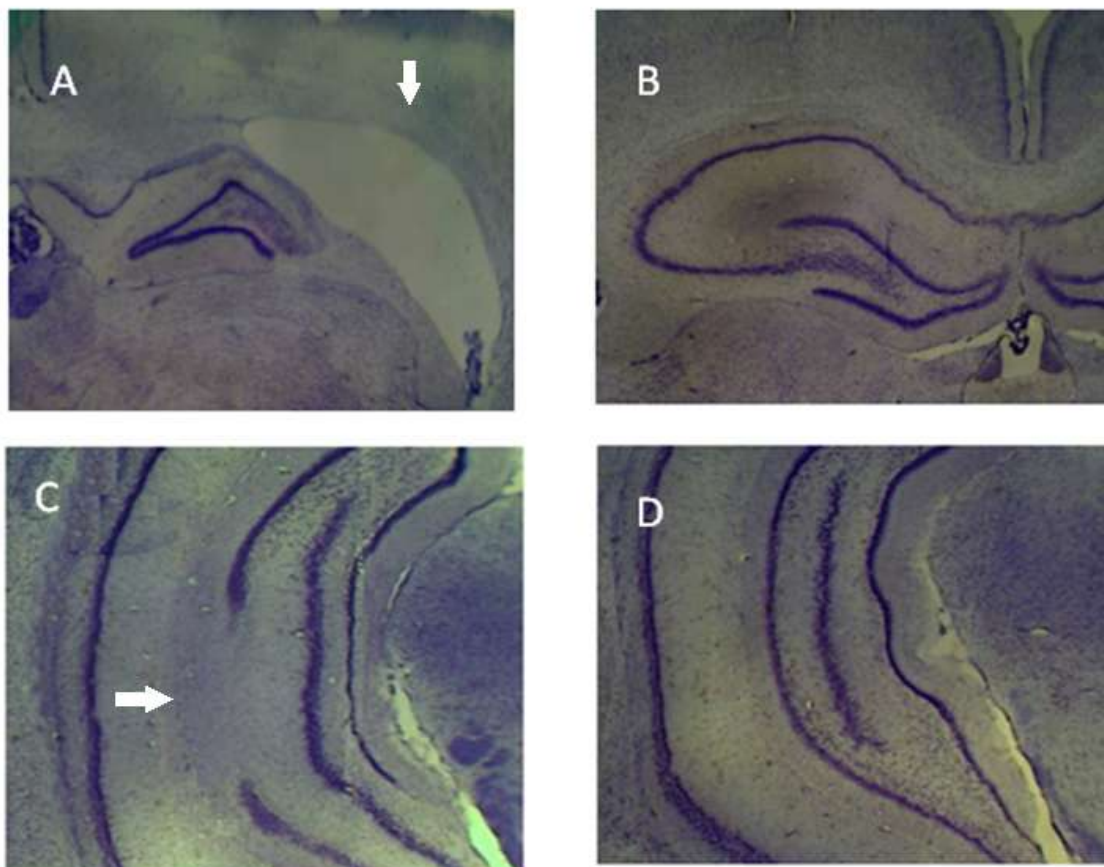


Figura 15. Verificación de la lesión neonatal en hipocampo ventral en ratas juveniles y adultas. Lesiones representativas, localizadas en los grupos de ratas *sham* y lesionados, se muestran cortes histológicos de ratas juveniles (A y B) y adultas (Cy D). La fotografía A muestra un corte coronal del cerebro lesionado de rata juvenil mientras que en la B se ilustra en el de un animal falsamente lesionado. En la fotografía C se muestra un corte de cerebro de animal lesionado adulto, en tanto que en la D el de un animal adulto falsamente lesionado. Las flechas indican la lesión en ambos paneles.

8.2 EVALUACIÓN DE NIVELES DE DOPAMINA EN LOS ANIMALES DEL MODELO LNHV.

Una vez que se observó que las ratas adultas con LNHV presentaron conductas parecidas a la esquizofrenia se procedió a evaluar la concentración de dopamina en las aéreas cerebrales implicadas en esquizofrenia, para ello se diseccionaron los cerebros de los grupos lesionados y los de animales control juveniles y adultos.

Es importante señalar, que como no se observaron diferencias conductuales estadísticamente significativas, entre el grupo de ratas *sham* vs *naïve*. Se decidió, que la cuantificación de dopamina y de los sucesivos experimentos, únicamente se utilizarían en los grupos de ratas adultas lesionadas vs *sham*.

La concentración de dopamina en el grupo de ratas adultas lesionadas fue mayor en el área del hipocampo, y en la corteza prefrontal a diferencia de los niveles detectados en el área del núcleo *acumbens*, del estriado y del hipotálamo, en donde las diferencias no fueron estadísticamente significativa, en comparación con los valores del grupo de ratas *sham* (tabla 6).

Tabla 6: Niveles de dopamina en el hipocampo, la corteza prefrontal, el núcleo *acumbens*, y el estriado en el grupo de ratas adultas.

Dopamina		
	<i>Sham</i>	<i>Lesionados</i>
<i>Hipocampo</i>	9.2 ± 5.0	157 ± 58.7**
<i>Corteza</i>	164.2± 25.7	93.6± 10.2*
<i>Amígdala</i>	36.20± 16	45.49 ± 24
<i>Núcleo acumbens</i>	6047 ± 1310	2784 ± 609
<i>Estriado</i>	7874 ± 1037	6952 ± 2190

Niveles de dopamina en diferentes áreas cerebrales. Los resultados son expresados en ng/g por gramo de tejido. “t” de student . * <0.005 vs control, * <0.05 vs control (n=± 6)

Aunque no se encontraron diferencias conductuales en las ratas juveniles se midieron sus niveles de dopamina en los grupos del modelo de LNHV y en los controles. La concentración de dopamina fue menor en el área de la corteza prefrontal y en la amígdala, a diferencia de las otras áreas cerebrales evaluadas, en donde las diferencias no fueron estadísticamente significativas comparadas con el grupo de animales *sham* (tabla 7).

Tabla 7: Niveles de dopamina en el hipocampo, la corteza prefrontal, el núcleo *acumbens*, y el estriado en el grupo de ratas juveniles.

Dopamina		
	<i>Sham</i>	<i>Lesionados</i>
<i>Hipocampo</i>	200.1±54.4	164.3±14.2
<i>Corteza</i>	251.2±54.5	11.8±10.0**
<i>Amígdala</i>	307.4±10.5	10.5±5.7*
<i>Núcleo acumbens</i>	9682.0±865.6	8716.4±413.9
<i>Estriado</i>	7874 ± 1037	6040±2144

Niveles de dopamina en diferentes áreas cerebrales. Los resultados son expresados en ng/g por gramo de tejido. “t” de student . * <0.005 vs control, * <0.05 vs control (n=± 6).

8.3 EVALUACIÓN DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *drd2* Y *drd3*.

Una vez evaluada la concentración de dopamina en las diferentes regiones del cerebro se procedió a evaluar la expresión de los genes que codifican para los receptores dopaminérgicos *drd2* y *drd3* en linfocitos de tejido sanguíneo y en tejido cerebral (en el núcleo *acumbens*, el hipocampo y la corteza prefrontal) en los grupos de ratas juveniles y adultas lesionadas y *sham*. Los resultados que se obtuvieron son los siguientes:

Linfocitos: La expresión del gen *drd2* en linfocitos tanto en el grupo de animales del modelo LNHV en etapa juvenil como en el control *sham* fue muy baja. Sin embargo, en el grupo de animales del modelo LNHV adultos, se observó

una sobre-expresión la cual fue estadísticamente significativa ($P=0.0002$) con respecto a los animales *sham* control como se muestra en la figura 6. En cuanto al análisis de los niveles de expresión del gen *drd3* no encontraron cambios estadísticamente significativos en los grupos lesionados y *sham* para los grupos de animales juveniles y adultos ($P=0.34$) (figura 7).

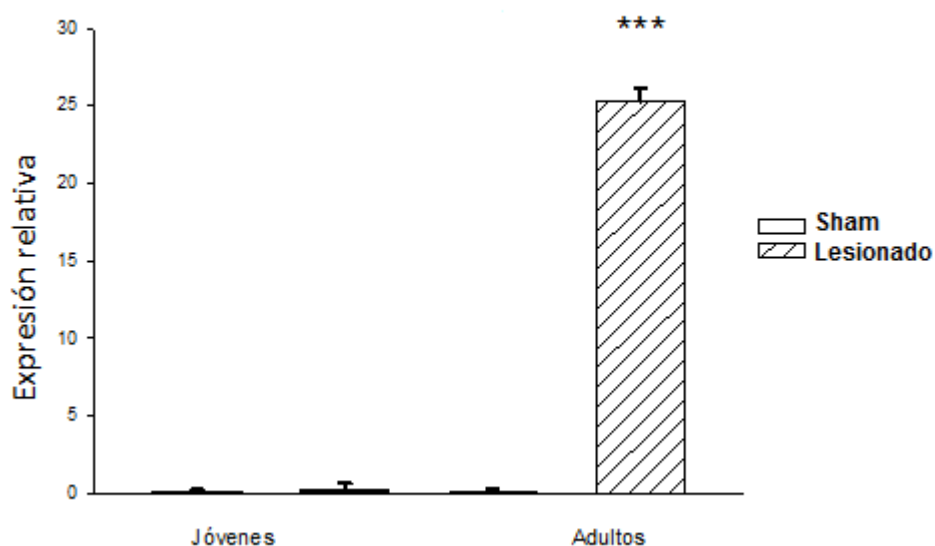


Figura 7. Expresión del gen *drd2* en los linfocitos de los grupos ratas juveniles y adultos. Resultados de la prueba de “t” de student vs los otros grupo. *** $p=0.0005$.

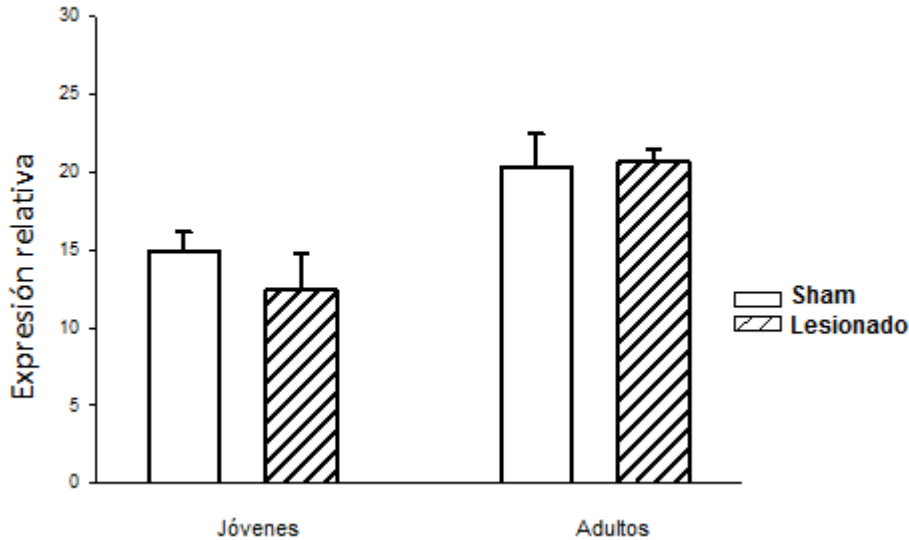


Figura 8. Expresión del gen *drd3* en los linfocitos de los grupos de ratas juveniles y adultos. Resultados de la prueba de "t" de student vs los otros grupos. * p=0.05.

Se sabe que la dopamina también participa en la regulación del flujo sanguíneo, en particular el receptor a dopamina D2 se ha relacionado con la regulación periférica de la presión arterial (Zeng y cols., 2007). Dado que en los linfocitos del modelo animal con LNHV los perfiles de expresión se obtuvieron sobre expresados, se pensó que esta molécula podría estar relacionada con este hallazgo, por lo que se decidió evaluar más a fondo los resultados en la expresión de *drd2* en linfocitos de los grupos de ratas lesionadas y *sham*. Se evaluaron adicionalmente dos grupos de ratas espontáneamente hipertensas de 45 días y 90 días de edad. La expresión del RNAm del gen *drd2* en los linfocitos de sangre periférica en estos grupos fue muy baja. Por lo que se concluye que probablemente la sobre expresión del gen *drd2*, fue por el efecto de la lesión en hipocampo ventral neonatal y no por la regulación periférica de la presión arterial.

El análisis de los perfiles de expresión de los genes *drd3* y *drd2*, también se analizó por área cerebral, los resultados que se obtuvieron son los siguientes:

Hipocampo: los niveles de expresión para los genes *drd3* y *drd2* en el grupo de animales juveniles y adultos lesionados y *sham*, no se modificaron, comparados con el grupo de animales *sham* (figura 8).

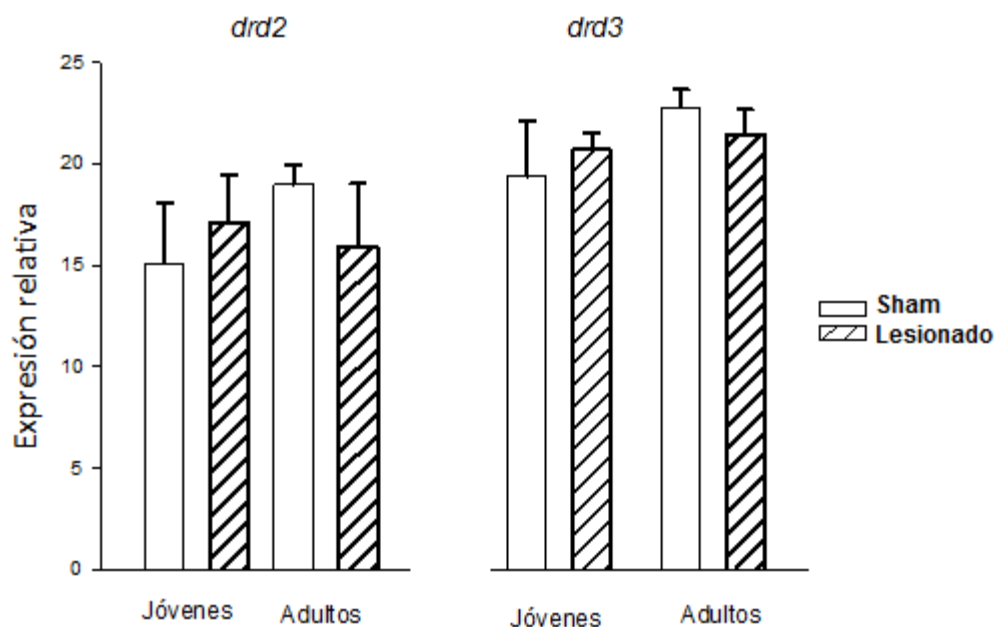


Figura 9: Expresión de los genes *drd2* y *drd3* en el área del hipocampo. Se muestran los niveles de expresión de los genes *drd2* y *drd3* en el hipocampo en el grupo de animales juveniles y adultos. Resultados de la prueba de "t" de student vs los otros grupo. * $p=0.05$.

Corteza prefrontal: los niveles de expresión en el grupo de animales adultos para el gen *drd2* mostraron un decremento en la expresión, estadísticamente significativa ($P=0.003$) sin embargo, para el gen *drd3* no se observaron diferencias en su expresión entre ambos grupos ($P=0.56$) (figura 9).

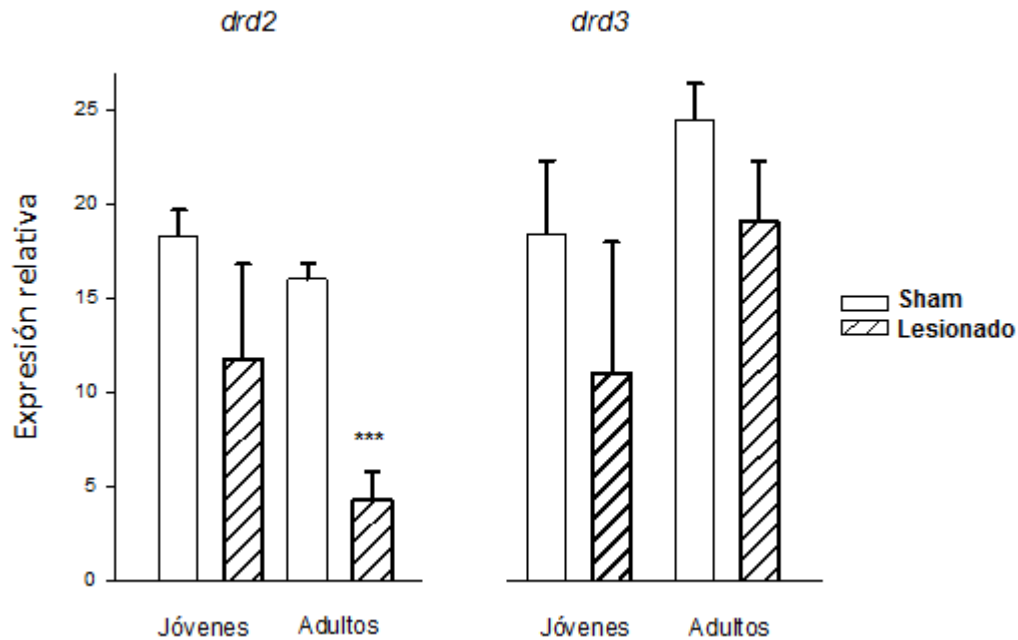


Figura 10: Expresión de los genes *drd2* y *drd3* en la corteza prefrontal. Se muestran los niveles de expresión de los genes *drd2* y *drd3* en corteza prefrontal en el grupo de animales juveniles y adultos. Resultados de la prueba de “t” de student vs los otros grupo. * $p=0.0005$.

Núcleo *acumbens*: Los niveles de expresión en el grupo de ratas adultos presentaron disminución estadísticamente significativa para el gen *drd3* ($P=0.0004$) *en cambio*, en el grupo de animales juveniles la expresión se mantuvo sin cambios ($P=0.45$) (figura 10).

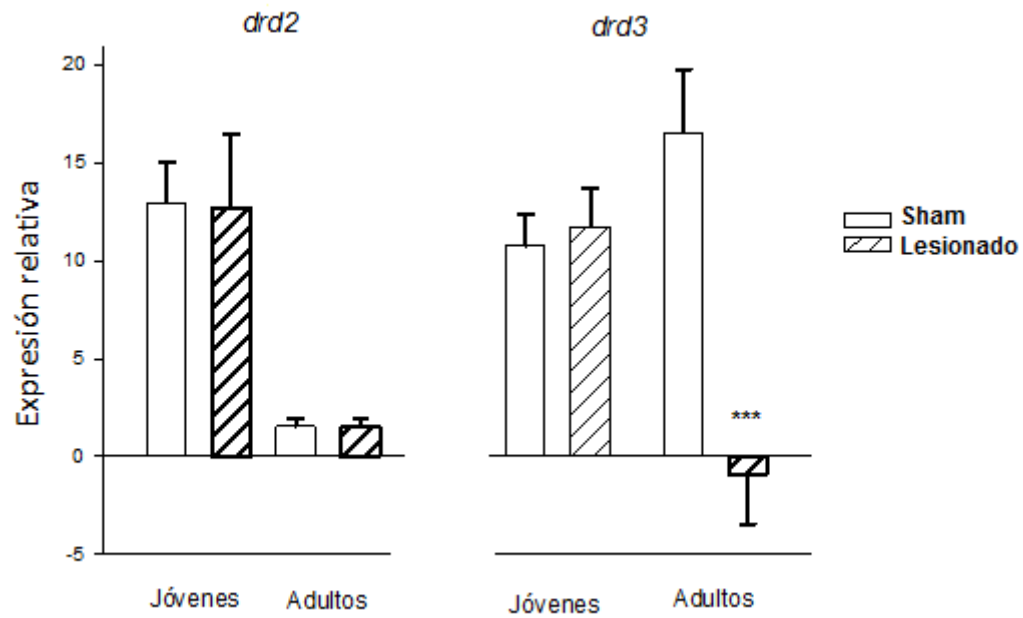


Figura 11: Expresión de los genes *drd2* y *drd3* en el área de nucleó *acumbens*. Se muestran los niveles de expresión de los genes *drd2* y *drd3* en núcleo *acumbens* en el grupo de animales juveniles y adultos. Resultados de la prueba de “t” de student vs los otros grupo. *** $p=0.0005$.

8.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EL MODELO DE LESIÓN NEONATAL EN HIPOCAMPO VENTRAL MEDIANTE MICROARREGLOS DE ADN

Posteriormente para evaluar la expresión de otros genes de interés en sistema nervioso en animales con LNHV, se realizaron microarreglos de expresión en los grupos de animales lesionados y *sham*. Se evaluó parte del transcriptoma del modelo animal de esquizofrenia inducido por LNHV en cuatro condiciones: grupo de animales juveniles lesionados (LNHV), grupo de animales juveniles falsamente lesionados, grupo de animales adultos lesionados (LNHV), grupo de animales adultos falsamente lesionados.

En el grupo de ratas jóvenes se registro un mayor número de genes sobre-expresados, mientras que en las ratas adultas se encontró mayor número de genes sub-expresados (tabla 8).

Tabla 8. Análisis de los cambios de expresión génica en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral en ratas juveniles y adultos.

	JUVENILES					ADULTOS				
	(n) genes	%	(n) genes	%	Total (%)	(n) genes	%	(n) genes	%	Total (%)
N. ACCUMBENS	326	6,52	317	6,34	12,86	351	7,02	291	5,82	12,83
C. PREFRONTAL	362	7,24	302	6,04	13,28	372	7,44	310	6,20	13,64
HIPOCAMPO	321	6,42	329	6,58	13,00	351	7,02	333	6,66	13,68
SIN CAMBIO	3991	79,82	4052	81,04	60,86	3926	78,42	4066	81,32	59,84

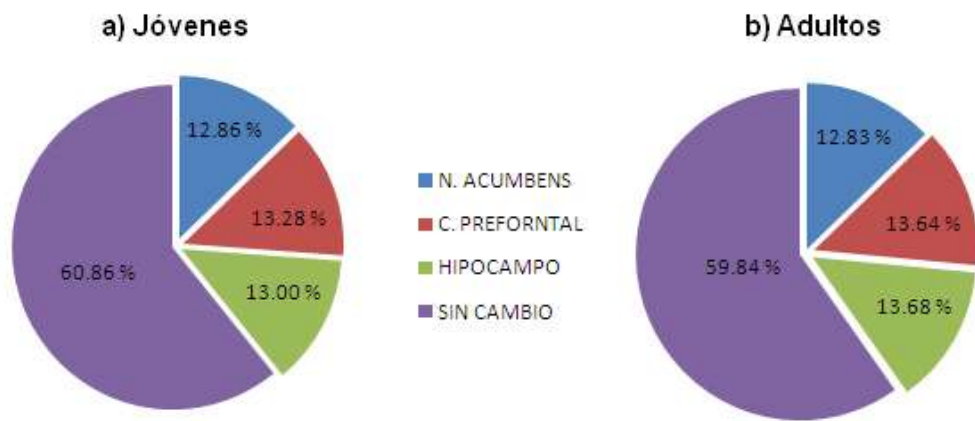


Figura 12. Porcentaje de genes que modificaron su expresión en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral en ratas juveniles y adultos.

Posteriormente se realizó un análisis de las rutas que mostraron alteraciones utilizando el programa Kegg (www.genome.jp/kegg/kegg2.html), encontraron las siguientes rutas: las rutas metabólicas de interacciones neuroactivas ligando-receptor (>10 genes), señalización de calcio (> 7 genes), vías de cáncer (>7 genes) y las vías implicadas en procesos inmunológicos (> 7 genes). Cabe mencionar que hay genes que participan en 2 o más rutas.

Para un análisis más robusto de cada tejido, se trabajo con los genes cuyos valores de z-score fueron mayores a 2. Siguiendo el link de cada gen en la base de datos Rat Genome Database (RGD) se obtuvo el nombre y la descripción de cada uno de ellos.

Debido a que las bases de datos muestran diversas rutas metabólicas que podrían ser afectadas por la lesión, y a que no todas están relacionadas directamente con el trastorno sino a procesos metabólicos y a comunicación celular, sólo se seleccionaron 15 rutas asociadas al sistema nervioso (Ver figura 12).

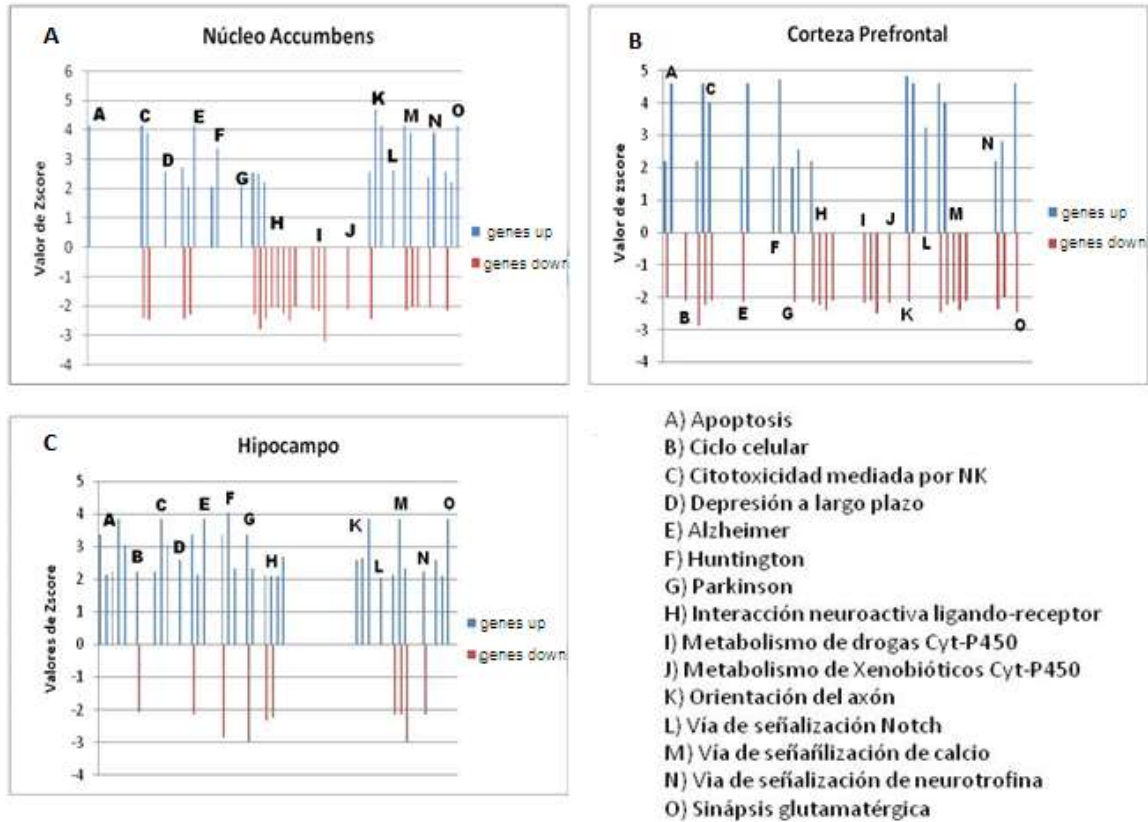


Figura 13. Rutas metabólicas de interés diferencialmente expresadas en el grupo de ratas juveniles lesionadas vs sham. En color azul se muestra el número de genes sobre-expresados y en color rojo los genes sub-expresados con z-score >2, la inicial indica la ruta metabólica, y cada línea representa un gen involucrado en la ruta metabólica. En el panel A, se encuentran los genes regulados en el núcleo *acumbens*, panel B, los genes regulados en la corteza prefrontal y panel C, los genes regulados en el hipocampo.

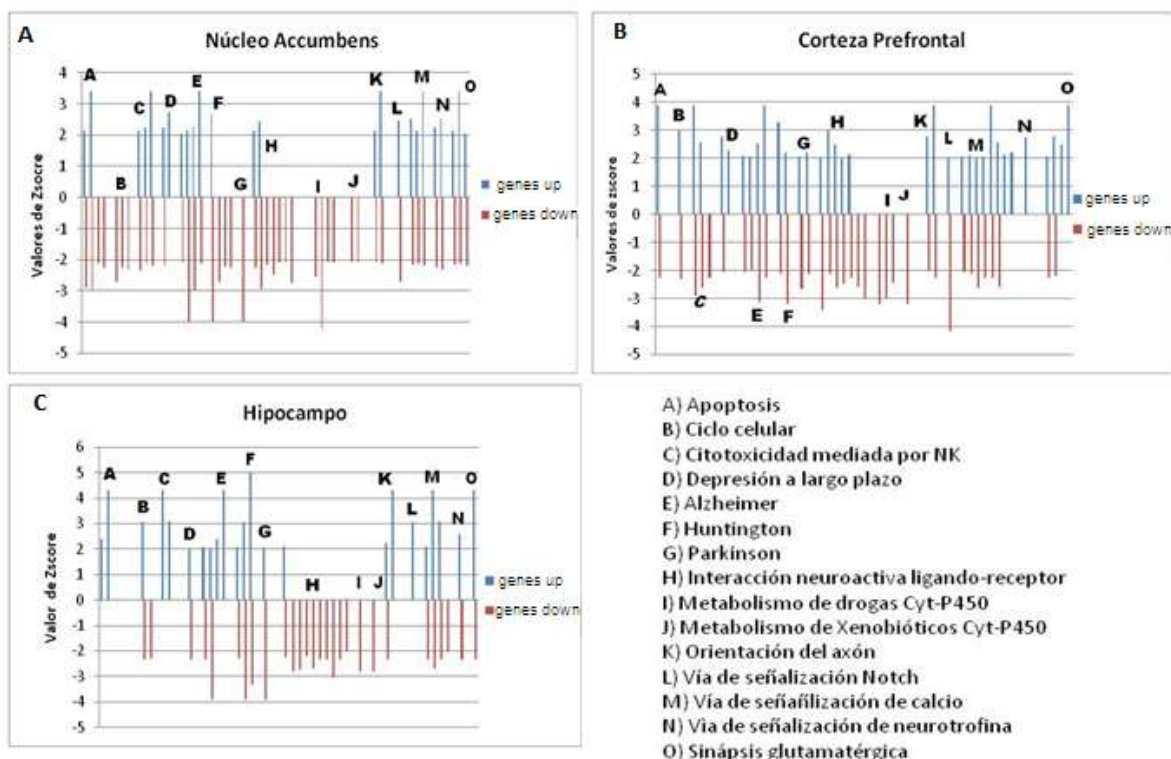


Figura 14. Rutas metabólicas de interés diferencialmente expresadas en el grupo de ratas adultas lesionadas vs sham. En color azul se muestra el número de genes sobre-expresados y en color rojo los genes sub-expresados con z-score >2, la inicial indica la ruta metabólica, y cada línea representa un gen involucrado en la ruta metabólica. En el panel A, se encuentran los genes regulados en el núcleo *accumbens*, panel B, los genes regulados en la corteza prefrontal y panel C, los genes regulados en el hipocampo.

En la figura 13 se muestran los genes diferencialmente expresados en las rutas relacionadas de sistema nervioso y que coinciden en más de una de las áreas cerebrales de estudio. Las rutas de señalización a calcio e interacción neuroactiva ligando-receptor, donde se identificaron mayor número de genes afectados y con z-score altos, genes posiblemente involucrados en la enfermedad

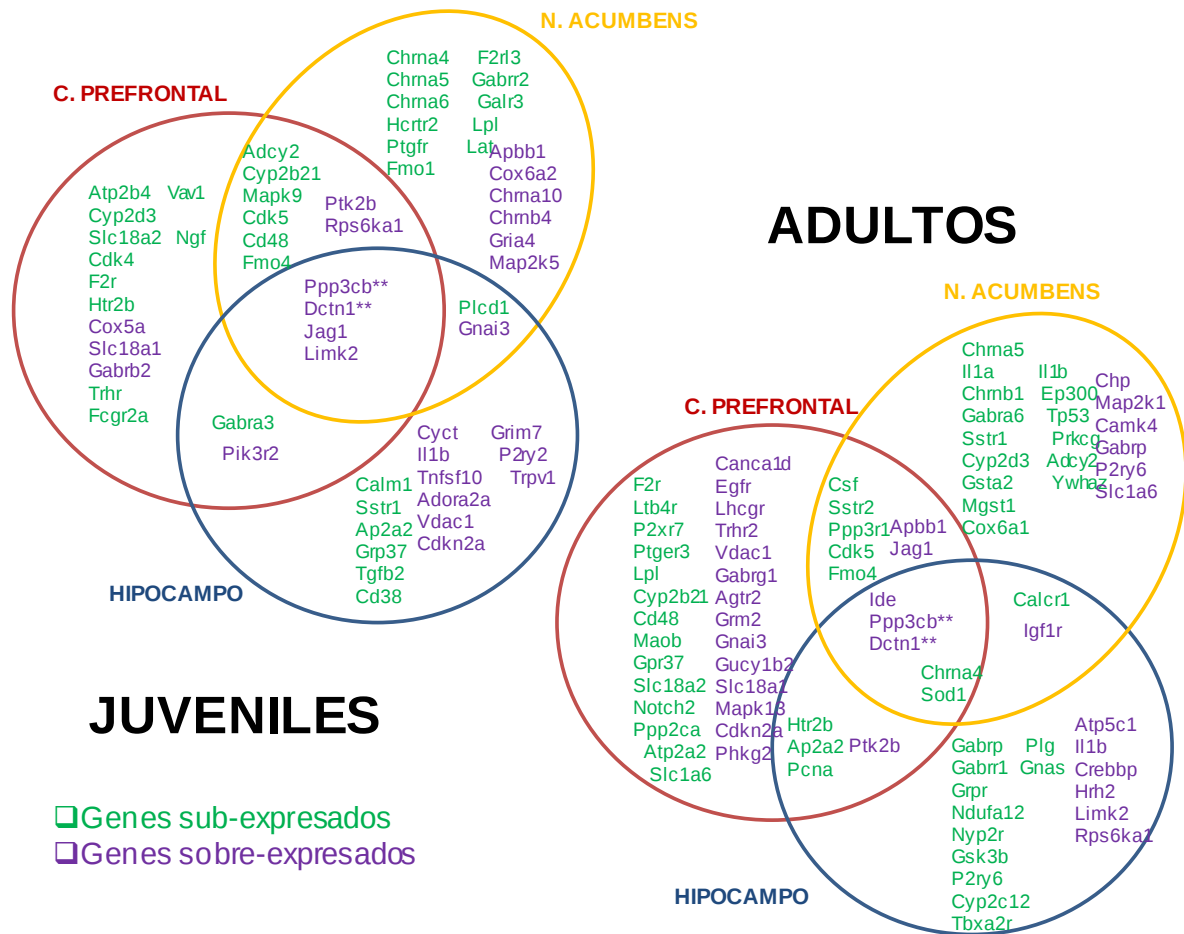


Figura 15. Genes diferencialmente expresados en las rutas de interés. Las intersecciones contienen los genes que cambiaron su expresión en más de una de las regiones evaluadas. En color verde se muestran los genes sub-expresados y en color morado los genes sobre-expresados.

De este análisis se seleccionaron 7 genes como probables candidatos para el estudio de esquizofrenia, 5 de ellos se han asociado previamente con esquizofrenia, mientras que los dos genes restantes no habían sido relacionados directamente con la enfermedad (Genis-Mendoza y cols., 2013), la búsqueda de genes candidatos para el estudio de enfermedades complejas y en especial en la esquizofrenia resulta relevante dada su probable participación en la enfermedad. A continuación se hace una breve descripción de estos genes candidatos y se describe su posible participación en la esquizofrenia.

Tabla 9. Genes candidatos obtenidos a partir del análisis de parte del transcriptoma del modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral.

Símbolo	Nombre	Función	Score- A	Score- P	Score- H
Limk2	LIM dominio cinasa 2	Adaptador de proteínas que participa en la señalización después de la activación de células T.	4.710	4.834	2.659
Ppp3cb	Proteína fosfatasa 3, subunidad catalítica, isoforma beta	Proteína fosfatasa dependiente de calmodulina; desfosforila factores nucleares de células T activadas, puede jugar un papel durante la atrofia del músculo esquelético.	4.130	4.600	3.846
Dctn1	Dinactina 1	Componente de los microtúbulos de dineína activada por ATPasa, que actúa como un motor de microtúbulos.	3.378	4.717	4.042
Cpz	Carboxipeptidasa z	Esta enzima muestra actividad carboxipeptidasa hacia sustratos con básicos residuos C-terminales. Es más activa a pH neutro	4.061	3.461	3.253
Jag1	Jagged 1	Ligando responsable de la activación Notch1.	2.625	3.254	2.036
Ide	Enzima degradadora de insulina	Enzima involucrada en la degradación de péptidos bioactivos incluyendo insulina, beta-endorfina, péptido natriurético auricular y beta-amiloide.	2.292	2.531	2.052
Sod1	Superóxido dismutasa 1, soluble	Cataliza la conversión de superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, implicados en la respuesta al estrés oxidativo.	-2.193	-3.187	-3.301
Chrna4	Receptor colinérgico, nicotínico alfa-4	Receptor colinérgico, nicotínico alfa-4.	-2.909	-3.420	-2.814

Los genes propuestos como candidatos seleccionados a partir de los siguientes 3 criterios: 1) Valores de score >2, 2) Expresión en más de un área cerebral, 3) participación en rutas de interés. Se muestra el símbolo del gen, el nombre, la descripción biológica y los valores de score en adultos de cada tejido. El núcleo *acumbens* (N), la corteza prefrontal (P), el hipocampo (H).

Los genes *Ppp3cb* y *Dctn1* coincidieron en las tres áreas cerebrales estudiadas (hipocampo, núcleo *acumbens* y corteza prefrontal), tanto en el grupo de animales juveniles como en adultos, por lo que, probablemente tengan una participación importante en el modelo de LNHV y en la esquizofrenia.

9 DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se analizaron las diferencias dependientes de la edad en algunas conductas relacionadas con la esquizofrenia en el modelo animal de lesión neonatal del hipocampo ventral (LNHV), para ello se midió la concentración de dopamina en diferentes áreas cerebrales (el hipocampo, el núcleo *acumbens*, la corteza prefrontal, el estriado e hipotálamo); así como las diferencias en expresión génica de genes dopaminérgicos (*drd2* y *drd3*) y en parte del transcriptoma.

Los resultados mostraron que las conductas relacionadas con la esquizofrenia se presentaron únicamente en el grupo de animales adultos lesionados; además de que se observó menor cantidad de dopamina en la corteza prefrontal y una mayor cantidad en el hipocampo, probablemente asociados a los cambios en los perfiles de expresión génica presentes en cada una de las áreas evaluadas.

9.1 PARÁMETROS CONDUCTUALES

Se evaluaron los siguientes parámetros conductuales para determinar si los animales lesionados neonatalmente presentaban conductas tipo esquizofrenia.

Prueba de coordinación motora: La prueba de rotarod es importante para observar la motricidad o coordinación motora del animal, en este caso la utilizamos para determinar si la operación neonatal no interfería en la motricidad del animal a evaluar, ya que si el animal presentaba anormalidades motoras este, se descartaría del trabajo. La prueba de rotarod nos reveló que la lesión realizada en hipocampo ventral en neonatos no afectó la coordinación motriz de los animales, ya que los animales respondieron adecuadamente a la prueba sin caer del equipo, previo entrenamiento.

Campo abierto: La hiperlocomoción es considerada una conducta relacionada con los síntomas positivos de la esquizofrenia (indicador de “schizophrenia-like”) (Zendehrouh y cols., 2009), debido al aumento de dopamina causante de las alucinaciones y delirios, esta característica es la que más se ha observado en los modelos animales de esquizofrenia (Guo y cols., 2010; Sigurdsson y cols., 2010). En

el modelo de campo abierto observamos una hiperlocomoción en el grupo de los animales adultos lesionados, mientras que el grupo de animales juveniles lesionados sólo mostró una tendencia a incrementar la locomoción.

Aunque trabajos previos reportan hiperlocomoción en animales con LNHV y evaluados a los 60, 70, 78, 84 y 150 días de edad (Al-amin 2000, Rueter 2004, Flores 2005, Alquicer 2007, Berg y cols., 2008, Contoy y cols., 2008). Se considera que una rata macho es adulta a partir de los 56 días de edad, ya que es el periodo donde finaliza la pubertad (Knoil y cols., 2006) por lo que se concluye que la LNHV induce hiperlocomoción en el grupo de ratas adultas. Pocos trabajos han estudiado la hiperlocomoción en animales jóvenes. En nuestro caso, observamos que las ratas juveniles lesionadas presentaban tendencias a incrementar la locomoción pero ésta no fue significativa. Flores y cols., en el 2005 compararon animales de 36 vs 65 días de edad y reportaron hiperlocomoción en ratas lesionadas, pero sólo a los 65 días. Este autor discute que posiblemente esta conducta se observa con mayor facilidad hasta que los animales llegan a la etapa adulta (Flores y cols., 2005). Cabe mencionarse que Lipska (2000) y Al-amin (2002) compararon también animales en estas edades y encontraron que ambos grupos presentaron hiperlocomoción, sin embargo, en estos trabajos la hiperlocomoción de los animales jóvenes era menor que la observada en los animales adultos. Por lo tanto, es posible que la hiperlocomoción se presente en animales juveniles, pero, los resultados pueden variar por la edad y por la forma de registro. En la tabla 10 se resumen los trabajos que han estudiado la conducta locomotora en el modelo de LNHV. Como se puede ver en esta tabla, las formas de medir y de analizar los datos de locomoción de los animales varían, por lo que posiblemente la forma de medir la prueba y el análisis de esta, pueden influir en la conducta de los animales.

Tabla 10. Locomoción con el modelo animal de lesión neonatal en hipocampo ventral. Se muestran los trabajos donde se ha medido locomoción con el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral.

Autores	35 d	45 d	56d	78d	86 d	90 d	150d	Método	Resultado
Genis, presente trabajo		X				x		Campo abierto, cajas de acrílico de 80x60x20cm, se midió el número de cruces por 5 minutos	Se incrementa solo a los 90d.
Alquicer, 2004				x				Se aislaron por 8 semanas a partir del destete, en cajas de 40x20x30 cm, se midió actividad, previa adecuación, se midieron cruces por 10 min	Se incrementa
Conroy, 2007				x				Los animales fueron separados por pares, a los 70 días, les inyectaron solución salina o etanol, después de 60 min, se midió locomoción en cajas 43.2x 43.2 x 30.5 cm, la distancia se midió por medio de sensores.	Se incrementa
Berg, 2008			60					Locomoción en campo abierto, actividad locomotora, previa dosis de nicotina, en cajas de 43.2x43.2x30.5 cm	Se incrementa
Alquicer, 2007				x				Los animales se aislaron en 3 o 8 por caja a los 21 días. A los 78 días se midió actividad locomotora, en caja cerradas, de 48x28x25, se cuantificaron los movimientos por 10 min	Se incrementa
Flores, 2005	X		X					Actividad locomotora en cajas de 20x40x30 medida por fotoceldas, por 60 min.	Se incrementa solo a los 60d.
Flores, 2005				70				Actividad locomotora a los 70 días, por 60 min en caja de 20x40x30 cm por fotoceldas	Se incrementa
Rueter, 2004					84			Actividad locomotora en cajas de 42x42x30, se midió por medio de sensores, por 5 min. La hiperlocomoción se revierte con clozapina.	Se incrementa
Lipska, 2002	x		X					Se midió distancia, y actividad en la caja de 42x42x30 por medio de sensores.	Se incrementa
Al-amin, 2000	x		X				x	Pruebas de campo en cajas de 42x42x30, se reportó hiperlocomoción en las diferentes edades	Se incrementa

La edad se presenta con una "x", si la prueba se realizó en la edad descrita en títulos de la tabla y con un número si la edad difiere.

Reconocimiento de objetos: El deterioro cognitivo, reflejado como pérdida de memoria de trabajo, es una característica frecuentemente descrita en la esquizofrenia (Casther y cols., 2004). En el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral posiblemente el deterioro esté relacionado con el daño en la corteza prefrontal, derivado de la lesión en hipocampo ventral (Lipska y cols., 2002). En esta prueba, el grupo de animales adultos lesionados neonatalmente en hipocampo ventral, presentó pérdida de la memoria, ya que el tiempo de la exploración del objeto no familiar fue muy similar al tiempo de exploración del objeto familiar (figura 4). La pérdida de memoria únicamente se apreció en el grupo de animales adultos lesionados, ya que en el grupo de animales juveniles, aunque hay tendencias, no se observaron cambios estadísticamente significativos. Anteriormente Chambers y cols., en 1996 demostraron el deterioro de memoria a los 25, 40 y 80 días, mediante el

laberinto radial, ya que los animales con lesión neonatal en hipocampo ventral incrementaron el tiempo de exploración en el laberinto, al igual que la latencia de exploración con reforzador de alimento (Chambers y cols., 1996). Lipska y cols., observaron en animales de 40 días de edad (lesionados en etapa neonatal) una reducción significativa del tiempo de exploración en el laberinto en T, cuando fueron sometidos a estrés previo por restricción de comida. En otros trabajos midieron memoria mediante el laberinto elevado en T en animales de 56 días post-operación, y también observaron reducción de latencia de exploración y mayor tiempo de exploración en el grupo de animales adultos lesionados (Wood y cols., 2003, Brady y cols., 2009).

Es posible que las diferencias que estamos observando se relacionen con el tipo de prueba, ya que la prueba de reconocimiento de objetos que nosotros realizamos mide principalmente memoria de trabajo a corto plazo, a diferencia de los otros trabajos anteriores, donde miden memoria por medio de laberinto en T y laberinto radial donde miden principalmente memoria a largo plazo mediante un reforzador, que generalmente es alimento. En la tabla 12 se resumen los trabajos que han estudiado memoria en el modelo de LNHV.

Tabla 11. Medición de la memoria en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral. Se muestran los trabajos donde se ha medido memoria con el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral.

Autores	35 d	45 d	56d	90 d	Método	Resultado
Genis, presente trabajo		X		x	Reconocimiento de objetos, 5 min en cada fase.	Decremento
Brady, 2009			X		Laberinto en T, los animales lesionados exploraron más tiempo en laberinto comparado con el <i>sham</i> .	Decremento
Wood, 2003			X		Laberinto elevado, exploración 4 min, menor memoria y mayor ansiedad	Decremento
Lipska, 2002			X		Laberinto en T, exploración por 10 min, déficit de memoria en lesionados con respecto con el <i>sham</i>	Decremento
Chambers, 1996	25	40		80	Laberinto radial, el déficit de memoria en las tres edades, no se exacerba con anfetaminas.	Decremento en las 3 edades

La edad se presenta con una "x", si la prueba se realizó en la edad descrita en títulos de la tabla y con un número si la edad difiere.

Interacción social (IS): Uno de los síntomas negativos más representativos en la esquizofrenia, es el deterioro de la sociabilidad o la incapacidad de interacción social. Es interesante señalar que la reducción de esta conducta también se ha observado en modelos farmacológicos de esquizofrenia. Por ejemplo, en un modelo en el que se administró fenilciclidina de manera crónica, se observó un decremento significativo en la interacción social en animales adultos tratados con este fármaco (Lee y cols., 2005). También en el modelo de LNHV se ha reportado un decremento en la interacción social en ratas lesionadas adultas (Lipska y cols., 2000), pero pocos trabajos han analizado si hay diferencias dependientes de la edad.

En el presente trabajo encontramos que el grupo de animales adultos con LNHV pierde el interés por interactuar con el otro roedor, además de mostrarse retraídos. Sin embargo, en animales juveniles de 45 días de edad se observan niveles de interacción social similares a los que presentan los animales controles (*sham* o *naïve*) de la misma edad (figura 3). Lipska y cols en 1997 compararon animales de 35 y 56 días de edad y no encontraron reducción de la interacción social en ninguno de los grupos (Lipska y cols., 1997). Por otra parte, Sams-Doot y cols en 1997 compararon animales de 35 y 65 días de edad con LNHV y encontraron que los dos grupos tuvieron una interacción social reducida en comparación con el grupo “*sham*” (Sams-Doot y cols., 1997). Se podría discutir que en el trabajo de Lipska los animales que se toman como adultos son todavía jóvenes y es posible que en estas condiciones los efectos de la LNHV todavía no se expresen. Sin embargo, Sams-Doot si encontró este efecto desde los 35 días (tabla12) (Sams-doot y cols., 1997). Alquicer en el 2004 observó en animales lesionados mayor reducción del contacto social a través de un aislamiento más restringido en donde, después del destete aislaron a los animales (1 por caja) y (4 por caja), en comparación con los animales lesionados sin aislamiento (Alquicer y cols., 2004). Por lo que un estresor más intenso como el aislamiento, condujo a un mayor déficit en la interacción social.

En nuestro caso, la prueba de interacción social se realizó en una arena lisa iluminada con luz blanca en donde se observó reducción de la conducta social, tal y como lo realizaron Flores y cols. en el 2005, donde determinaron reducción de la

interacción social en animales de 62 días de edad. (Flores y cols., 2005). En la tabla 11 se resumen los trabajos que han estudiado la conducta de interacción social en el modelo de LNHV.

Tabla 12. Interacción social en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral. Se muestran los trabajos donde se ha medido interacción social en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral.

Autores	35 d	45 d	56d	90 d	Método	Resultado
Genis, presente trabajo		X		x	Interacción social en área negra lisa con 60 cm de diámetro, con luz blanca, se midió el tiempo de interacción por 10 min	Disminuye
Flores, 2005	No		60-62		Con 2 días de aislamiento, se midió interacción social en caja acrílica de 80x90x30 por 10 min.	Disminuye
Lipska, 2002	X		X		Se midió interacción social en caja de madera (40x100x150 cm) por 10 min.	Sin diferencias
Rueter, 2004			X		Arena plástica (60x60x35 cm), por 5 min.	Sin diferencias
Becker, 1999			90	125	Se realizó la prueba a los 90 días, en piso negro de clorhidrato de polivinil de 100x100x40, por 7 min.	Decremento, solo a los 125 d
Sams-doot, 1997	X		65		Se midió la prueba en, arena con grava gris de 150x100x40 cm por 10 min, En ambas edades decremento de la interacción social, revirtiéndose con el medicamento.	Disminuye

La edad se presenta con una “x”, si la prueba se realizó en la edad descrita en títulos de la tabla y con un número si la edad difiere.

Inhibición de prepulso: La esquizofrenia está asociada con anormalidades en el procesamiento de la información y atención, la prueba de inhibición por prepulso evalúa la capacidad de respuesta del individuo ante un estímulo auditivo, así como su procesamiento (Le Pen y cols., 2002). En nuestro trabajo observamos que la inhibición del prepulso sensorial sólo se presentó en el grupo de ratas adultas lesionadas, la evaluación del grupo de animales juveniles lesionados no presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a sus controles, aunque existe la tendencia, las desviaciones estándar se presentaron muy grandes, especialmente en este grupo (figura 5).

En pacientes con esquizofrenia, se establece que los pacientes presentan reducción del prepulso sensorial posiblemente derivado de la dificultad de filtrar percepciones sensoriales en general como sonidos o la manera en que éstos los filtran o procesan (Ago y cols., 2010), Esta prueba se ha usado en trabajos anteriores en modelos animales para evaluar conductas tipo esquizofrenia (Swerdlow y cols., 1998; Peleg-Raibstein y cols., 2008), encontrando en la mayoría de éstos déficit en la inhibición de prepulso (tabla 13).

Con el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral, la prueba se ha realizado en animales de 56, 70, 100 y 120 días de edad variando el nivel de decibeles y el tiempo de exposición al pulso y prepulso, hallándose inhibición en estas variables (Le Pen G y cols., 2002, Lynne y cols., 2004, Le Pen G y cols., 2005, Risterucci et la., 2005, Kamath y cols., 2008) (tabla 13).

Nosotros observamos inhibición de prepulso únicamente en animales adultos lesionados, como se ha reportado anteriormente, pero no observamos inhibición del prepulso en los animales lesionados de 45 días de edad, ya que para esta prueba no se tienen registros en animales jóvenes, por lo que es necesario seguir explorando los parámetros en la prueba.

En la tabla 13 se resumen los trabajos que han estudiado la inhibición de prepulso en el modelo de LNHV. Como se puede ver en ésta tabla, la medición, los decibeles y la intensidad del sonido varían en cada una de las pruebas.

Tabla 13. Inhibición de prepulso en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral. Se muestran los trabajos donde se ha medido inhibición de prepulso en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral.

Autores	35 d	45 d	56d	90 d	Método	Resultados
Genis, presente Trabajo		X		x	Ambientación 5 min a 70 dB, prepulso 84 dB por 20ms. Tiempo entre prepulso y pulso 205 ms, pulso 120 dB, con 6 repeticiones.	Inhibición del prepulso en adultos
Kamath, A 2008			x	120	Habitación 5 min 120 dB de pulso, por 40m, prepulso de 80 dB.	Inhibición del prepulso en ambas edades
Risterucci, 2005				100	Habitación 5 min 120 dB de pulso, por 40m, prepulso de 70,75 y 80 dB. Inhibición de prepulso con 72, 84 dB, pulso a 120 dB, por 45 ms.	Inhibición del prepulso
Lynne, 2004			x		Habitación 5 min 120 dB de pulso, por 40m, prepulso de 70,75 y 80 dB.	Inhibición del prepulso en todos los casos
Le pen, 2003			70		5 ms de aclimatación a 68 dB, pulso 120 dB con una duración de 40 msec, el prepulso de (72,76,80 o 84 m), con 6 repeticiones, en todas se reporta inhibición. Observa que con glicina se revierte.	Inhibición del prepulso
Le pen, 2002			x		5 ms de aclimatación a 68 dB, pulso 120 dB con una duración de 40 msec, el prepulso de (72,76,80 o m), con 6 repeticiones.	Inhibición del prepulso

La edad se presenta con una “x”, si la prueba se realizó en la edad descrita en títulos de la tabla y con un número si la edad difiere.

Nado forzado: Con respecto al modelo de nado forzado (Porsolt y cols., 1977), es el más usado en la industria farmacéutica para determinar el potencial antidepressivo de nuevas drogas, por ejemplo, varios informes clínicos han postulado que el antipsicótico risperidona en dosis bajas puede ayudar en el tratamiento de la depresión resistente a tratamiento, ya que risperidona facilita la respuesta antidepressiva producida con fluoxetina o mirtazapina (Rogóž y cols., 2012). Lipska en 1993 reporta que la lesión neonatal en hipocampo ventral no induce características de depresión con la prueba de nado forzado, en animales lesionados de 35, 56 y 70 días (Lipska y cols., 1993), resultados similares a los obtenidos en este trabajo.

Los resultados en la conducta nos indican que sólo en la etapa adulta, se observan cambios específicos en ratas con lesión neonatal en el hipocampo ventral parecidos a los síntomas de esquizofrenia. Posiblemente las conductas sólo se observen a esta edad por el fenómeno de *pruning* o poda neuronal. Se ha visto que en pacientes, después de este proceso de poda neural (aproximadamente durante la adolescencia), la mayoría de los síntomas de la esquizofrenia se observan con mayor claridad, justo después de que se ha realizado la poda neuronal. En los

adolescentes se dificulta observar con certeza síntomas relacionados con esquizofrenia, razón por la cual el diagnóstico de la enfermedad se realiza tardíamente. Es importante no perder de vista este fenómeno en el modelo animal de esquizofrenia, ya que las conductas de hiperlocomoción, déficit de memoria, déficit de interacción e inhibición de prepulso, sólo se presentaron en edad adulta, por lo que posiblemente el fenómeno de *pruning* también se pudiera presentar en el modelo.

Enterramiento defensivo: Las pruebas de ansiedad (enterramiento defensivo, Pinel y cols., 1978) y depresión (nado forzado, Porsolt y cols., 1977) también fueron aplicadas en este estudio para evaluar la predisposición de adquirir estas conductas posterior a la lesión neonatal en hipocampo ventral. Las pruebas se realizaron en el grupo de animales juveniles y adultos lesionados, los resultados de las pruebas revelaron que no había diferencias entre los grupos lesionados y los falsamente operados: Se sabe que la depresión y la ansiedad en pacientes con esquizofrenia no es una característica inherente de la enfermedad, ya que si éstas se presentan en pacientes, es de manera atípica, e inconsistente (Buckley y cols., 2009), por lo que la hipótesis del estudio puede ser sustentada por nuestros resultados.

Con respecto a la ansiedad, la medimos mediante la prueba de enterramiento defensivo, sin encontrar conducta de ansiedad por efecto de la lesión, sin embargo, Wood en el 2003, reporta mayor ansiedad, determinada mediante la prueba de laberinto elevado, al igual que Sams-Dodd (1997), sin embargo no se había estudiado el modelo de enterramiento defensivo (Sams-doot y cols., 1997; Wood y cols., 2003). El modelo de enterramiento defensivo se basa en la característica instintiva de enterrar objetos adversos, considerando que a mayor enterramiento mayor ansiedad y la prueba de laberinto en cruz se basa en la ansiedad exteriorizada al explorar espacios abiertos y desconocidos, por lo que podrían existir diferencias en el tipo de ansiedad que expresan los sujetos cuando en paralelo desarrollan conductas tipo esquizofrenia.

Plancha caliente: La prueba de nocicepción, mide el dolor, dado que en los pacientes con esquizofrenia se ha visto mayor resistencia al dolor, se realizó la prueba de nocicepción en los animales con LNHV, para verificar esta asociación. Los resultados de la prueba muestran que, se no encontraron diferencias estadísticamente significativas comparadas con sus controles, por lo que la lesión neonatal en hipocampo ventral, no afectó la capacidad de respuesta al dolor de los animales lesionados.

9.2 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA:

Con el fin de observar la lesión y confirmar el daño producido por el ácido iboténico desde la etapa neonatal. En etapa juvenil (45 días) y en etapa adulta (90 días) posterior a la realización de las pruebas conductuales, se sacrificaron y perfundieron los animales. Se revisaron aproximadamente 20 cerebros de ratas juveniles (10 sham y 10 lesionadas) y 20 de ratas adultas (10 sham y 10 lesionadas), así como 10 cerebros de ratas sin manipulación (*naïve*) (5, juveniles y 5 adultas), obteniendo fotografías representativas por edad.

Se realizó la perfusión con paraformaldehído al 4 % y solución salina. Una vez fijado el cerebro, se incluyó en parafina, para posteriormente realizar los cortes histológicos. Los cortes se realizaron en un micrótopo (30-40 μ m) y se montaron en portaobjetos previamente tratados, se tiñeron con violeta de cresilo, y hematoxilina-eosina para observarlos y evaluarlos en el microscopio.

Trabajos previos reportan únicamente el daño en animales adultos (56 y 65 días), por lo que nosotros evaluamos el daño, tanto en la etapa adulta a los 90 días, como en la etapa juvenil (45 días) ya que demostramos que la conducta tipo esquizofrenia solo se hace evidente en edad adulta.

Los cortes histológicos del cerebro del grupo adulto (a los 90 días), se observaron lesiones muy similares a las ya publicadas en donde se describe

desarrollo de gliosis (Lipska y cols., 1996; flores y cols., 1999), y distintos tipos de lesión. Con lo que demostramos que se realizó exitosamente la lesión neonatal.

Los cortes histológicos de cerebro que se realizaron en el grupo de animales juveniles (a los 45 días), presentaron una lesión de grandes dimensiones especialmente sobre el hipocampo y la corteza en comparación con los animales falsamente lesionados (Figura 17).

Conductualmente los grupos juveniles de 45 días (*sham*, lesionados y *naïve*) presentaron una conducta similar, es decir, no presentan conductas tipo esquizofrenia, pese a que es posible identificar la lesión en el corte histológico, lo que sugiere que la expresión conductual de signos tipo esquizofrenia es resultante de un proceso de lenta instauración. Sin embargo, en la etapa adulta a los 90 días, si se presentan las conductas tipo esquizofrenia, la lesión sigue presente, aunque en dimensiones más pequeñas. Posiblemente en el animal juvenil se produzca regeneración neuronal, reparación y/o neurogénesis, ya que se sabe que el hipocampo tiene esta potencialidad. (Haukvik y cols., 2010). Aparentemente en la etapa adulta el hipocampo esta reparado, pero el daño provocado a la región prefrontal se mantiene, reflejándose en las conductas evaluadas tipo esquizofrenia. Hasta el momento no hay evidencia sobre los fenómenos de regenerativos en este modelo animal de LNHV, por lo que el presente proyecto abre nuevas líneas a investigar.

9.3 EVALUACIÓN DE NIVELES DE DOPAMINA (NEUROQUÍMICA)

La esquizofrenia se caracteriza por presentar disfunción bioquímica y anatómica en el cerebro, se ha visto que algunos sistemas de neurotransmisión, como el dopaminérgico, se encuentran alterados en pacientes con esquizofrenia. Actualmente se sabe que pacientes con esquizofrenia presentan mayor cantidad de dopamina en la región mesolímbica relacionada con la presencia de los síntomas positivos de la enfermedad (tales como delirios y alucinaciones) y menor cantidad en

la corteza prefrontal relacionada con los síntomas negativos (tales como anhedonia, y abulia) y el daño cognitivo (Urban y cols., 2012).

Uno de los síntomas más representativos de la enfermedad son los delirios y alucinaciones mismos que han sido relacionados con mayor cantidad de dopamina en hipocampo, así como una menor cantidad en la corteza prefrontal (Urban y cols., 2012).

En el presente trabajo se midió la cantidad de dopamina en áreas del cerebro relacionadas con la esquizofrenia, como es la corteza prefrontal, el hipocampo, la amígdala y en el núcleo *acumbens*. Estas regiones además de relacionarse con la esquizofrenia, también se relacionan con la cognición y memoria (Gutierrez-Galve y cols., 2010). De la misma forma, también se estudió el estriado, región con actividad dopaminérgica que no ha sido relacionada con la esquizofrenia, pero que se incluye únicamente como control porque es rica en terminales dopaminérgicas pero participa en la regulación de la motricidad.

El análisis de la concentración de dopamina en el grupo de animales lesionados jóvenes no presentó cambios estadísticamente significativos, excepto en la corteza prefrontal y en la amígdala, donde se observó un decremento en la concentración de dopamina; decremento que se acentúa en el grupo de los animales adultos lesionados.

En el presente trabajo encontramos disminución de dopamina en la corteza prefrontal, lo cual confirmó la hipótesis del estudio. Esta disminución fue reportada por Alquicer en el 2003 a los 78 días de edad en animales lesionados, nosotros también observamos esta disminución en las ratas adultas. Varios autores indican que el deterioro cognitivo asociado a la esquizofrenia se relaciona con la disminución de la dopamina en la corteza prefrontal (Abdul-Monim y col., 2006; Wonodi y col., 2010), ya que usando otros modelos como el de fenilciclidas y la lesión química con 6-hidroxydopamina en la misma corteza (ya que inducen la destrucción de neuronas en la vía dopaminérgica), se produce en el animal un déficit de memoria y deterioro cognitivo (Clinton y cols., 2006). En el presente trabajo, observamos que, en la edad

adulta se presentó deterioro de memoria en una prueba de reconocimiento de objetos, así como disminución en el prepulso sensorial, estos datos se podrían relacionar con la disminución de dopamina en la corteza prefrontal teniendo comprometida esta área con déficit cognitivo, como se ha reportado en pacientes con esquizofrenia (Toda y col., 2007).

El análisis de dopamina en hipocampo de animales adultos con LNHV, mostró un incremento significativo con relación a los grupos controles, el incremento de dopamina en hipocampo, fue reportado anteriormente por Alquicer en el., 2003 en animales de 78 días de edad, nosotros seguimos observando el incremento a los 95 días. Según la hipótesis de la dopamina, los episodios psicóticos (periodos de alucinaciones y delirios) se desencadenan específicamente por la activación de receptores dopaminérgicos. Actualmente se sabe que pacientes con esquizofrenia presentan mayor cantidad de dopamina en la región mesolímbica relacionada con la presencia de los síntomas positivos de la enfermedad y menor cantidad en la corteza prefrontal relacionada con los síntomas negativos y el daño cognitivo.

9.4 EXPRESIÓN DE RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

Se obtuvieron los niveles de expresión génica del ARNm de *drd2* y *drd3* en hipocampo, región prefrontal y núcleo *acumbens* de ratas Wistar macho, juveniles (45 días) y adultas (90 días) con LNHV, con el fin de comparar los niveles por edad y área cerebral.

Se cuantificaron los perfiles de expresión de *drd2* y *drd3* en el hipocampo, el núcleo *acumbens* y la corteza prefrontal en ratas juveniles y adultas comparadas con el grupo control (*sham* y *naïve*). Se observó que en la etapa juvenil no se encontraron cambios de expresión en ninguno de los tejidos estudiados. Flores y colaboradores anteriormente realizaron un estudio de expresión de receptores dopaminérgicos en el modelo de LNHV por medio de autorradiografía a los 41 días de edad y no observaron cambios en la expresión de los receptores D1, D2 y D3 (Fores el al.,

1996). El-rawas también evaluó la expresión de D2 por medio de inmunohistoquímica en varias regiones cerebrales, pero solo observó cambios en el núcleo putamen (El-rawas y cols., 2009). Quizá los niveles de expresión son regulados hasta la etapa adulta, relacionándose con los cambios conductuales y neuroquímicos que también observamos en nuestras evaluaciones como se discute más adelante.

Con respecto al grupo de animales adultos con LNHV, se observó en corteza prefrontal una tendencia de disminución del RNAm para *drd3* y una clara disminución de la expresión del RNAm para *drd2* comparado con los controles (*sham* y *naïve*) (Figura 11). Anteriormente Flores y cols, reportó por medio de autorradiografía, que no observó cambios en la expresión en esta molécula en animales de 62 días, igual que Lipska en animales de 56 días (Flores y cols., 1996, lipska y cols., 2003). Posiblemente la regulación de la expresión de *drd2* se presente en edades posteriores, ya que nosotros detectamos estas diferencias únicamente en animales de 90 días. La regulación de la expresión de genes en corteza prefrontal en el grupo de ratas adultas para *drd2* puede indicar efectos tardíos del desarrollo neurológico. La corteza prefrontal, depende embriológicamente del hipocampo y la poda sináptica en la etapa juvenil puede contribuir a los resultados presentados (Teicher y cols., 2002). En ratas, la poda neuronal para receptores *drd1* y *drd2* se produce durante la peri-adolescencia periodo que oscila entre los días 42-44. Se ha descrito en humanos, que después de esta poda, es posible observar los síntomas de la esquizofrenia (Rakic y cols., 2000; Teicher y cols., 2002), por lo que posiblemente en este modelo, también estamos observando los efectos de la poda, ya que en la etapa juvenil, no hay cambios conductuales relacionados con esquizofrenia, tal y como lo podemos observar en la etapa adulta.

Con respecto a la expresión del RNAm de hipocampo, no se observaron cambios estadísticamente significativos en la expresión para *drd2* y *drd3*, aparentemente la expresión en esta área se logra “recuperar” del daño producido por la LNHV.

En cuanto a la expresión de estos receptores en el núcleo acumbes, Se observó disminución de la expresión del RNAm de *drd3* en el grupo de animales

adultos lesionados, como se reporta en un trabajo anterior con autorradiografía a los 62 días (Flores y cols., 1996).

De la misma forma, se observó disminución del transcrito de *drd2* en el grupo de animales adultos (*sham* y lesionados) comparado con el grupo de animales juveniles (*sham* y lesionados), aparentemente, es un proceso normal en dopamina, derivado de la poda neuronal (Figura 3C), esta hipótesis habla de que los receptores de dopamina se producen en exceso antes de la pubertad (día 40), y que a partir del día 40, hay un ligero decremento “normal” de los receptores D2 en el núcleo *acumbens* (Teicher y cols., 2002).

Con respecto a la evaluación de la expresión en linfocitos, en la etapa juvenil, observamos que la expresión para *drd3* no presentó cambios estadísticamente significativos, sin embargo, se presenta sobre-expresión del *drd2* únicamente en el grupo de animales adultos lesionados, aunque sabemos que los receptores dopaminérgicos pueden participar en la regulación de la presión sanguínea y que posiblemente la expresión de este receptor pudiera estar relacionado con ésta, se realizaron experimentos complementarios con una cepa de ratas espontáneamente hipertensas para descartar la influencia de la presión arterial sobre la expresión del gen *drd2* (figura 9). Es importante señalar que a pesar de los cinco receptores dopaminérgicos están presentes en los linfocitos de sangre periférica, la literatura indica que la expresión de *drd2* no se observa en los animales sanos sin manipulación (Caronti y cols., 1998). Por esta razón, no fue posible observar la expresión ni en el grupo falsamente lesionado (*sham*), ni en grupo hipertenso, por lo tanto, la expresión de *drd2* en los animales lesionados podría estar directamente relacionada con la lesión neonatal en hipocampo ventral. En la actualidad hay pocos informes sobre los receptores dopaminérgicos en el modelo de NLVH y los mecanismos moleculares faltan por descifrarse. Recientemente se publicó que *drd2* se encontró sobre-expresado en pacientes con esquizofrenia, por lo que lo proponen como biomarcador en sangre periférica (Zvara y cols., 2005, Kurian y cols., 2011).

En la tabla 14 se resumen los trabajos que han evaluado la expresión de receptores dopaminérgicos en el modelo de LNHV. Como se puede ver en la tabla, se evaluaron dos áreas en común (la corteza prefrontal y el núcleo *acumbens*), además de otras aéreas distintas (el hipocampo y los linfocitos), en comparación a las que se han medido en otros trabajos, Se utilizó la técnica de PCR-TR en lugar de autorradiografía o hibridación in situ, teniendo la ventaja de ser una técnica más sensible, por lo que las formas de evaluar la expresión podrían variar el resultado final, por lo que es necesario seguir realizando mediciones de expresión del RNAm y de proteínas en las mismas aéreas evaluadas y en otras áreas cerebrales de interés.

Tabla 14. Expresión de receptores dopaminérgicos en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral. Se muestran los trabajos en donde han evaluado la expresión de receptores dopaminérgicos en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral.

Autor	Métodos	Resultados
Genis, presente trabajo	Se midió la expresión del RNAm de <i>drd2</i> y <i>drd3</i> en corteza prefrontal, núcleo <i>acumbens</i> , hipocampo y linfocitos, a los 45 y 90 días post operación, mediante PCR-TR.	Los niveles de expresión para <i>drd2</i> en linfocitos aumentaron, pero en núcleo <i>acumbens</i> y corteza prefrontal disminuyó. Para <i>drd3</i> , no se presentaron cambios de expresión, excepto en núcleo <i>acumbens</i> .
Lipska, y cols., 2003	Por medio de hibridación in situ se observa la expresión de D1, D2 y D3, en estriado y en corteza prefrontal a los 56 días	No hay diferencias de expresión en ninguna de las proteínas evaluadas.
El-rawas y cols 2009	A los 35 y 65 días por medio de hibridación in situ se observó la expresión de DRD2 y DRD1 en núcleo <i>acumbens</i> .	Para D1 solo se observó menor expresión en caudado putamen, a los 65 días y para D2 también en caudado putamen, a los 35 días se sobreexpresa y a los 65 disminuye.
Flores, 1996	Se midió la expresión de DRD1, DRD2 y DRD3, por medio de autorradiografía a los el 41 y 62 días.	Los niveles de expresión de <i>drd3</i> , se reduce notablemente a los 62 días en el núcleo <i>acumbens</i> , tubérculos olfatorios, y las islas de Calleja. Un pequeño pero significativo aumento en los receptores D1 también fue visto en el caudado putamen a los 62 días, mientras que ningún cambio significativo en la expresión general de los receptores D2.

9.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA EN EL MODELO DE LESIÓN NEONATAL EN HIPOCAMPO VENTRAL MEDIANTE MICROARREGLOS DE ADN

Adicionalmente se observó la expresión de genes del sistema nervioso central en animales con LNHV, juveniles y adultos mediante la técnica de microarreglos.

Debido a la gran cantidad de datos derivados de los microarreglos gran parte del análisis se limitó a genes con valores de z-score mayor a dos, y a las rutas metabólicas relacionadas con trastornos mentales (figura 13).

En el grupo de ratas jóvenes se registró un mayor número de genes sobre-expresados, mientras que en las ratas adultas hubo mayor número de genes sub-expresados, esto nos sugiere que posiblemente la lesión provocó apoptosis neuronal, suprimiendo la expresión de muchos genes (figuras 14 y 15).

Grupo de genes con z-score >2 y <-2

En este corte se detectaron 7 genes de interés que regularon su expresión génica en las tres áreas cerebrales evaluadas (el núcleo *acumbens*, la corteza prefrontal y el hipocampo). Las rutas de señalización con mayor número de genes regulados fueron: calcio e interacción neuroactiva ligando-receptor, mientras que las vías de diferenciación y función neuronal, respuesta neuroendocrina y comportamiento, tuvieron una menor participación de genes regulados (Figura 13).

Grupo de genes con z-score >3 y <-3

Finalmente, un análisis más fino, considerando únicamente genes con un z-score mayor a 3, nos llevó a proponer 8 genes candidatos, potenciales para el estudio genético de la esquizofrenia. Seis de ellos (*PPP3CB*, *DCTN1*, *IDE*, *LIMK2*, *JAG1* y *CPZ*) se hallaron sobre-expresados, mientras que los dos restantes (*sod1* y *chrna4*) se encontraron sub-expresados (Tabla 2).

Entre los genes con valores de z-score más altos, sobresalió el gen *ppp3cb* (Tabla 10), este se sobre-expresó en el grupo de ratas juveniles y adultas, codifica para la subunidad catalítica de la isoforma β de la proteína fosfatasa 3. Recientemente, un estudio genómico en familias taiwanesas con esquizofrenia sugirió la vinculación del *locus*10q22.3, donde están ubicados los genes *ANXA7*, *DNAJC9*, *ZMYND17* y *PPPP3CB*, mismos que los asocian con la esquizofrenia y con déficit cognitivo y de atención (Liu y cols., 2011). De la misma forma, se realizó un meta-análisis que evaluó todo el genoma de individuos afectados con esquizofrenia en diversas poblaciones. Entre los genes propuestos como candidatos se encuentra, *ppp3cc* que codifica para la isoforma gamma de la enzima calcineurina (Ng y cols., 2009). Por lo que creemos que será un gen candidato recomendable para el estudio genético de la esquizofrenia.

Por otra parte, el gen *DCTN1* codifica la subunidad mayor p150 de la dinactina, un complejo macromolecular que consta de 10 polipéptidos, necesario para el transporte axonal retrógrado de vesículas y organelos celulares por el sistema microtubular. Numerosos estudios han mostrado el papel de p150 en desórdenes psicóticos asociados a delirios, alucinaciones (Kurian y cols., 2011) y trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Huntington (Engelender y cols., 1997) y la esclerosis lateral amiotrófica (ela) (Shaw y cols., 2005). Por lo que, el haber encontrado que este gen se regula en esquizofrenia, podría ayudar a esclarecer los mecanismos moleculares de la enfermedad.

La regulación diferencial en los niveles de los transcritos de *ppp3cb* y *dctn1* se hizo notoria tanto en el grupo de ratas juveniles como adultas (valores de z-score > 3), lo cual apunta a que posiblemente ambos genes, se estén regulando desde una edad temprana, por lo que posiblemente, si conocemos como es la regulación de la expresión de estos genes en estadios juveniles y adultos, esta nos podría ayudar a promover un diagnostico temprano, desde antes de la aparición de los primeros síntomas.

Otro de los genes sobre-expresados en las tres áreas del cerebro estudiadas y con un z-score alto, fue el gen *ide* que codifica la enzima degradadora de insulina (IDE) (Tabla 10). Este gen se ubica en el locus10q23-q25, previamente asociado con esquizofrenia (Bernstein y cols., 2009). El déficit en la expresión de esta enzima ha sido asociado con la enfermedad de Alzheimer y con diabetes mellitus tipo 2 (Wei y cols., 2010, Hou y cols., 2012). Asimismo se ha sugerido que el haloperidol podría ejercer algún efecto sobre la actividad de IDE, a través de cambios en los niveles de expresión de sus sustratos (Bernstein y cols., 2009). Sin embargo, debido a que nuestros datos revelan un incremento significativo del RNAm de *ide*, es posible que la regulación tanto de los niveles como de la actividad de esta enzima se esté dando post-transcripcionalmente, tal y como se ha descrito en otros miembros de la familia de las metalopeptidasas (Toupance y cols., 2012). Por lo que, aunque este gen se perfila como un buen candidato genético en el estudio de la esquizofrenia, es necesario conocer a fondo sus mecanismos moleculares.

Otro de los transcritos abundantemente expresados en este estudio fue el gen *jag1*. La proteína resultante es el ligando de Notch 1, un receptor transmembranal que se activa antes de nacer e induce la diferenciación de la glía-radial (Gaiano y cols., 2000) y posterior al nacimiento promueve la diferenciación de células progenitoras a células de sostén de tipo astrogliia (Tanigaki y cols., 2001). En pacientes con esquizofrenia recientemente se evidenció que la expresión de *JAG1* fue significativamente mayor, con los mediadores canónicos de la vía Notch, la cual tiene influencia sobre la proliferación y el ciclo celular, además de participar en la síntesis de oligodendrocitos (Chambers y cols., 2001, Kerns y cols., 2010). Nosotros observamos sobre-expresión del gen *jag1* sólo en el grupo de ratas juveniles. A este respecto podríamos especular, que está sobre-expresión podría ser reflejo de la sobre actividad de esta vía, con vistas a promover la neurogénesis en respuesta al daño causado por la lesión neonatal, reactivándose así el desarrollo neuronal de los animales, mecanismo que quizá sea equiparable con la probable neurogénesis en pacientes con “lesiones” en el

neurodesarrollo que presentaron algunos pacientes con esquizofrenia (Genis-Mendoza y cols., 2013).

El gen *chrna4* que codifica para un receptor nicotínico de acetilcolina perteneciente a la super-familia de canales iónicos, este se encontró sub-expresado en el grupo de animales adultos. Como es bien sabido, esta clase de receptores juega un papel trascendental en la transmisión de las señales nerviosas en las sinapsis neuronales. Se ha sugerido que la disfunción colinérgica-nicotínica puede contribuir al deterioro cognitivo en la esquizofrenia, mediando la liberación de dopamina. Además, se ha visto que los déficits cognitivos en la esquizofrenia pueden ser remediados temporalmente por la administración de nicotina (López-Valdés y cols., 2003; Kishi y cols., 2008), por lo que desde entonces varios subtipos de receptores nicotínicos han sido considerados, candidatos en el estudio genómico de la enfermedad (De Luca y cols., 2006; Kishi y cols., 2008). En nuestro caso encontramos que la regulación del gen está sub-expresada, posiblemente derivada de la disfunción cognitiva que encontramos en los animales adultos lesionados.

Otro gen candidato potencial para su estudio es el gen *sod1*, que encontramos sub-expresado significativamente en ratas adultas. La proteína superóxido dismutasa 1, es una de dos isoenzimas humanas responsables de la destrucción de los radicales libres superóxido en las células. Las mutaciones en este gen han sido asociadas con ELA familiar (Shaw y cols., 2005). Una disminución en la expresión de la enzima superóxido dismutasa 1 puede potenciar el estrés oxidativo debido a una mayor vulnerabilidad de las células neuronales a los radicales libres, lo cual es congruente con el daño cerebral reportado en los pacientes con esquizofrenia (García-Valencia y cols., 2005). Por lo que posiblemente la sub-expresión del gen sea consecuencia del daño producido por la lesión neonatal.

Distintivamente, los dos genes sub-expresados: *sod1* y *chrna4*, sólo disminuyeron sus niveles en el grupo de ratas adultas, lo cual indica que estos

cambios pudieran estar asociados con la edad de inicio de la enfermedad, por lo que su estudio nos podría ayudar a proponer biomarcadores que nos ayuden a corroborar el diagnóstico clínico de la enfermedad, desde los primeros síntomas psicóticos.

Por otro lado, encontramos que el gen *limk2* se sobre-expresó en las ratas del grupo juvenil. Los genes *LIM* codifican un grupo de proteínas cinasas involucradas en diversas funciones biológicas. A pesar de que *limk2* no se ha asociado con esquizofrenia, se le ha relacionado con apoptosis, como proteína de protección a isquemia en un modelo de diabetes en rata (te Velthuis Aartjan y cols., 2007) y, en un modelo animal de Alzheimer se observó degeneración de las estructuras sinápticas con aumento en la expresión de *limk2* (Hou y cols., 2012). Se sabe que LIMK2 es fosforilada y activada por cinasas ROCK, y de esta manera fosforila a la cofilina, proteína que evita la polimerización de actina y favorece la despolimerización, necesarias para la motilidad celular (Croft y cols., 2011). Un aumento en la expresión de *limk2* podría estar perturbando la dinámica del citoesqueleto debido a fallas en la regulación de la actina, lo cual tendría implicaciones negativas en la migración neuronal temprana de las ratas juveniles lesionadas, en concordancia con nuestro modelo de esquizofrenia, probablemente esta disfunción en actina, no permite una migración neuronal normal, en los animales lesionados provocándoles conductas parecidas a la esquizofrenia (Genis-Mendoza y cols., 2013).

Finalmente, en el grupo de ratas jóvenes y adultas encontramos sobre-expresado al gen de carboxipeptidasa Z (*cpz*). La proteína posee un dominio N-terminal con un 30% de identidad aminoacídica con el dominio “frizzled” (Fzd), presente en las proteínas que interaccionan con Wnt (Song y cols., 1997, Reznik y cols., 2001). La carboxipeptidasa Z, abunda en la matriz extracelular de la placenta, se encuentra en menor cantidad en cerebro, pulmón, timo y riñón (Reznik y cols., 2001). La enzima glutamato carboxipeptidasa II (GCP II) miembro de esta familia, ha sido relacionada con la esquizofrenia, se encontró un

polimorfismo asociado (Guilarte y cols., 2008). Pero el gen *cpz* nunca antes había sido asociado a la enfermedad, por lo que es necesario seguir realizando investigaciones a este gen en otros modelos o en pacientes con esquizofrenia.

Aun cuando la función exacta de CPZ se desconoce, se sabe que interviene en la regulación del desarrollo embrionario a través de su interacción con proteínas Wnt. Además, se ha descrito que la expresión de CPZ en los tejidos adultos es mucho menor que en los órganos embrionarios (Reznik y cols., 2001). A su vez, en cultivos de neuronas de hipocampo, se ha visto que la señalización mediada por Wnt es transcendental para el desarrollo y la orientación axonal (Zhou y cols., 2004), regula la dinámica del citoesqueleto en el crecimiento del cono axonal y en la ramificación (Nathan y cols., 2011) y conduce a un incremento en la formación y organización de nuevas terminales presinápticas (Varela-Nallar y cols., 2009, Sahores y cols., 2003). Nuestros hallazgos mostraron que probablemente el gen *cpz* no se apagó luego del desarrollo embrionario y continuó sobre-expresándose en las ratas adultas lesionadas. Si esta proteína permanece altamente expresada en el cerebro adulto, es muy probable que exista una desregulación de la señalización mediada por Wnt.

Hasta la fecha, los genes *limk2* y *cpz* nunca antes habían sido asociados con la esquizofrenia y, debido a su significativa sobre-expresión en nuestro modelo de estudio, es de augurar que jueguen un papel transcendental en el desarrollo y curso de la misma. Sin lugar a dudas, futuras investigaciones y nuevas estrategias experimentales deberán ser diseñadas con el objeto de dilucidar la contribución de las proteínas LIMK2 y CPZ en esta enfermedad y establecer su papel como potenciales biomarcadores.

Con respecto a las tres áreas cerebrales valoradas (el núcleo accumbens, el hipocampo y la corteza prefrontal), en el grupo de animales lesionados se observó una reducción considerable del número de genes regulados, en comparación con el grupo de animales falsamente lesionados o *sham*. Esto es congruente con el deterioro cognitivo que se ha observado en los pacientes con esquizofrenia, donde se ha evidenciado deterioro y/o daño neuronal en el

hipocampo y en corteza prefrontal (Harms y cols., 2012). Dado al deterioro cognitivo que manifiestan los pacientes con esquizofrenia, es posible que el daño en la corteza prefrontal, se observe a largo plazo, lo cual es a su vez congruente con el modelo animal con LHVN, que se sustenta en la hipótesis del neurodesarrollo (Lillrank y cols., 1995; Hanlon y cols., 2012) y de que se ha visto que animales adultos presentan afectación de la morfogénesis de la región cortical-dorso-lateral (Tseng y cols., 2008), probablemente como resultado de esta lesión a largo plazo.

El presente trabajo presenta varias limitaciones:

A pesar de que se utilizan coordenadas estandarizadas para realizar la lesión neonatal, y el análisis de las pruebas conductuales, está presente el factor humano y los errores que esto conlleva.

Sobre el análisis de dopamina y de la expresión de los receptores (*drd2* y *drd3*) por PCR-TR y mediante microarreglos, es necesario realizar repeticiones metodológicas, que por la limitante del tejido, no pudieron realizarse.

10 CONCLUSIONES:

- a) La lesión por ácido iboténico en el hipocampo ventral de ratas neonatas, incidió en el neurodesarrollo y en la conducta tipo esquizofrenia en el grupo de ratas adultas.
- b) La concentración de dopamina evaluada en distintas regiones cerebrales en el grupo de animales lesionados, concuerdan con la hipótesis dopaminérgica, homologando posiblemente algunos de los síntomas de los pacientes con esquizofrenia.
- c) La sobre-expresión de *drd2* en linfocitos y la sub-expresión en la corteza prefrontal en ratas adultas con lesión neonatal en hipocampo ventral es similar a lo reportado en pacientes esquizofrénicos, por lo que esta molécula podría ser útil como biomarcador molecular en el diagnóstico de la esquizofrenia.
- d) Por otra parte, el análisis del transcriptoma de tres áreas cerebrales en el modelo de esquizofrenia de LNHV permitió identificar a 8 genes candidatos (*Sod1*, *Chrna4*, *Ppp3cb*, *Dctn1*, *Ide*, *Limk2* y *Jag1*), que podrían estar relacionados en la etología de la enfermedad.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abdul-Monim Z, Reynolds GP, Neill JC. The effect of atypical and classical antipsychotics on sub-chronic PCP-induced cognitive deficits in a reversal-learning paradigm. *Behav Brain Res.* 2006 May 15;169(2):263-73.

Ago Y. Beneficial effect of galantamine on sensory information-processing deficits. *Yakugaku Zasshi.* 2010 Oct;130(10):1305-10.

Al-Amin HA, Weinberger DR, Lipska BK. Exaggerated MK-801-induced motor hyperactivity in rats with the neonatal lesion of the ventral hippocampus. *Behav Pharmacol* 2000; 11(3-4): 269-278.

Alquicer G, Morales-Medina JC, Quirion R, Flores G. Postweaning social isolation enhances morphological changes in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of psychosis. *J Chem Neuroanat.* 2008 Mar;35(2):179-87.

American, Psychiatric, and Association, Diagnostic and statistical manual of mental disorders : DSM-IV-R. 2000: p. xxvii, 886 p.

Bahena-Trujillo; Gonzalo Flores; José A. Arias-Montañ Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el Sistema Nervioso Central. *Rev Biomed* 2000; 11:39-6.

Becker A, Grecksch G. Haloperidol and clozapine affect social behaviour in rats postnatally lesioned in the ventral hippocampus. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 76(1): 1-8.

Berg SA, Chambers RA. Accentuated behavioral sensitization to nicotine in the neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia. *Neuropharmacology.* 2008 Jun;54(8):1201-7

Bernstein HG, Ernst T, Lendeckel U, Bukowska A, Ansorge S, Stauch R, et al. Reduced neuronal expression of insulin-degrading enzyme in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with haloperidol-treated, chronic schizophrenia. *J. Psychiatric Res.* 2009; 43(13):1095-105.

Bönsch D, Wunschel M, Lenz B, Janssen G, Weisbrod M, Sauer H. Methylation matters? Decreased methylation status of genomic DNA in the blood of schizophrenic twins. *Psychiatry Res.* 2012 Aug 15;198(3):533-7.

Borison RL, Havdala HS, Diamond BI. Chronic phenylethylamine stereotypy in rats: a new animal model for schizophrenia? *Life Sci* 1977; 21(1): 117-122.

Borowski TB, Kokkinidis L. The effects of cocaine, amphetamine, and the dopamine D1 receptor agonist SKF 38393 on fear extinction as measured with potentiated startle: implications for psychomotor stimulant psychosis. *Behav Neurosci.* 1998 Aug;112(4):952-65.

Brady AM, Saul RD, Wiest MK. Selective deficits in spatial working memory in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of schizophrenia. *Neuropharmacology.* 2010 Dec;59(7-8):605-11

Brzózka MM, Radyushkin K, Wichert SP, Ehrenreich H, Rossner MJ. Cognitive and sensorimotor gating impairments in transgenic mice overexpressing the schizophrenia susceptibility gene Tcf4 in the brain. *Biol Psychiatry*. 2010 Jul 1;68(1):33-40.

Buckley PF, Miller BJ, Lehrer DS, Castle DJ. Psychiatric comorbidities and schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2009 Mar;35(2):383-402.

Cadet JL, Brannock C, Krasnova IN, Ladenheim B, McCoy MT, Chou J, Lehrmann E, Wood WH, Becker KG, Wang Y. Methamphetamine-induced dopamine-independent alterations in striatal gene expression in the 6-hydroxydopamine hemiparkinsonian rats. *PLoS One*. 2010 Dec 13;5(12):e15643.

Caronti, B., Calderaro, C., Passarelli, F., Palladini, G. and Pontieri, F.E. 1998. Dopamine receptor mRNAs in the rat lymphocytes. *Life sciences*, 62: 1919-25.

Castner SA, Goldman-Rakic PS, Williams GV. Animal models of working memory: insights for targeting cognitive dysfunction in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004 Jun;174(1):111-25.

Chambers CB, Peng Y, Nguyen H, Gaiano N, Fishell G, Nye JS. Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. *Development* 2001, 128(5):689–702.

Chambers RA, Moore J, McEvoy JP, Levin ED. Cognitive effects of neonatal hippocampal lesions in a rat model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1996; 15(6): 587-594.

Chen C, Cheng L, Grennan K, Pibiri F, Zhang C, Badner JA; Members of the Bipolar Disorder Genome Study (BiGS) Consortium, Gershon ES, Liu C. Two gene co-expression modules differentiate psychotics and controls. *Mol Psychiatry*. 2012 Nov 13.

Clinton SM, Sucharski IL, Finlay JM. Desipramine attenuates working memory impairments induced by partial loss of catecholamines in the rat medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)*. 2006 Jan;183(4):404-12. Epub 2005 Nov 24.

Croft D, Crichton D, Samuel M, Lourenco F, Munro J, Wood J, et al. p53-mediated transcriptional regulation and activation of the actin cytoskeleton regulatory RhoC to LIMK2 signaling pathway promotes cell survival. *Cell Res*. 2011;21(4):666-8.

Croft D, Crichton D, Samuel M, Lourenco F, Munro J, Wood J, Bensaad K, Vousden K, Sansom O, Ryan K, Olson M. p53-mediated transcriptional regulation and activation of the actin cytoskeleton regulatory RhoC to LIMK2 signaling pathway promotes cell survival. *Cell Res*, 2011; 21(4): 666–68.

De Luca V, Voineskos S, Wong G, Kennedy JL., Genetic interaction between alpha4 and beta2 subunits of high affinity nicotinic receptor: analysis in schizophrenia. *Experimental Brain Research*. 2006; 174(2):292-6.

Desbonnet L, O'Tuathaigh C, Clarke G, O'Leary C, Petit E, Clarke N, Tighe O, Lai D, Harvey R, Cryan JF, Dinan TG, Waddington JL. Phenotypic effects of repeated psychosocial stress during adolescence in mice mutant for the schizophrenia risk gene

neuregulin-1: a putative model of gene × environment interaction. *Brain Behav Immun*. 2012 May;26(4):660-71.

Distler MG, Opal MD, Dulawa SC, Palmer AA. Assessment of behaviors modeling aspects of schizophrenia in *Csmd1* mutant mice. *PLoS One*. 2012;7(12):e51235

El-Rawas R, Saadé NE, Thiriet N, Atweh S, Jaber M, Al-Amin HA. Developmental changes in the mRNA expression of neuropeptides and dopamine and glutamate receptors in neonates and adult rats after ventral hippocampal lesion. *Schizophr Res*. 2009 Sep;113(2-3):298-307.

Engelender S. Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Hum Mol Genet*. 1997;6(13):2205-12.

Engelender S. Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Hum Mol Genet*. 1997; 6(13):2205-12.

Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*. 1988 Nov 1;31(1):47-59.

Escamilla M, Hare E, Dassori AM, Peralta JM, Ontiveros A, Nicolini H, Raventós H, Medina R, Mendoza R, Jerez A, Muñoz R, Almasy L. A schizophrenia gene locus on chromosome 17q21 in a new set of families of Mexican and central american ancestry: evidence from the NIMH Genetics of schizophrenia in latino populations study. *Am J Psychiatry*. 2009 Apr;166(4):442-9.

Expression of dopamine receptors in the subthalamic nucleus of the rat: characterization using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and autoradiography. *Neuroscience*. 1999;91(2):549-56.

Fanous AH, Zhou B, Aggen SH, Bergen SE, Amdur RL, Duan J, Sanders AR, Shi J, Mowry BJ, Olincy A, Amin F, Cloninger CR, Silverman JM, Buccola NG, Byerley WF, Black DW, Freedman R, Dudbridge F, Holmans PA, Ripke S, Gejman PV, Kendler KS, Levinson DF; Schizophrenia Psychiatric Genome-Wide Association Study (GWAS) Consortium. Genome-wide association study of clinical dimensions of schizophrenia: polygenic effect on disorganized symptoms. *Am J Psychiatry*. 2012 Dec 1;169(12):1309-17.

Fineberg NA, Chamberlain SR, Hollander E, Boulougouris V, Robbins TW. Translational approaches to obsessive-compulsive disorder: from animal models to clinical treatment. *Br J Pharmacol*. 2011 Oct;164(4):1044-61.

Flores G, Liang JJ, Sierra A, Martínez-Fong D, Quirion R, Aceves J, Srivastava LK. *Biol Psychiatry*. 2010 Jul 1;68(1):51-60. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.03.019.

Flores G, Wood GK, Liang JJ, Quirion R, Srivastava LK. Enhanced amphetamine sensitivity and increased expression of dopamine D2 receptors in postpubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex. *J Neurosci*. 1996 Nov 15;16(22):7366-75.

Franke P, Wang T, Möthen MM, Knapp M, Neith H, Lichtermann D, Capellen KM, Sander T, Propping P, Maier W. Susceptibility for alcoholism: DRD4 exon III polymorphism: a case-control and a family-based association approach. *Addict Biol.* 2000 Jul 1;5(3):289-95.

Gaiano N, Nye JS, Fishell G. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron.* 2000; 26(2):395–404.

García-Valencia J, Miranda AL, López-Jaramillo CA, Palacio-Acosta CA, Gómez-Franco J, Opsina-Duque J. Esquizofrenia y Neurodesarrollo. *Revista colombiana de psiquiatría.* 2005; 34(01), 63-76.

Genis AD, López-Rubalcava C. ¿Es posible modelar esquizofrenia en un modelo animal? *El residente Vol. VI Número 2-2011:* 120-126.

Genis-Mendoza A, Tovilla-Zarate, Camarena Medellin B, Lanzagorta N, Escamilla, M., Nicolini H. Evidencia de ligamiento en el gen *drd4* en pacientes esquizofrénicos mexicanos. *Rev Latinoam Psiquiatría* 2012;11(2):33-37).

Genis-Mendoza, R. Ileana Gallegos-Silva, Mavil López-Casamichana, Carolina López-Rubalcaba, Humberto Nicolini. Gene expression profiles of nucleus accumbens, prefrontal cortex and hippocampus in an animal model of schizophrenia: a proposal for candidate genes. *Actas Esp Psiquiatr.* 2013 May;41(3):154-63.

Glahn DC, Almasy L, Barguil M, Hare E, Peralta JM, Kent JW Jr, Dassori A, Contreras J, Pacheco A, Lanzagorta N, Nicolini H, Raventós H, Escamilla MA. Neurocognitive endophenotypes for bipolar disorder identified in multiplex multigenerational families. *Arch Gen Psychiatry.* 2010 Feb;67(2):168-77.

Guilarte TR, Hammoud DA, McGlothlan JL, Caffo BS, Foss CA, Kozikowski AP, Pomper MG. Dysregulation of glutamate carboxypeptidase II in psychiatric disease. *Schizophr Res.* 2008; 99(1-3): 324–332.

Guo C, Yang Y, Su Y, Si T. Postnatal BDNF expression profiles in prefrontal cortex and hippocampus of a rat schizophrenia model induced by MK-801 administration. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:783297.

Gutiérrez-Galve L, Wheeler-Kingshott CA, Altmann DR, Price G, Chu EM, Leeson VC, Lobo A, Barker GJ, Barnes TR, Joyce EM, Ron MA. Changes in the frontotemporal cortex and cognitive correlates in first-episode psychosis.

Gutiérrez-Mariscal M, de Gortari P, López-Rubalcava C, Martínez A, Joseph-Bravo P. Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology.* 2008 Feb;33(2):198-213.

Hanlon FM, Houck JM, Pyeatt CJ, Lundy SL, Euler MJ, Weisend MP, Thoma RJ, Bustillo JR, Miller GA, Tesche CD. Bilateral hippocampal dysfunction in schizophrenia. *Neuroimage.* 2011; 58(4):1158-68.

Haque FN, Lipina TV, Roder JC, Wong AH. Social defeat interacts with Disc1 mutations in the mouse to affect behavior. *Behav Brain Res.* 2012 Aug 1;233(2):337-44.

Harms MP, Wang L, Csernansky JG, Barch DM Structure-function relationship of working memory activity with hippocampal and prefrontal cortex volumes. *Brain Struct Funct*. 2012;

Harvey PD, Bowie CR, Friedman JI Cognition in schizophrenia. *Curr Psychiatry Rep*. 2001 Oct;3(5):423-8.

Haukvik UK, McNeil T, Nesvåg R, Söderman E, Jönsson E, Agartz I. No effect of obstetric complications on basal ganglia volumes in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2010 May 30;34(4):619-23.

Homberg JR, Olivier JD, Blom T, Arentsen T, van Brunschot C, Schipper P, Korte-Bouws G, van Luijckelaar G, Reneman L. Fluoxetine exerts age-dependent effects on behavior and amygdala neuroplasticity in the rat. *PLoS One*. 2011 Jan 31;6(1):e16646.

Hou Y, Zhou L, Yang QD, Du XP, Li M, Yuan M, Zhou ZW. Changes in hippocampal synapses and learning-memory abilities in a streptozotocin-treated rat model and intervention by using fasudil hydrochloride. *Neuroscience*. 2012; 3;200:120-9.

Howes OD, Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III-the final common pathway. *Schizophr Bull* 2009; 35(3): 549-562.

Huerta-Rivas A, López-Rubalcava C, Sánchez-Serrano SL, Valdez-Tapia M, Lamas M, Cruz SL. Toluene impairs learning and memory, has antinociceptive effects, and modifies histone acetylation in the dentate gyrus of adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012 Jul;102(1):48-57.

Ilani T, Ben-Shachar D, Strous RD, Mazor M, Sheinkman A, Kotler M, Fuchs S. A peripheral marker for schizophrenia: Increased levels of D3 dopamine receptor mRNA in blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 16;98(2):625-8.

Jaber M, Robinson S, Missale C, Caron MG. Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* 1996; 35:1503-19.

Jablensky A. The concept of schizophrenia: pro et contra. *Epidemiol Psychiatr Soc*, 1999. 8(4): p. 242-7.

Javitt DC, Zukin SR, Heresco-Levy U, Umbricht D. Has an angel shown the way? Etiological and therapeutic implications of the PCP/NMDA model of schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2012 Sep;38(5):958-66.

Kamath A, Al-Khairi I, Bhardwaj S, Srivastava LK. Enhanced alpha1 adrenergic sensitivity in sensorimotor gating deficits in neonatal ventral hippocampus-lesioned rats. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008 Dec;11(8):1085-96.

Känzig S. A peripheral marker for schizophrenia: increased levels of D3-receptor-mRNA in blood lymphocytes. *Psychiatr Prax*. 2001 Jul;28(5):251-2.

Kawano, M. Sawada, K. Tsuru, E. Nishihara, M. Kato, K. Honer, WG, Shimodera S. (2011). Dopamine receptor D3R and D4R mRNA levels in peripheral lymphocytes in patients with schizophrenia correlate with severity of illness. *Open J Psychiatry*, 2011, 1: 33-39

Kerns D, Vong-Ghe S., Barley K, Dracheva S, Katsel P, Casaccia P, et al. Gene expression abnormalities and oligodendrocyte deficits in the internal capsule in schizophrenia. *Schizophr Res.* 2010; 120(1-3):150-8.

Khaitovich P, Lockstone HE, Wayland MT, Tsang TM, Jayatilaka SD, Guo AJ, Zhou J, Somel M, Harris LW, Holmes E et al. Metabolic changes in schizophrenia and human brain evolution. *Genome Biol* 2008; 9(8): R124.

Kim SF. Animal models of eating disorders. *Neuroscience.* 2012 Jun 1;211:2-12. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.03.024.

Kirkbride JB, Susser E, Kundakovic M, Kresovich JK, Davey Smith G, Relton CL. Prenatal nutrition, epigenetics and schizophrenia risk: can we test causal effects? *Epigenomics.* 2012 Jun;4(3):303-15.

Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, Genetic association analysis of tagging SNPs in alpha4 and beta2 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptor genes (CHRNA4 and CHRN2) with schizophrenia in the Japanese population. *Journal of Neural Transmission,* 2008; 115(10),1457-6

Knobil and Neill's *Jimmy D. Neill, Ph.D., Tony M. Plant, Ph.D., Donald W. Pfaff, Ph.D., John R.G. Challis, D.Sc., F.R.S.C., David M. de Kretser, M.D., A.O., JoAnne S. Richards, Ph.D., and Paul M. Wassarman.* Physiology of Reproduction. Third Edition. Copyright © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved. ISBN: 978-0-12-515400-0.

Kreiss DS, Coffman CF, Fiacco NR, Granger JC, Helton BM, Jackson JC, Kim LV, Mistry RS, Mizer TM, Palmer LV, Vacca JA, Winkler SS, Zimmer BA. Ritualistic Chewing Behavior induced by mCPP in the rat is an animal model of Obsessive Compulsive Disorder. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013 ;104:119-24.

Kurian SM, Le-Niculescu H, Patel SD, Bertram D, Davis J, Dike C. Identification of blood biomarkers for psychosis using convergent functional genomics. *Molecular Psychiatry* 2011; 16, 37–58.

Le Pen G, Grottick AJ, Higgins GA, Martin JR, Jenck F, Moreau JL. Spatial and associative learning deficits induced by neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats: further evaluation of an animal model of schizophrenia. *Behav Pharmacol* 2000; 11(3-4): 257-268.

Le Pen G, Kew J, Alberati D, Borroni E, Heitz MP, Moreau JL. Prepulse inhibition deficits of the startle reflex in neonatal ventral hippocampal-lesioned rats: reversal by glycine and a glycine transporter inhibitor. *Biol Psychiatry.* 2003 Dec 1;54(11):1162-70.

Lee PR, Brady DL, Shapiro RA, Dorsa DM, Koenig JI. Social interaction deficits caused by chronic phencyclidine administration are reversed by oxytocin. *Neuropsychopharmacology.* 2005 Oct;30(10):1883-94.

Lillrank SM, Lipska BK, Weinberger DR. Neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Clin Neurosci,* 1995; 3: 98-104.

Liou YJ, Chen CH, Cheng CY, Chen SY, Chen TJ, Yu YW, Nian FS, Tsai SJ, Hong CJ. Convergent evidence from mouse and human studies suggests the involvement of zinc finger protein 326 gene in antidepressant treatment response. *PLoS One*. 2012;7(5):e32984. doi: 10.1371/journal.pone.0032984.

Lipska BK, Weinberger DR. A neurodevelopmental model of schizophrenia: neonatal disconnection of the hippocampus. *Neurotox Res* 2002; 4(5-6): 469-475.

Lipska BK, Weinberger DR. Delayed effects of neonatal hippocampal damage on haloperidol-induced catalepsy and apomorphine-induced stereotypic behaviors in the rat. *Brain Res Dev Brain Res* 1993; 75(2): 213-222.

Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology* 2000; 23(3): 223-239.

Liu CM, Fann CS, Chen CY, Liu YL, Oyang YJ, Yang WC, et al. ANXA7, PPP3CB, DNAJC9, and ZMYND17 genes at chromosome 10q22 associated with the subgroup of Schizophrenia with deficits in attention and executive function. *Biol Psychiatry*. 2011;70(1):51-58

Lopez-Rubalcava C, Fernandez-Guasti A, Urba-Holmgren R. Age-dependent differences in the rat's conditioned defensive burying behavior: effect of 5-HT1A compounds. *Dev Psychobiol*. 1996 Mar;29(2):157-69.

López-Valdés H, García-Colunga J. La participación de los receptores de acetilcolina nicotínicos en trastornos del sistema nervioso central. *Salud mental*, 2003;26(3), 66-72
Lubow RE. Construct validity of the animal latent inhibition model of selective attention deficits in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2005; 31(1): 139-153.

Mahon PB, Eldridge H, Crocker B, Notes L, Gindes H, Postell E, King S, Potash JB, Ratnanather JT, Barta PE. An MRI study of amygdala in schizophrenia and psychotic bipolar disorder. *Schizophr Res*. 2012 Jul;138(2-3):188-91.

Malone DT, Kearn CS, Chongue L, Mackie K, Taylor DA. Effect of social isolation on CB1 and D2 receptor and fatty acid amide hydrolase expression in rats. *Neuroscience*. 2008 Mar 3;152(1):265-72.

Martínez-Mota L, Cruz-Martínez JJ, Márquez-Baltazar S, Fernández-Guasti A. Estrogens participate in the antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008 Jan;88(3):332-40.

Miyakawa T, Leiter LM., Gerber DJ, Gainetdinov RR, Sotnikova TD, Zeng H, et al. Conditional calcineurin exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003;100(15):8987-92.

Mostalac-Preciado CR, de Gortari P, López-Rubalcava C. Antidepressant-like effects of mineralocorticoid but not glucocorticoid antagonists in the lateral septum: interactions with the serotonergic system. *Behav Brain Res*. 2011;30;223(1):88-98.

Nathan D. Okerlund and Benjamin N. R. Cheyette. Synaptic Wnt signaling a contributor to major psychiatric disorders? *J Neurodev Disord*. 2011; 3(2): 162–174.

Ng MYM, Levinson DF, Faraone SV, Suarez BK, DeLisi LE, Arinami T, et al. Metaanalysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*. 2009;14(8):774–785.

Nicolini H, Cruz C, Camarena B, Orozco B, Kennedy JL, King N, Weissbecker K, de la Fuente JR, Sidenberg D. DRD2, DRD3 and 5HT2A receptor genes polymorphisms in obsessive-compulsive disorder. *Mol Psychiatry*. 1996;1(6):461-5.

Ochoa S, Usall J, Cobo J, Labad X, Kulkarni Gender differences in schizophrenia and first-episode psychosis: a comprehensive literature review. *J. Schizophr Res Treatment*. 2012;2012:916198.

O'Tuathaigh CM, Waddington JL. Mutant mouse models: phenotypic relationships to domains of psychopathology and pathobiology in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 2010;36(2):243-5.

Padín JF, Rodríguez MA, Domínguez E, Dopeso-Reyes IG, Buceta M, Cano E, Sotelo E, Brea J, Caruncho HJ, Isabel Cadavid M, Castro M, Isabel Loza M. Parallel regulation by olanzapine of the patterns of expression of 5-HT2A and D3 receptors in rat central nervous system and blood cells. *Neuropharmacology*. 2006;51(4):923-32.

Pappas GD, Kriho V, Liu WS, Tremolizzo L, Lugli G, Larson J. Immunocytochemical localization of reelin in the olfactory bulb of the heterozygous reeler mouse: an animal model for schizophrenia. *Neurol Res* 2003; 25(8): 819-830.

Patestas M, Leslie P. Gartner. *Neuroanatomía Clínica* Editorial, Manual Moderno, primera edición 2008. Pp:195, 341-350.

Paxinos, G. & Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*, compact third edition , Academic Press. 1997.

Peleg-Raibstein D, Knuesel I, Feldon J. Amphetamine sensitization in rats as an animal model of schizophrenia. *Behav Brain Res* 2008; 191(2): 190-201.

Petronis A, Gottesman II, Kan P, Kennedy JL, Basile VS, Paterson AD, Pependikyte V. Monozygotic twins exhibit numerous epigenetic differences: clues to twin discordance? *Schizophr Bull*. 2003;29(1):169-78.

Poreh AM, K Chapin, MD Rosen, and I Youssef, Correlations between the MMPI and the Scale for the Assessment of Positive Symptoms and the Scale for the Assessment of Negative Symptoms in schizophrenic patients. *J Pers Assess*, 1994.63(2): p. 275-83.

Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 1977; 266(5604): 730-732.

Powell SB. Models of neurodevelopmental abnormalities in schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci*. 2010;4:435-81.

Rakic, P. 2000. Radial unit hypothesis of neocortical expansion. Novartis Found Symp, 228: 30-42.

Reznik SE, Frickerb LD. Carboxypeptidases from A to Z: implications in embryonic development and Wnt binding. Cell. Mol. Life Sci. 2001; 58:1790–1804.

Rideout AL, Carroll JC, Blaine SM, Cremin C, Dorman H, Gibbons CA, Honeywell C, Meschino WS, Permaul J, Allanson J. Genetics: schizophrenia. Can Fam Physician 2009; 55(12): 1207.

Risterucci C, Jeanneau K, Schoppenthau S, Bielser T, Kunnecke B, von Kienlin M, Moreau JL. Functional magnetic resonance imaging reveals similar brain activity changes in two different animal models of schizophrenia. Psychopharmacology (Berl) 2005; 180(4):724-734.

Rogóż Z, Kabziński M, Sadaj W, Rachwalska P, Gądek-Michalska A. Effect of co-treatment with fluoxetine or mirtazapine and risperidone on the active behaviors and plasma corticosterone concentration in rats subjected to the forced swim test. Pharmacol Rep. 2012 Nov;64(6):1391-9.

Rubinstein G. Schizophrenia, infection and temperature. An animal model for investigating their interrelationships. Schizophr Res 1993; 10(2): 95-102.

Rueter LE, Ballard ME, Gallagher KB, Basso AM, Curzon P, Kohlhaas KL. Chronic low dose risperidone and clozapine alleviate positive but not negative symptoms in the rat neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia. Psychopharmacology (Berl). 2004 Nov;176(3-4):312-9.

Sahores M, Gibb A, Salinas PC. Frizzled-5, a receptor for the synaptic organizer Wnt7a, regulates activity-mediated synaptogenesis. Development. 2010; 137(13):2215-25.

Sams-Dodd F, Lipska BK, Weinberger DR. Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. Psychopharmacology (Berl) 1997; 132(3): 303-310.

Schultz SK and NC Andreasen, Schizophrenia. Lancet, 1999. 353(9162): p. 1425-30.

Seeman P, Hall FS, Uhl G. Increased dopamine D2High receptors in knockouts of the dopamine transporter and the vesicular monoamine transporter may contribute to spontaneous hyperactivity and dopamine supersensitivity. Synapse. 2007 Jul;61(7):573-6.

Serretti, A., Lorenzi, C., Mandelli, L., Cichon, S., Schumacher, J. et al. DRD4 exon 3 variants are not associated with symptomatology of major psychoses in a German population. Neurosci Lett 2004(3);368:269-273.

Shaw PJ, Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry 2005;76 (8):1046-1057.

Sigala S, Missale C, Spano P. Opposite effects of dopamine D2 and D3 receptors on learning and memory in the rat. Eur J Pharmacol. 1997 Oct 8;336(2-3):107-12.

Sigurdsson T, Stark KL, Karayiorgou M, Gogos JA, Gordon JA. Impaired hippocampal-prefrontal synchrony in a genetic mouse model of schizophrenia. *Nature*. 2010 Apr 1;464(7289):763-7.

Silva-Gómez AB, Bermudez M, Quirion R, Srivastava LK, Picazo O, Flores G Comparative behavioral changes between male and female postpubertal rats following neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Brain Res*. 2003 May 30;973(2):285-92.

Song L, Fricker LD. Cloning and expression of human carboxypeptidase Z, a novel metallo-carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 1997; 272(16):10543-50.

Swerdlow NR, Halim N, Hanlon FM, Platten A, Auerbach PP. Lesion size and amphetamine hyperlocomotion after neonatal ventral hippocampal lesions: more is less. *Brain Res Bull* 2001; 55(1): 71-77.

Szoke. A. Epidemiology of schizophrenic disorders, genetic and environmental risk factors. *Rev Prat*. 2013 Mar;63(3):331-5.

Tallerico T, Novak G, Liu IS, Ulpian C, Seeman P. Schizophrenia: elevated mRNA for dopamine D2(Longer) receptors in frontal cortex. *Brain Res Mol Brain Res*. 2001 Mar 5;87(2):160-5.

Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, Tashiro K, Kurooka H, Honjo T. Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* 2001; 29(1):45–55.

te Velthuis Aartjan JW, Bagowski CP. PDZ and LIM domain–encoding genes: molecular interactions and their role in development. Review Article. *The ScientificWorld JOURNAL* 2007; 7, 1470–1492.

Teicher MH, Andersen SL, Polcari A, Anderson CM, Navalta CP. Developmental neurobiology of childhood stress and trauma. *Psychiatr Clin North Am*. 2002 Jun;25(2):397-426, vii-viii.

Toda M, Abi-Dargham A. Dopamine hypothesis of schizophrenia: making sense of it all. *Curr Psychiatry Rep*. 2007 Aug;9(4):329-36.

Toupance S, Brassart B, Rabenoelina F, Ghoneim C, Vallar L, Polette M, Debelle, L, Birembaut P. Elastin-derived peptides increase invasive capacities of lung cancer cells by post-transcriptional regulation of MMP-2 and uPA. *Clin Exp Metastasis*. 2012; 29(5):511-22.

Tseng JR, Kang KW, Dandekar M, Yaghoubi S, Lee JH, Christensen JG, Preclinical efficacy of the c-Met inhibitor CE-355621 in a U87 MG mouse xenograft model evaluated by 18F-FDG small-animal PET. *J Nucl Med*, 2008; 49: 129-34.

Tucker, D. M., Derryberry, D., & Luu, P. Anatomy and Physiology of Human Emotion: Vertical Integration of Brainstem, Limbic, and Cortical Systems. In J. Borod (Ed.), *Handbook of the Neuropsychology of Emotion*. 2000; New York: Oxford.

Tye KM, Mirzabekov JJ, Warden MR, Ferenczi EA, Tsai HC, Finkelstein J, Kim SY, Adhikari A, Thompson KR, Andalman AS, Gunaydin LA, Witten IB, Deisseroth K. Dopamine neurons modulate neural encoding and expression of depression-related behaviour. *Nature*. 2013 Jan 24;493(7433):537-41.

Urban NB, Slifstein M, Thompson JL, Xu X, Girgis RR, Raheja S, Haney M, Abi-Dargham A. Dopamine release in chronic cannabis users: a [¹¹C]raclopride positron emission tomography study. *Biol Psychiatry*. 2012 Apr 15;71(8):677-83.

Urraca N, Camarena B, Aguilar A, Fresán A, Apiquián R, Orozco L, Carnevale A, Nicolini H. Association study of DRD3 gene in schizophrenia in Mexican sib-pairs. *Psychiatry Res*. 2011 Dec 30;190(2-3):367-8.

Van Tol HH, Wu CM, Guan HC, Ohara K, Bunzow JR, Civelli O, Kennedy J, Seeman P, Niznik HB, Jovanovic V. Multiple dopamine D4 receptor variants in the human population. *Nature*. 1992 Jul 9;358(6382):149-52.

Varela-Nallar L, Grabowski CP, Alfaro IE, Alvarez AR, Inestrosa NC. Role of the Wnt receptor Frizzled-1 in presynaptic differentiation and function. *Neural Dev*. 2009; 24:41.

Venkatasubramanian G, Debnath M. The TRIPS (Toll-like receptors in immuno-inflammatory pathogenesis) Hypothesis: a novel postulate to understand schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2013 Apr 12.

Vogel M, Pfeifer S, Schaub RT, Grabe HJ, Barnow S, Freyberger HJ, Cascorbi I. Decreased levels of dopamine D3 receptor mRNA in schizophrenic and bipolar patients. *Neuropsychobiology*. 2004;50(4):305-10.

Walker J, V Curtis, and RM Murray, Schizophrenia and bipolar disorder:similarities in pathogenic mechanisms but differences in neurodevelopment. *Int Clin Psychopharmacol*, 2002. 17 Suppl 3: p. S11-9.

Wei L, Sun D, Yin Z, Yuan Y, Hwang A, Zhang Y, et al. A PKC-beta inhibitor protects against cardiac microvascular ischemia reperfusion injury in diabetic rats. *Apoptosis*. 2010; 15(4):488-98.

Weinmann O, Schnell L, Ghosh A, Montani L, Wiessner C, Wannier T, Rouiller E, Mir A, Schwab ME. Intrathecally infused antibodies against Nogo-A penetrate the CNS and downregulate the endogenous neurite growth inhibitor Nogo-A. *Mol Cell Neurosci*. 2006 May-Jun;32(1-2):161-73.

Wicks S, Hjern A, Dalman C. Social risk or genetic liability for psychosis? A study of children born in Sweden and reared by adoptive parents. *Am J Psychiatry*. 2010 Oct;167(10):1240-6.

Willner P. Handdook of depression and anxiety. Abiological approach. N.Y.: Maercel Dekker; 1994.

Woelk CH, Singhanian A, Pérez-Santiago J, Glatt SJ, Tsuang MT. The utility of gene expression in blood cells for diagnosing neuropsychiatric disorders. *Int Rev Neurobiol.* 2011;101:41-63.

Wood GK, Lipska BK, Weinberger DR. Behavioral changes in rats with early ventral hippocampal damage vary with age at damage. *Brain Res Dev Brain Res* 1997; 101(1-2): 17-25

Wu K, Hanna GL, Rosenberg DR, Arnold PD. The role of glutamate signaling in the pathogenesis and treatment of obsessive-compulsive disorder. *Pharmacol Biochem Behav.* 2012 Feb;100(4):726-35.

Xu C, Aragam N, Li X, Villa EC, Wang L, Briones D, Petty L, Posada Y, Arana TB, Cruz G, Mao C, Camarillo C, Su BB, Escamilla MA, Wang K. BCL9 and C9orf5 Are Associated with Negative Symptoms in Schizophrenia: Meta-Analysis of Two Genome-Wide Association Studies. *PLoS One.* 2013;8(1):e51674.

Young JW, Zhou X, Geyer MA. Animal models of schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci.* 2010;4:391-433.

Young JW, Zhou X, Geyer MA. Animal models of schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci.* 2010;4:391-433.

Zendehrouh S, Bakouie F, Gharibzadeh S. Modeling schizophrenic-like neuronal patterns using nonlinear delayed differential equations. *Comput Biol Med.* 2009 Nov;39(11):1058-62.

Zhang AP, Yu J, Liu JX, Zhang HY, Du YY, Zhu JD, He G, Li XW, Gu NF, Feng GY, He L. The DNA methylation profile within the 5'-regulatory region of DRD2 in discordant sib pairs with schizophrenia. *Schizophr Res.* (2007) Feb;90(1-3):97-103.

Zhou CJ, Zhao C, Pleasure SJ. Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities. *J Neurosci.* 2004; 24(1):121-6.

Zvara A, Szekeres G, Janka Z, Kelemen JZ, Cimmer C, Sántha M, Puskás LG. Over-expression of dopamine D2 receptor and inwardly rectifying potassium channel genes in drug-naïve schizophrenic peripheral blood lymphocytes as potential diagnostic markers. *Dis Markers.* 2005;21(2):61-9.

12 ANEXO 1: MANEJO DE ANIMALES PARA EXPERIMENTACIÓN

El empleo de animales en la investigación y enseñanza involucra responsabilidad de quienes los utilizan; por tanto, es un deber evitar la crueldad y procurar su bienestar.

Es obligación de quien manipula animales con fines de estudio, procurar darles un trato y cuidado apropiado y digno, desde los procedimientos de captura y durante su mantenimiento en condiciones de cautiverio previo al manejo en el laboratorio.

Asimismo, se deberá contar con la preparación adecuada y conocimientos actualizados para aplicar el principio de las 3R (Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) en el manejo de animales en el laboratorio: Reemplazar (utilización de alternativas que produzcan los mismos resultados, tales como experimentos *in vitro*, cultivos celulares, modelos inanimados, modelos por computadora), Reducir (utilizar un número mínimo de animales), Refinar (utilizar técnicas adecuadas para evitar al máximo el sufrimiento).

Los investigadores deben entender estas necesidades antes de introducir un experimento. Los resultados de la investigación con modelos animales proporcionan la información necesaria para diseñar pruebas humanas. Esto es crítico tanto por razones científicas, como éticas para no sobrecargar en exceso al ser humano, muchos de los experimentos que se realizan, pueden responderse en corto tiempo en animales, ya que tienen un ciclo reproductivo mucho más corto que el humano.

En los códigos de ética para la investigación biomédica, los ensayos con animales tienen la obligación, de seguir el código de Nuremberg “cualquier experimento hecho en seres humanos, debe ser diseñado y basado en los resultados de la experimentación animal”.

La declaración de Helsinski adoptada en 1964 por la XIII asamblea Medica Mundial, y revisada en cinco ocasiones, cita también que la investigación médica en sujetos “debe ser basada en pruebas de laboratorio adecuadamente realizadas y en experimentación con animales”.

En los últimos años y debido sobre todo al enorme avance en los conocimientos sobre los adelantos moleculares de las enfermedades se ha incrementado la necesidad de disponer de modelos animales genéticamente definidos, es decir en los cuales las modificaciones genéticas que predisponen o participan en el desarrollo de la enfermedad, esta necesidad unida al gran avance de la tecnología para la manipulación genética en mamíferos, ha conducido al desarrollo de modelos animales genéticamente modificados, estos son generalmente murinos que recapitulan muchos de los procesos que tienen lugar en la patología de las enfermedades humanas, permitiendo estudiar y reproducir los síntomas en forma controlada, proporcionando una visión más adecuada del proceso de la enfermedad y permitiendo tener mejores modelos experimentales para desarrollar y ensayar nuevas terapias.

Desde el punto de vista bioético la situación creada para la obtención de animales transgénicos portadores de genes humanos fue para la obtención de proteínas terapéuticas humanas, no es esencialmente nuevo ya que desde los primeros tiempos de la ingeniería genética molecular, se han introducido genes humanos en células humanas para obtener proteínas humanas, como la insulina, hormona del crecimiento, interferon etc. En general no se afecta ni la salud ni la integridad del animal, al quedar refringida la expresión de un gen humano en un órgano en particular, su fisiología y desarrollo no se ven alterados y por tanto se evita cualquier daño a este.

En México para garantizar el bienestar del animal para experimentación, cada institución que utiliza animales debería establecer un comité institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), que supervise examine y vigile cada posible experimento. Estos comités deberían incluir a miembros de la comunidad científica, un bioestadista, un miembro de la comunidad, y un veterinario.

Algunos de los aspectos más importantes para cualquier proyecto que involucre la utilización de modelos animales son:

a) Instrucción y capacitación de personal profesional y técnico: el personal debe saber que los cuidados que rodean al animal influyen en forma directa sobre el resultado de los experimentos, el estado de bienestar de los animales esta íntimamente ligado a su capacidad de respuesta, de esta ultima inquietud, nació el uso de animales libres de patógenos específicos y de gérmenes, como condición para obtener resultados experimentales confiables y reproducibles.

b) Las condiciones de alojamiento son importantes, la cantidad de animales por caja, existe actualmente una tendencia a aumentar el espacio por animal e inclusive a estimular sus actividades por medio de ruedas u otros accesorios, las temperaturas extremas, la falta de renovación de aire, las altas concentraciones de amoniaco etc. Someten a los animales a sufrimientos innecesarios e invalidan los resultados desde el punto de vista experimental. Ellos tienen necesidades fisiológicas y de comportamiento que deben ser identificadas y proporcionadas para cada especie.

c) Buenas prácticas de sujeción, inyección, analgesia, anestesia y eutanasia, el animal de laboratorio es un ser vivo, por tanto sensible a cualquier procedimiento capaz de causar dolor y compasión en sus cuidadores.

13 ANEXO 2: ARTÍCULOS PUBLICADOS

- 1.- **Genis-Mendoza AD**, Gallegos-Silva RI, López-Casamichana M, López-Rubalcava C, Nicolini H. **Gene expression profiles of nucleus accumbens, prefrontal cortex and hippocampus in an animal model of schizophrenia: proposed candidate genes.** Actas Esp Psiquiatr. 2013 May;41(3):154-63.
- 2.- **Genis-Mendoza A**, Tovilla-Zarate, Camarena Medellin B, Lanzagorta N, Escamilla, M., Nicolini H.. **Evidencia de ligamiento en el gen *drd4* en pacientes esquizofrénicos mexicanos.** Rev Latinoam Psiquiatría 2012;11(2):33-37).
- 3.- **Alma Delia Genis, Carolina López-Rubalcava** **¿Es posible modelar esquizofrenia en un modelo animal?.** *El residente* Vol. VI Número 2-2011: 120-126.

Alma D. Genis-Mendoza^{1,2}
 R. Ileana Gallegos-Silva¹
 Mavil López-Casamichana¹
 Carolina López-Rubalcava³
 Humberto Nicolini^{1,2}

Gene expression profiles of nucleus accumbens, prefrontal cortex and hippocampus in an animal model of schizophrenia: proposed candidate genes

¹Universidad Autónoma de la Ciudad de México
 D.F. México

²Instituto Nacional de Medicina Genómica
 Servicios de atención psiquiátrica, Secretaría de Salud
 D.F. México

³Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
 (CINVESTAV-Sede Sur) Departamento de Fármaco-biología
 D.F. México

Introduction: It has been suggested that schizophrenia may be induced by "accidents" or injuries that occur during early brain development and result in a reduction of the neural connections in different regions. In this study, we evaluated differences in the expression of brain genes using a recognized experimental prototype of schizophrenia: the animal model of ventral hippocampal lesion in neonate rats (VHLN) compared to control animals.

Methods: Using microarray technology, we obtained gene expression profiles of three brain areas (nucleus accumbens, prefrontal cortex and hippocampus) of juvenile (45 days) and adult (90 days) Wistar male rats that underwent either VHLN or sham VHLN.

Results: Based on three criteria: 1) expression in more than one brain area, 2) participation in cellular pathways relevant to the central nervous system (CNS), 3) Z-score values >2 (overexpression) and <-2 (underexpression), we found overexpression of the *ppp3cb*, *dctn1*, *jag1*, *ide*, *limk2* and *cpz* genes and underexpression of *chrna4* and *sod1*.

Conclusions: Two of the genes proposed in this paper, *limk2* and *cpz*, have not been previously associated with schizophrenia, so future studies will be necessary to understand their possible role in the pathogenesis of this disease.

Keywords: Schizophrenia, Animal model, Microarrays, Expression, Candidate genes

Actas Esp Psiquiatr 2013;41(3):154-63

Perfiles de expresión génica de núcleo accumbens, corteza prefrontal e hipocampo en un modelo animal de Esquizofrenia: una propuesta de genes candidatos

Introducción: Se ha sugerido que la Esquizofrenia puede ser inducida por "accidentes" o lesiones durante el desarrollo temprano del cerebro del individuo, que conllevan a una reducción en las conexiones neuronales de diferentes regiones. En este trabajo, hemos evaluado las diferencias en la expresión de genes cerebrales, usando un reconocido prototipo experimental para Esquizofrenia: el modelo animal de lesión en hipocampo ventral en ratas neonatas (LHVN), respecto a animales control.

Metodología: Mediante la técnica de chips de ADN, se obtuvieron los perfiles de expresión génica de tres áreas cerebrales (núcleo accumbens, corteza prefrontal e hipocampo) de ratas macho Wistar juveniles (45 días) y adultas (90 días) sometidas o no a LHVN.

Resultados: Con base a tres criterios: 1) expresión en más de un área cerebral, 2) participación en rutas celulares relevantes para el sistema nervioso central (SNC), 3) valores de Z-score >2 (sobre-expresión) y <-2 (sub-expresión); se encontraron sobre-expresados los genes: *ppp3cb*, *dctn1*, *jag1*, *ide*, *limk2* y *cpz*, y sub-expresados: *chrna4* y *sod1*.

Conclusiones: Dos de los genes propuestos en este trabajo: *limk2* y *cpz*, no han sido relacionados previamente con Esquizofrenia, por lo que se hará necesario realizar estudios futuros para dilucidar sus respectivas contribuciones en la etiopatogenia de esta enfermedad.

Palabras clave: Esquizofrenia, Modelo animal, Microarreglos, Expresión, Genes candidatos

Correspondence:

Humberto Nicolini, M.D., PhD.
 Carracci Medical Group, Carracci 107
 Insurgentes Extremadura
 México D.F., 13740, México.
 Phone: (5255)5611-3028
 Fax: (5255)5611-3028,
 E-mail: nicolini_humberto@yahoo.com

INTRODUCTION

Schizophrenia is a serious mental disorder that affects 1 in 100 people worldwide and is characterized by distorted thoughts and perceptions that are probably due to alterations in different neurotransmitter systems^{1,2}. Various hypotheses have been proposed to explain the pathogenesis of this disease, the genetic component being the most important³. However, due to the unavailability of brain tissues from patients and healthy controls for this type of studies, experimental animal models have been used^{4,5}.

The implementation and use of animal models in psychiatry has clear limitations because we are attempting to reproduce complex human behaviors in a healthy animal⁴⁻⁶. Nonetheless, animal models of psychiatric disorders have made it possible to explore the therapeutic potential of specific drugs for treating these disorders, and to obtain relevant data about the mechanisms of action of these drugs; models are also valuable tools for determining the neurobiological substrates of psychiatric disorders⁷. For the study of schizophrenia, several animal models, pharmacological models (using phencyclidines [PCP] and ketamine)⁸⁻¹⁰, genetic models (induced by genetic mutations or deletions)¹¹⁻¹³ and neurodevelopmental models (induced by physical or neurotoxic lesions and environmental factors during neural development) have been proposed¹⁴⁻¹⁶.

It has been suggested that schizophrenia may be due to "injuries" that occur during the early brain development of the individual and reduce neural connections in different limbic regions and the prefrontal cortex¹⁴.

The ventral hippocampal lesion in neonate rats (VHLN) model has been widely tested. In this model, a small excitotoxic lesion is made in the hippocampus of the immature brain of neonate rats and the rats are then allowed to mature further. It has been observed that the injured animals, in the adult stage, exhibit conduct related to the positive and negative symptoms of schizophrenia, such as hyperlocomotion, reduction in prepulse inhibition, memory deficits and decreased social interaction, among other^{15,16}.

DNA microarrays are a valuable genomic tool for studying complex diseases, facilitating the global evaluation of expression of a large number of genes in various tissues and/or physiological conditions¹⁷. Using this methodology, we obtained gene expression profiles at 45 and 90 days for three different brain areas (hippocampus, prefrontal cortex and nucleus accumbens) of male Wistar rats with a neonatal lesion in ventral hippocampus (VHLN). These profiles were compared with those of animals with sham lesions, considered negative controls of the disease, in order to detect significant changes in gene expression that could be related to the schizophrenia phenotype in both juvenile and adult rats.

METHODOLOGY

Biological material

The study began with twenty male Wistar rats from litters of rats inseminated in the laboratory and kept in individual isolation cages under inverted 12-hour light-dark cycle conditions. The total sample was divided into four groups: a) 5 VHLN-juvenile rats, b) 5 sham injured juvenile rats, c) 5 VHLN-adult rats, d) 5 sham injured adult rats. All experiments were performed according to the regulations established by the Mexican official standard for the use and care of laboratory animals "NOM-062-ZOO-1999" and the regulations of the ethics committee of the International Association for the Study of Pain¹⁸.

Newborn rats (10-13 g weight) were injured between days 5 and 7: the pups were randomly assigned to injury with ibotenic acid or sham injury with PBS. The animals were anesthetized using hypothermia by placing them on ice for 10-15 minutes. In order to perform bilateral lesions, the animals were immobilized on a Kopf stereotaxic fixed platform: an incision was made in the scalp and either ibotenic acid (0.15 µl/min for 2 min) (Sigma) or PBS (sham lesion) was administered through a needle according to the following coordinates: anteroposterior (AP) -2.5, mediolateral ±2.5 and dorsoventral (DV) -3.3 in relation to Bregma¹⁹.

The animals were sacrificed by decapitation at 45 days (juvenile group: VHLN and sham) and 90 days (adult group: VHLN and sham). The hippocampus, prefrontal cortex and nucleus accumbens were dissected according to previously standardized procedures²⁰ and frozen at -80°C until RNA extraction.

RNA extraction

RNA was extracted from the 3 previously dissected brain areas using TRIZOL (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions.

Microarray design, reading and standardization:

Five thousand *Rattus norvegicus* oligonucleotides from the Oligosets Operon (http://www.operon.com/arrays/oligosets_overview.php) library were used. The microarray design and manufacture was carried out at the Cellular Physiology Unit of the National University of Mexico (UNAM)²¹.

Microarray hybridization started with 10 µg of total RNA, from which dUTP-Cy3 or dUTP-Cy5-labeled cDNA was generated with the CyScribe First-Strand cDNA kit (Amersham). Fluorophore uptake was confirmed by reading the absorbance at 555 nm for Cy3 and at 655 nm for Cy5²¹.

Table 1 The number of genes that did not change expression is shown in the first part. The number of genes that significantly changed expression after normalization is shown in the lower part. (Alma D. Genis-Mendoza)

	Juveniles		Adults	
	Unchanged genes	%	Unchanged genes	%
	4348	86.95	4331	86.61

	JUVENILES					ADULTS				
	Down	%	Up	%	Total (%)	Down	%	Up	%	Total (%)
N. ACCUMBENS	326	6.52	317	6.34	12.86	351	7.02	291	5.82	12.83
PREFRONTAL CORTEX	362	7.24	302	6.04	13.28	372	7.44	310	6.20	13.64
HIPPOCAMPUS	321	6.42	329	6.58	13.00	351	7.02	333	6.66	13.68

Signal and image acquisition and quantification was carried out with ScanArray 4000 equipment and ScanArray 4000 (Packard Biochip) software. All images were captured using 65% PMT gain, 70-75% laser power and 10-micron resolution at a 50% sweep rate. For each point labeled with Cy3 or Cy5, we calculated the average density and mean background value with Array Pro Analyzer (Cybernetics) software²¹. Gene expression was analyzed with the genArise statistical program developed at the Computer Unit of the Cellular Physiology Unit, UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>) to evaluate the degree of variation in gene expression (z-score). According to this criterion, elements with a z-score value greater or less than two standard deviations are differentially expressed genes²¹.

RESULTS

After standardization, our analysis identified 652 genes that significantly changed their expression, of which 316 were found to be overexpressed (OE) and 336 were underexpressed (UE). The percentage of OE and UE genes for young rats was observed to be almost the same (about 6.5%), whereas the UE gene percentage (7%) was slightly higher than the OE gene percentage (6%) for adult rats. However, the overall percentage of genes that modulated their expression for each tissue remained at $13\% \pm 0.38$ (Table 1). Genes were sorted into 3 groups according to the z-score (>1 and <-1 , >2 and <-2 , and >3 and <-3). Subsequently, to identify the metabolic and signaling pathways involved in each of the proteins encoded by these genes, we accessed the KEGG metabolic pathways database (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>), which is a genomic mapping tool.

Gene group with z-score value >1 and <-1

At this stage, general information was obtained for both overexpressed and underexpressed genes, and a list of all the metabolic pathways for each brain area and the number of genes involved was prepared. We then selected

and plotted the pathways in which a higher number of genes (more than 5 genes) were modulated. Among the most compromised pathways were neuroactive ligand-receptor interaction (>10 genes), calcium signaling (>7 genes) and cancer (>7 genes). It is noteworthy that there were genes whose modulation was significant for two or more pathways.

Group of genes with z-score value >2 and <-2

We worked with genes with a z-score value greater than 2 and less than -2 for each tissue for a more robust analysis. Eighteen pathways associated with mental disorders were selected. For each tissue, the metabolic pathways of interest and participating genes were plotted against z-scores (Figure 1).

Because the same gene could be expressed in two or more of the brain areas evaluated (nucleus accumbens, hippocampus and prefrontal cortex), we looked for genes that were expressed in more than one area of interest in order to limit our analysis. As can be seen in Figure 2, in both the juvenile and adult groups, the expression of certain genes is regulated coincidentally in more than one tissue. We found a higher number of underexpressed genes than overexpressed genes, the group of adult rats having the highest number of underexpressed genes. Interestingly, among the overexpressed genes, *ppp3cb* and *dctn1* modulated their expression in all three areas of the brain and in both stages (juvenile and adult).

Group of genes with z-score values >3 and <-3

Lastly, the genes that presented larger changes in expression compared to their control group were analyzed. Similarly, genes that modulated their expression in more than one tissue were detected. Of all of these, *ppp3cb* varied

z-score >2 and <-2

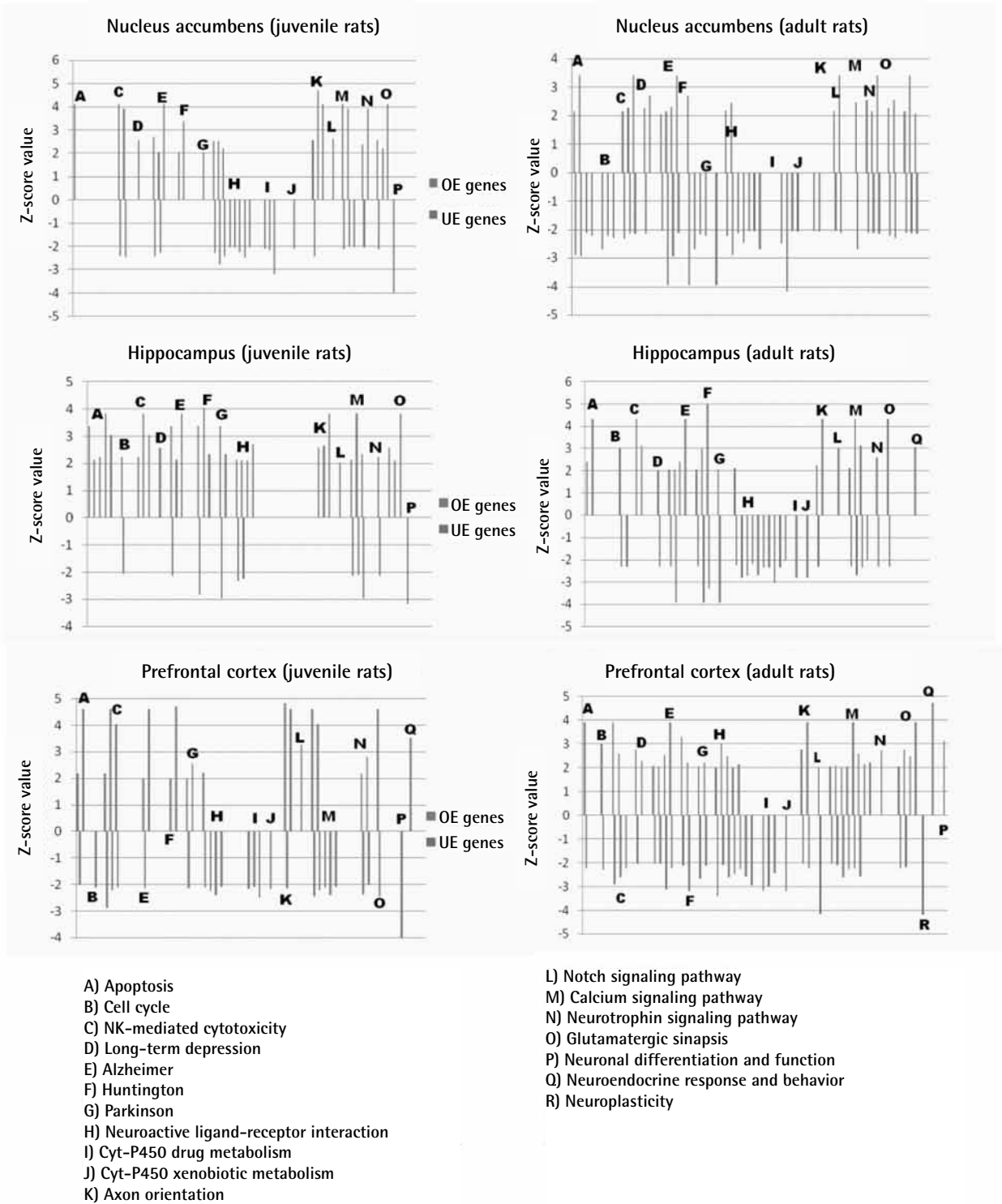
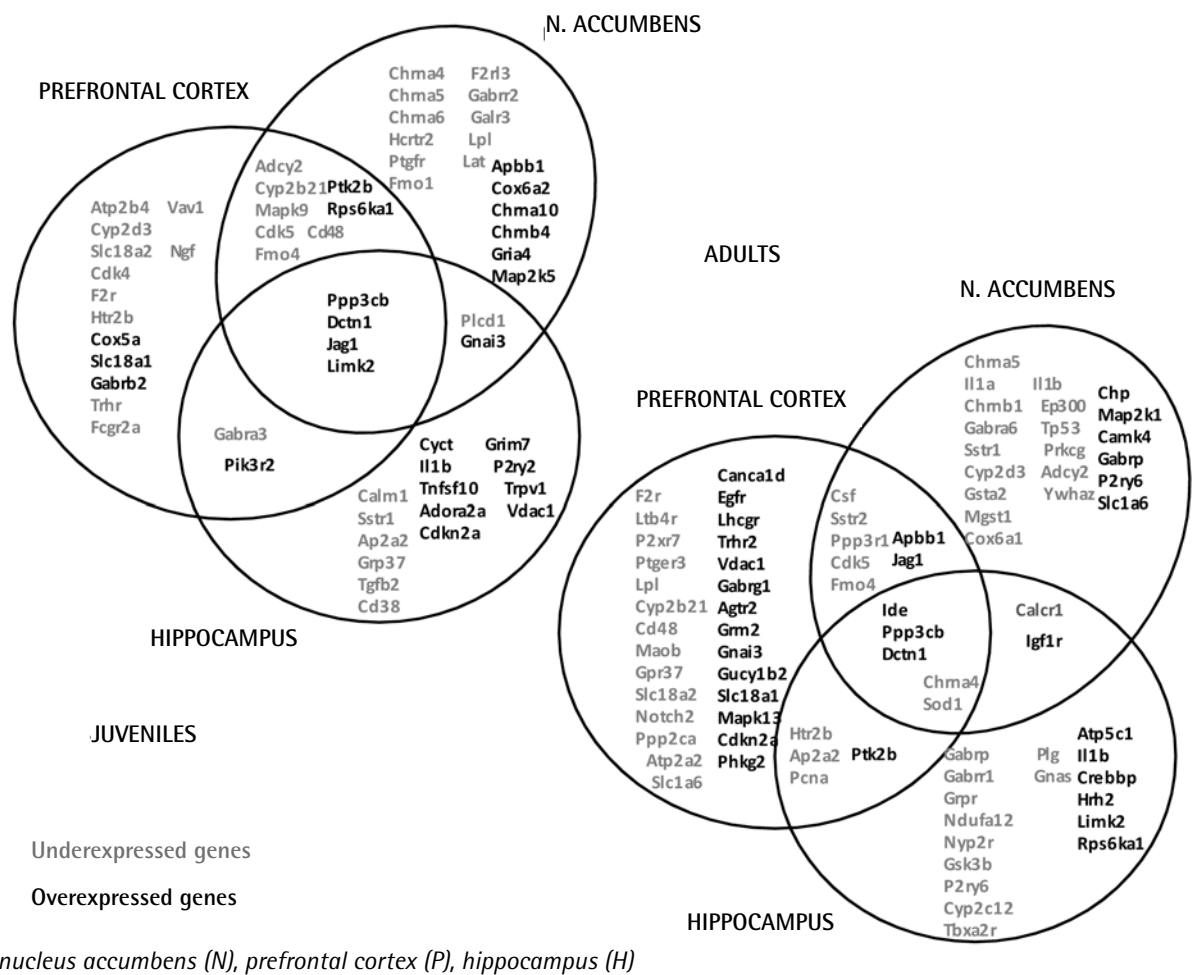


Figure 1

The graphs show the number of overexpressed and underexpressed genes involved in pathways of interest in the group of juvenile and adult rats. Each gene is plotted relative to its Z-score value. (Alma D. Genis-Mendoza)



nucleus accumbens (N), prefrontal cortex (P), hippocampus (H)

Figure 2 This figure shows the candidate genes obtained from the following three criteria: 1) Z-score values >2 and <-2; 2) expression in more than one brain area; and 3) participation in relevant metabolic pathways of the central nervous system

its expression in the three areas of the brain in both groups. In this category, we found another gene with a high z-score, *cpz* 4.37.

Finally, after taking into account z-score values, expression in more than one brain area and participation in metabolic pathways of interest, eight candidate genes were proposed for the schizophrenia study. In Table 2 we summarize the results of the z-score values for the proposed genes; it can be observed that *ppp3cb* and *dctn1* had the highest z-score values in all three areas evaluated.

DISCUSSION

Using microarray technology, we evaluated the expression of the genes in different brain regions using the VHLN animal model for schizophrenia. We worked with 4

experimental groups of Wistar male rats: VHLN juvenile rats, sham-injured juvenile rats, VHLN adult rats and sham-injured adult rats. The analysis was divided into 3 groups according to the z-score value (>1 and <-1, >2 and <-2, and >3 and <-3). Not all the routes observed were directly associated with mental disorders, so we identified 18 pathways relevant to the CNS (genes with z-score >2 and <-2). Finally, we examined the genes with z-score values >3 and <-3 to identify the candidate genes of interest with the greatest variations in expression.

Group of genes with z-scores >1 and <-1

This group included a large number of metabolic and signaling pathways that were found to be differentially altered in the three brain areas. The pathways with the largest number of modulated genes were cancer, neuroactive

Table 2 Proposed candidate genes selected using the following 3 criteria: I) Z-score values >2 and <-2 ; II) expression in more than one area of the brain; III) participation in pathways of interest. The symbol of the gene, name, biological description, and z-score values in adults of each tissue are shown. Nucleus accumbens (N), prefrontal cortex (P), hippocampus (H)

Symbol	Name	Description	A Score	P Score	H Score
<i>Limk2</i>	Kinase 2 with LIM domain	Proteins with LIM domains are involved in diverse cell-signaling processes, such as cytoskeletal organization, organogenesis and the cell cycle	4.710	4.834	2.659
<i>Ppp3cb</i>	Phosphatase 3 protein, catalytic subunit, beta isoform	Phosphatase-dependent calmodulin protein; it dephosphorylates nuclear factors of activated T cells and may play a role during skeletal muscle atrophy	4.130	4.600	3.846
<i>Dctn1</i>	Dynactin 1	Dynein microtubule component activated by ATPase, which acts as a microtubule engine	3.378	4.717	4.042
<i>Jag1</i>	Jagged 1	Ligand responsible for activation of the Notch1 receptor. Signaling through <i>Notch</i> is involved in the development of most tissues	2.625	3.254	2.036
<i>Ide</i>	Insulin-degrading enzyme	Enzyme involved in the degradation of bioactive peptides, including insulin, beta-endorphin, atrial natriuretic peptide and beta-amyloid	2.292	2.531	2.052
<i>Sod1</i>	Superoxide dismutase 1, soluble	Catalyzes the conversion from superoxide to hydrogen peroxide and molecular oxygen involved in the oxidative stress response	-2.193	-3.187	-3.301
<i>Chrna4</i>	Cholinergic receptor, nicotinic alpha-4	Belongs to the superfamily of ligand-activated gated ion channels that play a role in the rapid transmission of signals in synapses	-2.909	-3.420	-2.814

ligand-receptor interaction and calcium signaling; the last two pathways were of interest.

Group of genes with z-score >2 and <-2

In this segment, we detected 7 genes of interest whose expression was modified in the three brain areas and had ontologies related to the pathways of interest. The calcium signaling and neuroactive ligand-receptor interaction pathways continued to contribute a large number of differentially expressed genes, whereas neuronal differentiation and function, neuroendocrine response and behavioral pathways had less participation. It should be noted that there were overexpressed and underexpressed genes in most of the pathways, except for the route of drug and xenobiotic metabolism by Cyt-P450, where only underexpressed genes were found (Figure 1).

Group of genes with z-scores >3 and <-3

Finally, this analysis allowed us to propose 8 genes as potential candidates for the genetic approach to schizophrenia. Six of these genes (*ppp3cb*, *dctn1*, *ide*, *limk2*, *jag1* and *cpz*) were overexpressed, while the remaining two (*sod1* and *chrna4*) were underexpressed (Table 2).

Among the genes with the highest z-score values, *ppp3cb* (Table 2) was noteworthy for being overexpressed in the group of juvenile and adult rats. This gene encodes the catalytic subunit of the β isoform of phosphatase 3 protein. This enzyme interacts selectively and noncovalently with calmodulin in response to an increase in intracellular calcium levels²². Recently, a genome study in Taiwanese families with schizophrenia suggested the linkage of locus 10q22.3, where the *anxa7*, *dnajc9*, *zmynd17* and *pppp3cb* genes are located, the same genes associated with schizophrenia and with cognitive and attention deficit problems²³. In addition, a meta-analysis was conducted to evaluate the entire genome of individuals with schizophrenia in various populations. Among the genes proposed as candidate genes was *ppp3cc*, which encodes the gamma isoform of the calcineurin enzyme. Other genes associated were *nos1ap*, *rgs4*, *uhmk1*, *nrg1* and *znf804a*, among others²⁴.

On the other hand, the human *dctn1* gene encodes the major p150 subunit of dynactin, a macromolecular complex consisting of 10 polypeptides, which is required for the retrograde axonal transport of cellular vesicles and organelles through the microtubule system. Numerous studies have shown the role of p150 in psychotic disorders associated with delusions and hallucinations²⁵, and neurodegenerative disorders such as Huntington disease²⁶ and amyotrophic lateral sclerosis (ALS)²⁷.

The differential regulation at the level of *ppp3cb* and *dctn1* transcripts was notable in both the juvenile and adult rats (z-score values >3), which suggests that both may contribute from the onset of the first psychotic symptoms.

Another of the genes that was overexpressed with a high z-score in all three brain areas studied was *ide*, which encodes insulin-degrading enzyme (IDE) (Table 2). This gene is situated in locus 10q23-q25, previously associated with schizophrenia²⁸, and encodes a zinc-dependent metallopeptidase that degrades insulin, glucagon, β -amyloid, β -endorphin, IGF-I and IGF-II. Deficit expression of this enzyme has been associated with Alzheimer disease and type 2 diabetes mellitus^{29,30}. It has also been suggested that haloperidol could have an effect on IDE activity through changes in the level of expression of its substrates²⁸. However, since our data revealed a significant increase in *ide*, it is possible that the regulation of both enzyme levels and activity occurs post-transcriptionally, as described in other members of the metallopeptidase family³¹.

Another transcript expressed abundantly in this study was *jag1*. The resulting protein is the ligand of Notch 1, a transmembrane receptor activated before birth that induces radial glial differentiation³², and that promotes the differentiation of progenitor cells into astroglial scaffolding cells after birth³³. In patients with schizophrenia, it was recently shown that *jag1* expression is significantly increased, exhibiting positive correlation with canonical mediators of the Notch pathway, which influences cell proliferation and the cell cycle, and also participates in oligodendrocyte synthesis^{34,35}. We observed *jag1* overexpression only in the group of juvenile rats. In this respect, we might speculate that *jag1* overexpression could reflect activation of this pathway to promote neurogenesis in response to injury caused by neonatal injury, thus reactivating the neuronal development of the animals.

The *chrna4* gene that encodes a nicotinic acetylcholine receptor belonging to the superfamily of ion channels was found to be underexpressed in the adult animals. As is well-known, this class of receptors plays a major role in the transmission of nerve signals in neuronal synapses. It has been suggested that cholinergic-nicotinic dysfunction may contribute to cognitive impairment in schizophrenia by mediating dopamine release. Furthermore, it has been seen that neurocognitive deficits in schizophrenia can be relieved temporarily by nicotine administration^{36,37}; since then, several nicotinic receptor subtypes have been examined as candidates associated with this disease^{37,38}.

Another potential candidate gene for study in schizophrenia is *sod1*, which we found to be significantly underexpressed in adult rats. The superoxide dismutase 1 protein encoded by this gene is one of two human isoenzymes responsible for the destruction of superoxide free radicals in cells. Mutations in this gene have been associated with familial ALS²⁷. A decrease in superoxide dismutase 1 enzyme

expression may potentiate oxidative stress by increasing the vulnerability of neuronal cells to free radicals, which is consistent with reported brain damage in patients with schizophrenia³⁹.

It was noteworthy that the two underexpressed genes *sod1* and *chrna4* only had decreased levels in the group of adult rats, suggesting that these changes may be associated with positive and negative symptoms of schizophrenia.

Moreover, our findings showed that *limk2* was overexpressed in the juvenile rat group. LIM kinase genes encode a group of protein kinases involved in diverse biological functions. Despite the fact that *limk2* has not been associated with schizophrenia, it has been associated with apoptosis as a protein that protects against ischemia in a rat model of diabetes^{40,29}, and in an animal model of Alzheimer disease, increased *limk2* expression was observed with degeneration of synaptic structures⁴¹. It is known that LIMK2 is phosphorylated and activated by ROCK kinases, thus phosphorylating cofilin, a protein that prevents actin polymerization and favors depolymerization, which are necessary for cell motility⁴². An increase in the expression of *limk2* may be disturbing cytoskeletal dynamics due to failure to regulate actin, which would have negative implications for early neuronal migration in injured juvenile rats and is consistent with our model of schizophrenia.

Finally, in the group of juvenile and adult rats we found overexpression of the carboxypeptidase Z gene (*cpz*). The protein has an N-terminal domain with 30% amino acid identity with the "frizzled" (Fzd) domain present in Wnt-interacting proteins^{43,44}. Carboxypeptidase Z is abundant in the extracellular matrix of the placenta and is found in smaller quantities in brain, lung, thymus and kidney³⁸. This protein had never been associated before with schizophrenia; in contrast, another enzyme of this family, glutamate carboxypeptidase II (GCPII) has been associated with mental disorders, including schizophrenia⁴⁵.

Although the exact function of CPZ is unknown, it is likely that it plays a role in the regulation of embryonic development by interaction with Wnt proteins. Furthermore, it has been reported that CPZ expression is much lower in adult tissues than in embryonic organs⁴⁶. In turn, it has been shown in hippocampal neuron cultures that Wnt-mediated signaling is important for axonal development and guidance⁴⁶, regulating cytoskeletal dynamics in the axonal growth cone and branching⁴⁷, and leads to an increase in the formation and organization of new presynaptic terminals^{48,49}.

Our study showed that the *cpz* gene did not turn off after embryonic development and continued to be overexpressed in injured adult rats. If this protein remains highly expressed in the adult brain, it is very likely that dysregulation of Wnt-mediated signaling exists.

To date, *cpz* and *limk2* genes have never before been associated with schizophrenia and, because of their significant overexpression in our study model, these genes can be expected to play an important role in the development and course of the disorder. Undoubtedly, future research and new experimental strategies should be designed with the aim of clarifying the contribution of LIMK2 and CPZ proteins in this disease and establishing their role as potential biomarkers.

With respect to the three brain areas assessed (nucleus accumbens, hippocampus and prefrontal cortex) in the group of injured animals, a reduction was observed in the number of genes regulated compared with the group of sham injured animals. This is consistent with the cognitive impairment that has been observed in the brains of patients with schizophrenia, where neuronal deterioration and/or damage has been demonstrated in the hippocampus and prefrontal cortex⁵⁰. Given the cognitive impairment manifested by patients with schizophrenia, it is possible that damage to the prefrontal cortex is observed in the long term, which in turn is consistent with the VHLN animal model of schizophrenia, which is based on the neurodevelopmental hypothesis and goes hand-in-hand with an early prenatal brain lesion^{51,52} and the involvement of morphogenesis in the dorsolateral cortex region⁵³. Furthermore, our findings suggest the possibility that the maturation of local inhibitory circuits in the prefrontal cortex may be altered in rats with hippocampal injury, as has been reported in a previous study⁵⁴.

One limitation of this study was that we evaluated gene expression profiles using the DNA 5k chip designed by the Cell Physiology Institute, UNAM. We know that late-generation DNA chips currently available on the market can be used to study more genes and other features; analyses with such chips might identify other genes that we did not observe with this chip. However, we believe that our findings are relevant because the modulation of some genes already associated with schizophrenia was observed, as well as two genes that so far have not been linked to schizophrenia and could play a role in the disease.

CONCLUSIONS

This work showed that the transcriptome of juvenile and adult rats with VHLN was differentially modified compared to the control group. Significant overexpression and underexpression of several genes was reported, some previously associated with schizophrenia and others not. Our contribution in this regard is to propose eight potential candidate genes for analysis in this disorder, two of which have not been previously associated with schizophrenia (*limk2* and *cpz*). These unpublished findings open new questions and broaden the horizons for future research at

the functional level in both animal models and humans, which may allow reliable diagnostic molecular biomarkers to be established in schizophrenia.

ACKNOWLEDGMENTS

Isabel Beltran, Dr. Jorge Ramirez and his team: Lorena Chávez González, Simón Guzmán León and José Luis Santillán Torres for their technical assistance in the microarray determinations. Gerardo Coello, Gustavo Corral and Ana Patricia Gómez for their assistance with the genArise software.

REFERENCES

1. Quintero J, Barbudo del Cura E, López-Ibor MI, López-Ibor JJ. La evolución del concepto de Esquizofrenia Resistente al Tratamiento. *Actas Esp Psiquiatr*. 2011;39(4):236-50.
2. <http://www.imss.gob.mx>
3. Ripke S, Sanders AR, Kendler KS, Levinson DF, Sklar P, Holmans PA, et al. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet*. 2011;43(10):969-76.
4. Ulloa RE, Nicolini H, Fernández-Guasti A. Age differences in an animal model of obsessive-compulsive disorder: participation of dopamine: dopamine in an animal model of OCD. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004;78(4):661-6.
5. Ulloa RE, Nicolini H, Fernández-Guasti A. Sex differences on spontaneous alternation in prepubertal rats: implications for an animal model of obsessive-compulsive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004;28(4):687-92.
6. Fernández-Guasti A, Ulloa RE, Nicolini H. Age differences in the sensitivity to clomipramine in an animal model of obsessive-compulsive disorder. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003;166(3):195-201.
7. Ulloa RE, Nicolini H, Avila M, Fernández-Guasti A. Age onset subtypes of obsessive compulsive disorder: differences in clinical response to treatment with clomipramine. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2007;17(1):85-96.
8. Olszewski RT, Janczura KJ, Ball SR, Madore JC, Lavin KM, Lee JC, et al. NAAG peptidase inhibitors block cognitive deficit induced by MK-801 and motor activation induced by d-amphetamine in animal models of schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2012;31(2):145.
9. Chatterjee M, Verma R, Ganguly S, Palit G. Neurochemical and molecular characterization of ketamine-induced experimental psychosis model in mice. *Neuropharmacology*. 2012;63(6):1161-71.
10. Zuo D, Bzduga T, Olszewski RT, Moffett JR, Neale JH. Effects of N-acetylaspartylglutamate (NAAG) peptidase inhibition on release of glutamate and dopamine in prefrontal cortex and nucleus accumbens in phencyclidine model of schizophrenia. *J Biol Chem*. 2012;287(26):21773-82.
11. Nakajima M, Mori H, Nishikawa C, Tsuruta M, Okuyama S, Furukawa Y. Psychiatric disorder-related abnormal behavior and habenulointerpeduncular pathway defects in Wnt1-cre and Wnt1-GAL4 double transgenic mice. *J Neurochem*. 2013;124(2):241-9.
12. Haque FN, Lipina TV, Roder JC, Wong AH. Social defeat interacts with Disc1 mutations in the mouse to affect behavior. *Behav Brain Res*. 2012;233(2):337-44.
13. Marongiu MF, Poddie D, Porcu S, Manchinu MF, Castelli MP,

- Sogos V, et al. Reversible disruption of pre-pulse inhibition in hypomorphic-inducible and reversible CB1-/- mice. *PLoS One*. 2012;7(4):e35013.
14. Powell SB. Models of neurodevelopmental abnormalities in schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci*. 2010;4(4):435-81.
 15. Le Pen G, Grottick AJ, Higgins GA, Martin JR, Jenck F, Moreau JL. Spatial and associative learning deficits induced by neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats: further evaluation of an animal model of schizophrenia. *Behav Pharmacol*. 2000;11(3-4):257-68.
 16. Albert H.C. Wong, Barbara K. Lipska, Olga Likhodi, Ernie Boffa, Daniel R. Weinberger, James L. Kennedy, et al. Cortical gene expression in the neonatal ventral-hippocampal lesion rat model. *Schizophrenia Research*. 2005;77:261-70
 17. Guido Lastra L, Camila Manrique. Microarreglos: herramienta para el conocimiento de las enfermedades. *Revista colombiana de reumatología*. 2005;12(3):263-7.
 18. Zimmermann M. Ethical principles for the maintenance and use of animals in neuroscience research. *Neurosci Lett*. 1987;73(1):1.
 19. Lipska BK, Jaskiw GE, Chrapusta S, Karoum F, Weinberger DR. Ibotenic acid lesion of the ventral hippocampus differentially affects dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens and prefrontal cortex in the rat. *Brain Res*. 1992;585(1-2):1-6.
 20. Mostalac-Preciado CR, de Gortari P, López-Rubalcava C. Antidepressant-like effects of mineralocorticoid but not glucocorticoid antagonists in the lateral septum: interactions with the serotonergic system. *Behav Brain Res*. 2011;30;223(1):88-98.
 21. Pérez-Carreón JI, Martínez-Pérez L, Loredó ML, Yañez-Maldonado L, Velasco-Loyden G, Vidrio-Gómez S, et al. An adenosine derivative compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a pre-established CCI (4)-induced rat cirrhosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(2):287-96.
 22. Miyakawa T, Leiter LM, Gerber DJ, Gainetdinov RR, Sotnikova TD, Zeng H, et al. Conditional calcineurin exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(15):8987-92.
 23. Liu CM, Fann CS, Chen CY, Liu YL, Oyang YJ, Yang WC, et al. ANXA7, PPP3CB, DNAJC9, and ZMYND17 genes at chromosome 10q22 associated with the subgroup of Schizophrenia with deficits in attention and executive function. *Biol Psychiatry*. 2011;70(1):51-8.
 24. Ng MYM, Levinson DF, Faraone SV, Suarez BK, DeLisi LE, Arinami T, et al. Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*. 2009;14(8):774-85.
 25. Kurian SM, Le-Niculescu H, Patel SD, Bertram D, Davis J, Dike C. Identification of blood biomarkers for psychosis using convergent functional genomics. *Molecular Psychiatry*. 2011;16:37-58.
 26. Engelender S. Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Hum Mol Genet*. 1997;6(13):2205-12.
 27. Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. 2005;76(8):1046-57.
 28. Bernstein HG, Ernst T, Lendeckel U, Bukowska A, Ansorge S, Stauch R, et al. Reduced neuronal expression of insulin-degrading enzyme in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with haloperidol-treated, chronic schizophrenia. *J Psychiatric Res*. 2009;43(13):1095-105.
 29. Wei L, Sun D, Yin Z, Yuan Y, Hwang A, Zhang Y, et al. A PKC-beta inhibitor protects against cardiac microvascular ischemia reperfusion injury in diabetic rats. *Apoptosis*. 2010;15(4):488-98.
 30. Hou Y, Zhou L, Yang QD, Du XP, Li M, Yuan M, et al. Changes in hippocampal synapses and learning-memory abilities in a streptozotocin-treated rat model and intervention by using fasudil hydrochloride. *Neuroscience*. 2012;3:200:120-9.
 31. Toupance S, Brassart B, Rabenoelina F, Ghoneim C, Vallar L, Polette M, et al. Elastin-derived peptides increase invasive capacities of lung cancer cells by post-transcriptional regulation of MMP-2 and uPA. *Clin Exp Metastasis*. 2012;29(5):511-22.
 32. Gaiano N, Nye JS, Fishell G. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron*. 2000;26(2):395-404.
 33. Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, Tashiro K, Kurooka H, Honjo T. Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron*. 2001;29(1):45-55.
 34. Chambers CB, Peng Y, Nguyen H, Gaiano N, Fishell G, Nye JS. Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. *Development*. 2001;128(5):689-702.
 35. Kerns D, Vong-Ghe S, Barley K, Dracheva S, Katsel P, Casaccia P, et al. Gene expression abnormalities and oligodendrocyte deficits in the internal capsule in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2010;120(1-3):150-8.
 36. López-Valdés H, García-Colunga J. La participación de los receptores de acetilcolina nicotínicos en trastornos del sistema nervioso central. *Salud mental*. 2003;26(3):66-72.
 37. Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K. Genetic association analysis of tagging SNPs in alpha4 and beta2 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptor genes (CHRNA4 and CHRN2) with schizophrenia in the Japanese population. *Journal of Neural Transmission*. 2008;115(10):1457-6.
 38. De Luca V, Voineskos S, Wong G, Kennedy JL. Genetic interaction between alpha4 and beta2 subunits of high affinity nicotinic receptor: analysis in schizophrenia. *Experimental Brain Research*. 2006;174(2):292-6.
 39. García-Valencia J, Miranda AL, López-Jaramillo CA, Palacio-Acosta CA, Gómez-Franco J, Opsina-Duque J. Esquizofrenia y Neurodesarrollo. *Revista colombiana de psiquiatría*. 2005;34(01):63-76.
 40. te Velthuis Aartjan JW, Bagowski CP. PDZ and LIM domain-encoding genes: molecular interactions and their role in development. Review Article. *The ScientificWorld Journal*. 2007;7:1470-92.
 41. Hou Y, Zhou L, Yang QD, Du XP, Li M, Yuan M, et al. Changes in hippocampal synapses and learning-memory abilities in a streptozotocin-treated rat model and intervention by using fasudilhydrochloride. *Neuroscience*. 2012 3;200:120-9.
 42. Croft D, Crighton D, Samuel M, Lourenco F, Munro J, Wood J, et al. p53-mediated transcriptional regulation and activation of the actin cytoskeleton regulatory RhoC to LIMK2 signaling pathway promotes cell survival. *Cell Res*. 2011;21(4):666-8.
 43. Song L, Fricker LD. Cloning and expression of human carboxypeptidase Z, a novel metallocarboxypeptidase. *J Biol Chem*. 1997;272(16):10543-50.
 44. Reznik SE, Fricker LD. Carboxypeptidases from A to Z: implications in embryonic development and Wnt binding. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58:1790-1804.
 45. Guilarte TR, Hammoud DA, McGlothlan JL, Caffo BS, Foss CA, Kozikowski AP, et al. Dysregulation of glutamate carboxypeptidase II in psychiatric disease. *Schizophr Res*. 2008;99(1-3):324-32.
 46. Zhou CJ, Zhao C, Pleasure SJ. Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities. *J Neurosci*. 2004;24(1):121-6.

47. Nathan D, Okerlund, Benjamin NR. Cheyette. Synaptic Wnt signaling a contributor to major psychiatric disorders? *J Neurodev Disord.* 2011;3(2):162-74.
48. Varela-Nallar L, Grabowski CP, Alfaro IE, Alvarez AR, Inestrosa NC. Role of the Wnt receptor Frizzled-1 in presynaptic differentiation and function. *Neural Dev.* 2009;2:41.
49. Sahores M, Gibb A, Salinas PC. Frizzled-5, a receptor for the synaptic organizer Wnt7a, regulates activity-mediated synaptogenesis. *Development.* 2010;137(13):2215-25.
50. Harms MP, Wang L, Csernansky JG, Barch DM. Structure-function relationship of working memory activity with hippocampal and prefrontal cortex volumes. *Brain Struct Funct.* 2012;[Epub ahead of print]
51. Hanlon FM, Houck JM, Pyeatt CJ, Lundy SL, Euler MJ, Weisend MP, et al. Bilateral hippocampal dysfunction in schizophrenia. *Neuroimage.* 2011;58(4):1158-68.
52. Lillrank SM, Lipska BK, Weinberger DR. Neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Clin Neurosci.* 1995;3:98-104.
53. Tseng JR, Kang KW, Dandekar M, Yaghoubi S, Lee JH, Christensen JG. Preclinical efficacy of the c-Met inhibitor CE-355621 in a U87 MG mouse xenograft model evaluated by 18F-FDG small-animal PET. *J Nucl Med.* 2008;49:129-34.
54. Tucker DM, Derryberry D, Luu P. Anatomy and Physiology of Human Emotion: Vertical Integration of Brainstem, Limbic, and Cortical Systems. In J. Borod, Ed. *Handbook of the Neuropsychology of Emotion.* New York: Oxford, 2000.

Evidencia de identidad alélica para el gene del receptor DRD4 a dopamina en pacientes con esquizofrenia familiar de origen mexicano

Alma Della Genis,^{*,**} Carlos Alfonso Tovilla-Zarate,^{***} Beatriz Camarena,^{****} Alejandro Aguilar,^{****} Julio César Flores-Lázaro,^{*} Nuria Lanzagorta,[†] Daniel Santana-Vargas,[†] Ana Fresán,^{****} Carlos Campillo,^{*} Michael Escamilla,[‡] Humberto Nicolini^{*,**‡}

RESUMEN

Los estudios de asociación alélica en esquizofrenia se han enfocado en diversas regiones cromosómicas, las cuales contienen genes que codifican para receptores dopaminérgicos. Dentro de éstas, los polimorfismos del gen del receptor de dopamina D4 (DRD4) han sido ampliamente relacionados con la sintomatología psiquiátrica. Existen algunos reportes de asociaciones entre el polimorfismo 48-bp-VNTR en el exón III y la esquizofrenia, aunque esta relación aún es controvertida. La mayoría de los estudios han utilizado pacientes comparados contra controles o familias tipo trios. Sin embargo, no se han presentado estudios con este polimorfismo usando familias con varios afectados. En este estudio se analizó este polimorfismo VNTR del exón III del DRD4 en 60 familias con al menos un par de hermanos afectados. Los datos se analizaron con el programa SIBPAL (software S.A.G.E.). La estimación promedio de alelos compartidos fue de 0.54 ($p=0.014$) y la proporción estimada de parejas de hermanos/familiares con uno o dos alelos compartidos significativamente fue 0.499 y 0.208 ($p=0.01$, y $p=0.004$), respectivamente. Los resultados sugieren que el polimorfismo 48-bp-VNTR-DRD4 podría estar asociado con la esquizofrenia en familias seleccionadas en la ciudad de México. La asociación reportada en este trabajo podría ser positiva debido a la particular mezcla poblacional en la ciudad de México.

Palabras clave: ligamiento, DRD4, esquizofrenia, alelos compartidos.

ABSTRACT

Allelic association studies in schizophrenia have focused on different chromosomal regions that contain genes coding for dopamine receptors. The polymorphisms of the dopamine receptor D4 (DRD4) have been widely associated with psychiatric symptoms. There are some reports of association between the polymorphism 48-bp-VNTR in exon III and schizophrenia, although this relationship remains controversial. Most studies have used patients comparing to controls or trios; however, there have been no studies on this polymorphism using families with multiple affected subjects. In this study we analyzed the VNTR polymorphism of the DRD4 exon III in 60 families with at least one pair of affected siblings. Data was analyzed using SIBPAL (S.A.G.E. software). The average estimate of shared alleles was 0.54 ($p=0.014$) and the estimated proportion of siblings with one or two shared alleles was statistically significant 0.499 and 0.208 ($p=0.01$, $p=0.004$). These results suggest that the 48-bp-VNTR-DRD4 polymorphism may be associated with schizophrenia in Mexico City families. The association reported in this work could be positive due to the particular population mix in Mexico City.

Key words: linkage, DRD4, schizophrenia, shared alleles.

* Servicios de Atención Psiquiátrica, Comisión Coordinadora de los Institutos Nacionales de Salud, Secretaría de Salud, México, D.F.

** Postgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México D. F., México.

*** División Académica Multidisciplinaria de Comalcalco, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México.

**** Laboratorio de Genética Psiquiátrica, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Múñiz, México, D. F.

† Laboratorio de Neurocirugía Experimental, Hospital General de México, México, D.F.

‡ South Texas Psychiatric Genetics Research Center, Paul L. Foster School of Medicine, Texas Tech Health Science Center, El Paso, TX.

§ Grupo de Estudios Médicos y Familiares Carracci, México, D.F.

Correspondencia: Dr. Humberto Nicolini, Grupo Médico Carracci, Carracci 107, Col. Insurgentes Extremadura, 13740, México, D.F. Teléfono: (55) 56 11 30 28; fax: (55) 33 30 01 08. Correo electrónico: nicolini_humberto@yahoo.com

Recibido: enero 2012. Aceptado: marzo 2012.

Este artículo debe citarse como: Genis AD, Tovilla-Zarate CA, Camarena B, Aguilar A, Flores-Lázaro JC, Lanzagorta N y col. Evidencia de identidad alélica para el gene del receptor DRD4 a dopamina en pacientes con esquizofrenia familiar de origen mexicano. Rev Latinoam de Psiquiatría 2012;11(2):33-37.

www.nietoeditores.com.mx

El Residente

REVISIÓN – OPINIÓN

¿Es posible modelar esquizofrenia en un modelo animal?

Alma Delia Genis,* Carolina López-Rubalcava**

RESUMEN. La esquizofrenia es un trastorno mental incapacitante caracterizado por la presencia de ideas delirantes, alucinaciones, desorganización en el lenguaje, alogia y abulia, entre otros. Este trastorno es una de las enfermedades mentales más difíciles de diagnosticar y con una etiología multifactorial, lo que dificulta su tratamiento y estudio. En la actualidad se han desarrollado diversos modelos animales que han ayudado a los investigadores a entender un poco más la enfermedad, a estudiar el mecanismo de acción de los antipsicóticos y a proponer nuevas terapias para su tratamiento. El presente trabajo hace una revisión de algunos de los modelos animales que más se utilizan en la investigación preclínica de la esquizofrenia y analiza sus ventajas y desventajas.

Palabras clave: Esquizofrenia, modelos animales, lesión de hipocampo ventral neonatal.

ABSTRACT. Schizophrenia is a disabling mental disorder characterized by the presence of delusions, hallucinations, disorganized speech and alogia among others. This disorder is a mental illness difficult to diagnose with a multifactorial etiology, which make it difficult to treat and to study. At present, various animal models have been developed to help researchers to better understand the disease, to study the mechanisms of action of antipsychotics and to propose new therapies. This paper reviews the animal models most commonly used in preclinical research in schizophrenia and discusses their advantages and disadvantages.

Key words: Schizophrenia, animal models, neonatal ventral hippocampus lesion.

Introducción

La esquizofrenia es una de las enfermedades mentales con más alto costo para la sociedad, se encuentra en el 1% de la población mundial y por lo general se desarrolla en la etapa repro-

ductiva del individuo, incidiendo en este durante toda su vida.¹ Aunque su etiología es aún desconocida, se acepta que es multifactorial y se han propuesto diversas teorías que explicarían su desarrollo. Por ejemplo, la teoría del neurodesarrollo propone que la predisposición genética aunada a agentes ambientales tempranos (un trauma, un estresor o un virus) produciría alteraciones en la conectividad del cerebro durante su desarrollo, principalmente en el control cortical de áreas subcorticales mediado por el sistema dopaminérgico.^{2,3} En este sistema, los factores externos como el estrés sensibilizarían al sistema produciendo un episodio psicótico.

La esquizofrenia se caracteriza principalmente por presentar síntomas positivos, negativos y cognitivos. Los síntomas positivos se relacionan con síntomas psicóticos como la pérdida de contacto con la realidad, delirios y alucinaciones, mientras que los síntomas negativos corresponden a un estado de déficit en los procesos con-

* Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

** Departamento de Farmacobiología, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Dirección para correspondencia:
Dra. Carolina López Rubalcava
Departamento de Farmacobiología del CINVESTAV-IPN
Carretera de los Tenorios No. 35, Col. Granjas Coapa,
14330 México, D.F. México
Tel. 5483-2872, Fax 5483-2863
E-mail: cllopez@cinvestav.mx

Recibido: 2 de julio del 2011.

Aceptado con modificaciones: 1 de agosto del 2011.

Este artículo puede ser consultado en versión completa en
<http://www.medigraphic.com/elresidente>

15 ANEXO 3: PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS INTERNACIONALES

Gene expression profiles of nucleus accumbens, prefrontal cortex and hippocampus in an animal model of schizophrenia: a proposal for candidate genes LV congreso internacional, Cancún, Quintana Roo, del 4 al 9 de Noviembre de 2012.

Central CNS neonatal lesion in ventral hippocampus may alter peripheral lymphocyte dopamine gene expression. XX World Congress of Psychiatric Genetics 2011. 10-14 de September 2011.

Genetic evidence for DRD4 gene of Mexican schizophrenic patients. World Congress Psychiatric Genetics XV. New York. E.U. 7-11 octubre 2007.

16 ANEXO 4: PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS NACIONALES

La lesión neonatal en hipocampo ventral puede alterar la expresión de receptores a dopamina en linfocitos de sangre periférica. Exhibición de proyectos de investigación de la UACM. 18 de octubre al 8 de noviembre de 2011. Ciudad de México.

La esquizofrenia en un modelo animal. Semana de la salud de la UACM. 27 de septiembre 2011. Ciudad de México.

Diferencias por edades en los niveles de dopamina y serotonina en ratas con lesión neonatal en hipocampo neonatal. LIII congreso nacional de ciencias fisiológicas. 26-30 de septiembre. Villa Hermosa Tabasco.

Efecto de la lesión neonatal en hipocampo ventral en distintos tipos de conductas en ratas juveniles y adultas. LII Congreso nacional de ciencias fisiológicas. 27-30 de septiembre 2009. Morelia Michoacán.

Evidencia de ligamiento en el gen *DRD4* en pacientes esquizofrénicos mexicanos. XXXII Congreso Nacional de Genética Humana 7-11 de Noviembre 2007 Oaxaca, Oax.

El jurado designado por la Universidad Autónoma de la Ciudad de México aprobó esta tesis el día 23 de agosto del 2013, en la Ciudad de México D.F. para optar al Grado de Doctora en Ciencias Genómicas, a la M. en C. Alma Delia Genis Mendoza.

Dr. Humberto Nicolini Sánchez _____

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga _____

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez _____

Dra. Lucía Martínez Mota _____

Dr. Julio Flores Lázaro _____