



***Departamento de Biología
Celular y Patología***



**Laboratorio de
Neurobiología de la
Audición: Trastornos
audiomotores**

**EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN
CRÓNICA DE RISPERIDONA EN UN
MODELO DE ESQUIZOFRENIA EN RATA**

MOHAMED ARJI

Salamanca, Enero 2010



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

**FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE
CASTILLA Y LEÓN**

**EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN
CRÓNICA DE RISPERIDONA EN UN
MODELO DE ESQUIZOFRENIA EN RATA**

Memoria presentada por Mohamed Arji
para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Salamanca

Directores:

Dr. Orlando Castellano Benítez
Dra. M^a Dolores E. López García
Dra. Consuelo Sancho Sánchez



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

Los abajo firmantes, Drs. D. Orlando Castellano Benítez, Dña M^a Dolores E. López García y Dña Consuelo Sancho Sánchez, miembros del Instituto de Neurociencias de Castilla y León

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado *“Efectos de la administración crónica de risperidona en un modelo de esquizofrenia en rata”* ha sido realizado bajo su dirección por el Licenciado Mohamed Arji, y consideran que reúne las condiciones necesarias de calidad y rigor científico para su exposición pública y defensa con el fin de optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

En Salamanca, 4 de Enero de 2010.

Fdo:

Dr. Orlando Castellano
Benítez

Fdo:

Dra. M^a Dolores E. López
García

Fdo:

Dra. Consuelo Sancho
Sánchez

**Este trabajo ha sido subvencionado por los proyectos
MEC #BFU2007-65210; JCyL #GR221 y GRS 249/A/08; FIS PI08-
0017 y EC08-00165**

*Al Océano, al Viento, al Barco y a los Compañeros de Viaje
Al Sabio Científico Universal, al Universo la única Universidad
A los Padres de la Verdadera Ciencia, a las huellas del Camino*

Agradecimientos

Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda de muchas personas, a las cuales quisiera expresar mi más profundo agradecimiento:

A los Drs. M^a Dolores E. López García, Consuelo Sancho Sánchez y Orlando Castellano Benítez, mis Directores de tesis, por su excelente dirección, por todas las enseñanzas recibidas, por haberme ayudado para realizar mi Tesis Doctoral, por haberme apoyado en los momentos difíciles, y por su amistad y su disposición a ayudarme siempre.

Al Dr. Miguel Merchán, Director del Instituto de Neurociencias de Castilla y León, y también Director del Grupo de Neurobiología de la Audición. Asimismo a todos los miembros de su Grupo: Manuel Malmierca, Enrique Saldaña, Enrique López Poveda, Juan Carlos Arévalo, sin olvidar Ignacio Plaza (Nacho), por su disponibilidad sin límite y de haber estado siempre a nuestro lado por lo que haga falta. Mi reverencia ante Al gran Torero y el gran fan de Ferrari.

A los miembros del laboratorio de Neurofisiología, especialmente a la Dra. Adela Riobos, por permitirme el uso de sus instalaciones y sus aparatos, y de haber compartido con nosotros sus conocimientos y su experiencia en la conducta animal. Quiero dedicar un agradecimiento especial al Prof. José María Criado, también miembro del laboratorio de Neurofisiología, de haberme presentado a la Dra. López, y que me ha prestado todo el apoyo necesario para empezar mi tesis en las condiciones adecuadas.

Al Dr. Vicente Molina, por haber creído en mi y haberme ofrecido la oportunidad de participar en su proyecto; y a través de él, a todos los miembros de su equipo del Servicio de Psiquiatría del Hospital Universitario de Salamanca, por las reuniones y los congresos a los que hemos asistido juntos.

También, al Dr. Luis Muñoz de la Pascua, y todos los miembros del Servicio de Experimentación animal, especialmente José y Carmen, por habernos proporcionado siempre las hembras gestantes en condiciones, y haber ajustado muchas veces sus previsiones a nuestro plan de trabajo.

Al Dr. Javier Herrero, del INCyL, por habernos ayudado en la parte Biología Molecular de este proyecto, por sus explicaciones pertinentes y por su disponibilidad en todo momento.

A los Drs. Ana I. Galán, María E. y Rafael Jiménez, del Departamento de Fisiología y Farmacología, de haberme abierto la puerta de su laboratorio desde que llegué a

Salamanca, y haberme ayudado siempre a mantener la ilusión para seguir adelante en los momentos difíciles. También a las Dras. Gloria Rodríguez-Villanueva y M^a Ángeles Serrano García, del mismo Departamento, por haberme apoyado siempre. Sin olvidar mis primeros compañeros de trabajo, Arrancha, Encarna y Paco, por su amistad y su ayuda en todo momento.

Al Dr. Isidro García, y todo su equipo del Laboratorio 12 del Centro de investigación del Cáncer, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, y haberme ofrecido la oportunidad de iniciarme a las técnicas de biología molecular y de trabajar en un entorno profesional, con la alegría de Michel, la firmeza de María, el buen corazón de Inés y la amistad de Isabel.

A mis compañeros de trabajo del Grupo de Neurobiología de la Audición, Anchieta, Melisa, Ana, Sebastian, Flora, Olga, Salvatore, Marco, Biviana, Cheryl, Auxi, Marcelo, Luis, Arturo, Soraya, Compañeros de Armas, como les llama Anchieta, trabajando codo a codo antes en el laboratorio común de la Facultad de Medicina y ahora en el edificio nuevo del INCyL.

A mis padres, por haber estado siempre a mi lado con amor incondicional. Sin vuestra ayuda no hubiera podido viajar ni empezar la Tesis. A ellos les debo todo.

A mis hermanas y hermanos, Houria, Hafida, Aicha, Naima, Sabah, mi prima y hermana Fatima, Kamal, Mustapha y Lahcen, los mejores hermanos y amigos.

A mi querida Sanae, desde que te conocí, tu presencia está cargada de sentido en cada momento. Gracias por compartir conmigo esta historia y haber formado parte de tantas aventuras de mi vida. Te quiero mucho.

A toda mi familia y a la familia de mi novia en Marruecos, por haber estado rodeada de tan buena gente.

A mis mejores amigas y amigos en España, Ouidad, Hanan, Roula, Wisal, Souhaila, Jamalata, Amor, Modar, Mohamed, Reda, Younes, Prudencio, Antonio, Roberto, Wasim, Abdul. A mis amigos de Marruecos, Hicham, Toufik, Younes, Mohammed-Hicham, Abdelaziz, Zouhair, Said, Oumama, Jihane, Najat, Zahra, etc... A todas mis amigas y amigos.

A todos los españoles con quienes me he cruzado, por hacerme sentir en mi segundo país. Gracias por ser tan amables.

A todo Marruecos, que le quiero tanto y le hecho de menos.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| ÍNDICE | 8 |
| ABREVIATURAS | 15 |
| I – INTRODUCCIÓN | 17 |
| 1. Esquizofrenia..... | 19 |
| 1.1. Definición..... | 19 |
| 1.2. Etiología de la esquizofrenia..... | 21 |
| 1.3. La hipótesis del neurodesarrollo de la esquizofrenia..... | 22 |
| 1.4. Tratamiento de la esquizofrenia..... | 27 |
| 1.4.1. Los neurolépticos típicos..... | 27 |
| 1.4.2. Los neurolépticos atípicos..... | 29 |
| 1.4.2.1. Neurolépticos atípicos y alteraciones metabólicas..... | 33 |
| 1.4.2.2. La risperidona..... | 35 |
| 2. Modelos animales de esquizofrenia..... | 40 |
| 2.1. Modelos animales basados en la hipótesis del neurodesarrollo..... | 42 |
| 2.1.1. Modelo de la lesión neonatal del hipocampo ventral..... | 44 |
| 2.1.1.1. Bases del modelo..... | 45 |
| 2.1.1.2. Factores de modulación de las alteraciones del modelo..... | 46 |
| 2.1.1.3. Alteraciones comportamentales análogas a la sintomatología de la esquizofrenia..... | 48 |
| 2.1.1.4. Caracterización funcional, celular y molecular..... | 51 |
| 2.1.1.5. Interés y limitaciones del modelo..... | 56 |
| 3. Evaluación comportamental de los efectos de la administración de los neurolépticos atípicos..... | 55 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1. Reflejo auditivo de sobresalto e inhibición por estímulo previo..... | 55 |
| 3.1.1. Reflejo Auditivo de Sobresalto..... | 55 |
| 3.1.1.1. Circuito neuronal..... | 56 |
| 3.1.1.2. Modulaciones..... | 57 |
| 3.1.2. Inhibición por estímulo previo..... | 59 |
| 3.1.3. Bases neuronales de la inhibición del reflejo auditivo de sobresalto..... | 61 |
| 3.1.4. La inhibición por estímulo previo como herramienta experimental..... | 62 |
| 3.1.5. Inhibición por estímulo previo y Esquizofrenia..... | 64 |
| 3.2. Prueba del Campo Abierto..... | 65 |
| 3.3. Prueba de Evitación Activa..... | 67 |
| 3.3.1. Paradigmas básicos de condicionamiento..... | 69 |
| 3.3.2. Factores del condicionamiento de evitación..... | 70 |
| 3.3.2. Significado de la Prueba..... | 71 |
| II –HIPÓTESIS Y OBJETIVOS..... | 72 |
| 1. Hipótesis de trabajo..... | 74 |
| 2. Objetivo general..... | 75 |
| 2.1. Objetivos específicos..... | 75 |
| 2.2. Descripción pormenorizada de los objetivos con la metodología a seguir..... | 76 |

| | |
|--|-----|
| III - MATERIALES Y MÉTODOS | 79 |
| 1. Diseño experimental..... | 81 |
| 2. Animales de experimentación..... | 83 |
| 3. Cirugía de la lesión neonatal del hipocampo ventral..... | 84 |
| 4. Administración de risperidona..... | 85 |
| 5. Estudio comportamental..... | 86 |
| 5.1. Respuesta de inhibición por estímulo previo..... | 87 |
| 5.2. Test de Campo Abierto..... | 88 |
| 5.3. Test de Evitación Activa..... | 90 |
| 6. Obtención del material biológico para el estudio histológico..... | 93 |
| 6.1. Fijación, extracción y tallado del encéfalo | 93 |
| 6.2. Tinción de Nissl..... | 95 |
| 6.3. Técnicas inmunohistoquímicas..... | 95 |
| 7. Análisis de las secciones histológicas..... | 98 |
| 7.1. Medición del grosor..... | 98 |
| 7.2. Recuento celular..... | 99 |
| 8. Estudio de la expresión génica de los receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos..... | 100 |
| 8.1. Extracción y purificación del RNA..... | 101 |
| 8.2. RT-PCR..... | 102 |
| 8.3. PCR Cuantitativa (qPCR)..... | 105 |
| 9. Estudios bioquímicos..... | 107 |
| 9.1. Obtención del material biológico | 107 |

| | |
|---|------------|
| 9.2. Niveles de risperidona en el plasma | 108 |
| 9.3. Actividad lipolítica..... | 109 |
| 10. Análisis estadístico..... | 110 |
| IV – RESULTADOS..... | 111 |
| 1. Resultados del estudio comportamental..... | 114 |
| 1.1. Inhibición por estímulo previo..... | 114 |
| 1.2. Campo abierto..... | 115 |
| 1.2.1. Actividad horizontal | 116 |
| 1.2.2. Exploración vertical..... | 120 |
| 1.2.3. Actividades de aseo y movimientos orofaciales..... | 121 |
| 1.3. Evitación activa..... | 123 |
| 1.3.1. Respuestas de evitación..... | 123 |
| 1.3.2. Cruces realizados durante los intervalos entre ensayos..... | 126 |
| 1.3.3. Freezings..... | 128 |
| 1.3.4. Defecación..... | 129 |
| 2. Resultados del estudio morfológico..... | 132 |
| 2.1. Extensión y localización de las lesiones..... | 132 |
| 2.2. El grosor de la corteza..... | 133 |
| 2.3. Recuento celular..... | 134 |
| 3. Resultados de la expresión genética de los receptores dopaminérgicos D ₂ , serotoninérgicos 5-HT _{2A} | 137 |
| 4. Resultados del estudio bioquímico..... | 141 |
| 4.1. Nivel de risperidona en el plasma..... | 141 |
| 4.2. Efecto sobre la actividad lipolítica..... | 141 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.2.1. | Efecto de risperidona sobre el peso de los animales..... | 141 |
| 4.2.2. | Efectos de la risperidona sobre la adiposidad..... | 143 |
| 4.2.3. | Efecto de la administración crónica de risperidona sobre el tamaño de los adipocitos, en ratas falsas lesionadas... | 144 |
| 4.2.4. | Efecto de distintos fármacos sobre la actividad lipolítica, en ratas con/sin tratamiento crónico con risperidona..... | 145 |

V – DISCUSIÓN.....150

| | | |
|------|--|-----|
| 1. | Consideraciones metodológicas..... | 152 |
| 1.1. | Elección del animal de experimentación..... | 152 |
| 1.2. | Elección del periodo de la lesión | 153 |
| 1.3. | La elección de los falsos lesionados en lugar de los controles..... | 155 |
| 1.4. | La elección de la dosis y la vía de administración de la risperidona..... | 156 |
| 2. | El estudio conductual..... | 157 |
| 3. | El estudio morfológico..... | 180 |
| 4. | Efecto de la risperidona sobre la adiposidad..... | 191 |
| 5. | Expresión de receptores D ₂ y 5-HT _{2A} en corteza e hipocampo..... | 198 |

| | |
|---------------------------------|-----|
| VI – CONCLUSIONES | 201 |
| VII – BIBLIOGRAFIA | 204 |
| VIII – ANEXOS | 256 |

ABREVIATURAS

5-HT: Serotonina, o 5 – hidroxitriptamina

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

AP: Anteroposterior

ARN:ácido ribonucleico

ARNm:ácido ribonucleico mensajero

AVT: Área ventral tegmental

CA: campo abierto

CaBP:*calcium-binding proteins*, proteínas ligadoras de calcio

CEE: Cruces entre ensayos

CIE-10: Clasificación Internacional y Estadística de las Enfermedades y Problemas

CPF: Corteza prefrontal

CPFM:Corteza prefrontal medial

DA: Dopamina

DM2: diabetes mellitus tipo 2

DP: Día postnatal

DSM-IV-TR: *Diagnostic and Statistical manual for mental Disorders, text revision*

EA: Evitación activa

EA: prueba de evitación activa

EC: Estímulo condicionado

ED: estímulo discriminativo

EE: Esquizofrenia experimental

EDTA:ácido etilendiaminotetraacético

EI: estímulo incondicionado

FK: Forskolina

FL: Falso lesionado

GABA: Ácido gamma aminobutírico

GAD-67: glutamato descarboxilasa 67

GADPH:Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GB: ganglios basales

GFAP:*Proteína fibrilar ácida glial*, proteína fibrilarácida de laglia

GLU: Glutamato
HAL: Haloperidol
IEE: intervalos entre ensayos
IEP: Inhibición por estímulo previo.
Iso: Isoprenalina
IgG: inmunoglobulina
LNHV: Lesión neonatal del hipocampo ventral
ML: mediolateral
NAA: N-acetil-aspartato
NACC: núcleo accumbens
NL: Neuroléptico
NMDA: N-metil-D-aspartato
NRPC: núcleo reticular pontino caudal
OPI: Opipramol
PCP: fenciclidina
PET: *Positron emission tomography*, Tomografía por emisión de positrones
PrL: Región prelímbica de la corteza prefrontal
PV: parvoalbúmina
qPCR: *quantitative polymerase chain reaction*, Reacción de la Cadena de Polimerasa cuantitativa
RAS: reflejo auditivo de sobresalto
RC: Respuesta condicionada
RI: Respuesta incondicionada
RISP: Risperidona
RMI: Resonancia magnética por imágenes
RT-PCR: *Reverse transcription polymerase chain reaction*, Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa
SR-LAB: Startle Response System
VD: ventrodorsal

I-INTRODUCCIÓN

1. Esquizofrenia

1.1. Definición

El término esquizofrenia (del griego, *schizo*: "división" o "escisión" y *phrenos*: "mente", que significa "la mente partida"), fue introducido por primera vez por Bleuler en 1911 para describir un trastorno caracterizado por una escisión en la asociación de ideas y una retirada de la realidad y de la vida social (Bleuler, 1950). Los manuales de diagnóstico más utilizados en la actualidad, el DSM-IV-RT y el CIE-10 (ANEXO I), definen la esquizofrenia como un trastorno multidimensional que afecta a funciones emocionales y cognitivas, que incluye pobreza afectiva o inapropiada, distorsiones de la percepción y del pensamiento, pobreza en la comunicación y en el lenguaje, y comportamiento desorganizado o catatónico. Los síntomas característicos de la esquizofrenia se han clasificado a menudo en dos grandes categorías, síntomas positivos y negativos, a las que recientemente se ha añadido una tercera, la de desorganización (American Psychiatric Association, 2004; Ho y cols., 2005). Los síntomas positivos son excesos o distorsiones del funcionamiento normal (p.e., ideas delirantes, alucinaciones), mientras que los síntomas negativos suponen un déficit del funcionamiento normal (p.e., disminución de la expresión afectiva o verbal y de la motivación). La tercera categoría de los síntomas, incluida en el grupo de síntomas positivos en la anterior clasificación, es una alteración en la organización normal (p.e., el lenguaje desorganizado o trastornos del pensamiento, el

comportamiento desorganizado y la incongruencia afectiva). En la actualidad, existe una tendencia a considerar el deterioro cognitivo como el déficit fundamental de la esquizofrenia (Ho y cols., 2005). Las principales manifestaciones de este déficit son las alteraciones de la función neurocognitiva que incluyen defectos en la memoria de trabajo (tipo de la memoria a corto plazo que permite mantener y manejar temporalmente la información necesaria para realizar un trabajo mental), y las alteraciones en la capacidad de atención en funciones ejecutivas (procesos mentales que permiten responder y adaptarse de modo apropiado al entorno e incluyen la capacidad de planificación, la abstracción, la flexibilidad del pensamiento, la resolución de problemas y la toma de decisiones). Estos síntomas son unos de los más discapacitantes ya que a menudo interfieren con la habilidad de los pacientes para llevar una vida normal, y pueden causar un gran trastorno emocional (Tamminga y Holcomb, 2005). Este trastorno afecta aproximadamente al 1% de la población, tanto a hombres como a mujeres, aunque la edad de su aparición y su curso varían entre los géneros (Kaplan y cols., 1994; Rapoport y cols., 2005).

1.2. Etiología de la esquizofrenia

Aunque la etiología de la esquizofrenia es desconocida, se sabe que están implicadas diversas anomalías neuromorfológicas y neuroquímicas, originadas por factores ambientales y epigenéticos sobre una predisposición genética, de carácter poligénico, en el que se hallan implicados varios genes interactuando entre sí (Dubertret y cols., 1998). Numerosos estudios han relacionado alteraciones en la neurotransmisión mediada por aminas biógenas con la patogenia de la psicosis esquizofrénica (Pani y cols., 2007). Es muy probable que la disfunción cerebral de esta enfermedad no esté basada en la anomalía de un sólo sistema neuroquímico. Por eso se han postulado diferentes hipótesis, con su correlato en distintos modelos experimentales, como los dopaminérgicos (Carlsson y cols., 1988), glutamatérgicos (Mouri y cols., 2007) o serotoninérgicos (Gutiérrez y cols., 2002), que tratan de explicar, aunque sea parcialmente, los mecanismos etiopatogénicos subyacentes a la enfermedad. Gran parte de estas hipótesis se han generado sobre la observación de fármacos efectivos en distintos síntomas esquizofrénicos. Así, la "hipótesis dopaminérgica" surge porque el tratamiento de los síntomas positivos de la enfermedad, se hace con antagonistas dopaminérgicos, y algunos de estos síntomas pueden ser reproducidos por drogas como las anfetaminas, que aumentan el tono dopaminérgico. Según esta hipótesis, la hipofunción dopaminérgica mesocortical es responsable de los síntomas negativos, y como consecuencia de este déficit se produciría una hiperactividad mesolímbica responsable de los

síntomas positivos. La "hipótesis serotoninérgica" se basa en el efecto antipsicótico de los fármacos atípicos al actuar sobre los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{1A}, que se encuentran alterados en la esquizofrenia. La "hipótesis glutamatérgica" o de la hipofunción de los receptores NMDA surge de la observación del efecto de diversos antagonistas de los receptores del glutamato de tipo NMDA (ketamina) que mimetizan numerosos síntomas de la esquizofrenia en individuos sanos y agravan los síntomas en individuos esquizofrénicos. Una alteración del neurodesarrollo conllevaría una neurotransmisión glutamatérgica inadecuada, que en la historia natural de la enfermedad, deriva en estados hiperglutamatérgicos desencadenados por la neurotransmisión dopaminérgica incrementada al inicio de la edad adulta.

1.3. La hipótesis del neurodesarrollo de la esquizofrenia

Además de las hipótesis basadas en las alteraciones neuroquímicas, existen otras que explican la esquizofrenia por alteraciones en el neurodesarrollo (Weinberger, 1986; Murray y Lewis, 1987; Bogerts, 1989; Crow y cols., 1989; Lewis, 1989; Waddington, 1990; Mednick y cols., 1991; Bloom, 1993); Las evidencias provienen de estudios *post mortem* de los cerebros de pacientes esquizofrénicos que muestran anomalías a nivel de migración, tamaño y organización neuronal (Jakob y cols., 1986; Benes y cols., 1991). Algunos cambios neuronales importantes que han sido observados en cerebros de pacientes

esquizofrénicos, incluyen un aumento del volumen ventricular y una disminución en el peso total del cerebro y en el volumen del hipocampo (Buchsbaum y cols., 1997; Whitworth y cols., 1998;), y han sido observados en pacientes con un primer episodio de esquizofrenia, y en algunos estudios permanecen constantes durante todo el curso de la enfermedad (Velakouli y cols., 1999; Wood y cols., 2001).

Estudios de resonancia magnética (RMI) del cerebro de pacientes esquizofrénicos, sin ningún tratamiento antipsicótico, muestran una reducción del volumen y anomalías morfológicas del hipocampo (Lawrie y Abukmeil, 1998; Maier y cols., 2000). Los gemelos no afectados, con una predisposición genética a la esquizofrenia, también han mostrado una reducción en el volumen del hipocampo en comparación con los controles, aunque no tanto como la de gemelos afectados (Weinberger y cols., 1992). Otros estudios han demostrado una reducción en los marcadores neuronales, como el N-acetil-aspartato (NAA), una reducción de la actividad metabólica y una actividad neuroquímica alterada en el hipocampo de pacientes esquizofrénicos (Maier y cols., 1995; Deicken y cols., 1998). Además, la estimulación eléctrica del giro parahipocampal en personas normales provoca fenómenos psíquicos (Weinberger y cols., 1991). En conjunto, estos resultados sugieren que el hipocampo puede tener un papel central en la fisiopatología de la esquizofrenia.

El hipocampo, que incluye el giro dentado, asta de Amó (CA1-CA3) y el subículo, recibe la mayor parte de las proyecciones de la corteza entorrinal (Steward, 1976). El hipocampo, a su vez, envía

proyecciones hacia la corteza prefrontal, al complejo amigdalino, al núcleo accumbens (NAcc), y al hipotálamo (Psatta y cols., 1974; Verwer y cols., 1997). Debido a esta gran conectividad del hipocampo, una alteración de este área puede causar un malfuncionamiento de las conexiones cerebrales. Los estudios morfológicos han demostrado una aberración en la migración y agrupamiento celular en la corteza entorrinal (Jakob y cols., 1986) y una alteración en la orientación de las neuronas piramidales en el hipocampo (Kovelman y cols., 1984) de pacientes esquizofrénicos. Dado que la migración neuronal ocurre muy temprano en el desarrollo, estos resultados sugieren que una aberración en el desarrollo del hipocampo puede ser una neuropatología importante en la esquizofrenia. De hecho, se ha demostrado que altos niveles de estrés afectan la neurogénesis del hipocampo, reducen la densidad dendrítica, y conducen a una atrofia de las células existentes (Sapolsky y cols., 1990). Una posibilidad es que una interacción entre los daños genéticos y los factores ambientales puede alterar el sistema nervioso durante estas etapas críticas del neurodesarrollo, lo que conduce a una alteración del hipocampo y sus conexiones cerebrales y a la aparición de algunos síntomas de la esquizofrenia.

Estudios histológicos revelaron también una ausencia de gliosis, lo que excluye un proceso neurodegenerativo (Roberts y cols., 1987; Rajkowska y cols., 1998), y sugiere que la pérdida de volumen observada en los cerebros de pacientes esquizofrénicos puede ser debida a una displasia pre-existente. Sin embargo, otros estudios han sugerido que los

cambios morfológicos observados en los cerebros de estos pacientes pueden ser indicativos de la neurodegeneración, como ha sido mostrado por una aceleración de los procesos de reducción del volumen y el alargamiento ventricular progresivos del cerebro en comparación con lo que se observa durante el proceso del envejecimiento normal (Rapoport y cols., 1997; Sporn y cols., 2003;).

Una de las hipótesis del neurodesarrollo que ha suscitado más atención es la que ha sido propuesta por de Weinberger en 1995. Esta hipótesis postula que las alteraciones en el desarrollo embrionario del cerebro, posiblemente causadas por la alteración de la migración neuronal, conducen a una conectividad neuronal anormal entre las cortezas temporolímbica y frontal, que causa un aumento de la actividad dopaminérgica (Weinberger, 1995). Además, se indica que el déficit del comportamiento puede no resultar de una falta de conectividad, sino de una alteración de la conectividad, es decir que las regiones del cerebro están incorrectamente conectadas (Weinberger y Lipska, 1995). Hoy en día, la hipótesis de neurodesarrollo sigue recuperando protagonismo, aunque no es una hipótesis nueva, ya que surgió hace más de noventa años (Southard, 1915). Un aspecto importante de la hipótesis del neurodesarrollo de la esquizofrenia, es la aparición en la fase de post-pubertad de los síntomas positivos y negativos. Síntomas premórbidos, como el retraso en el desarrollo, déficits cognitivos, anormalidades en las interacciones sociales y las funciones motoras, están ya presentes a la edad de un año en los pacientes esquizofrénicos (Walker y Lewine, 1990; Olin y Mednick, 1996; Ellison y cols., 1998;). Sin embargo, estos síntomas

no se pueden utilizar para el diagnóstico de la esquizofrenia, por existir síntomas premórbidos similares en otros trastornos, como el trastorno bipolar (Cannon y cols., 1997).

Independientemente de la naturaleza exacta de los síntomas premórbidos, está bien establecido que los síntomas de diagnóstico de la esquizofrenia sólo surgen durante la adolescencia o poco después, lo que es difícil de superar por la hipótesis del neurodesarrollo (Weinberger, 1995). Kennard demostró que la lesión neonatal de la corteza de los primates, produce cambios comportamentales a la edad temprana del animal, pero que disminuyen con el avance en la edad (Kennard, 1936). Kolb y colaboradores. después sugirieron que la lesión neonatal de la corteza en la rata no altera la función, en comparación con las lesiones de ratas adultas (Kolb y Nonneman, 1978). Sin embargo, los resultados en animales empezaron a soportar la hipótesis del neurodesarrollo de la esquizofrenia cuando se demostró, tanto en los primates como en las ratas, que la lesión del cerebro pre y neonatal no es necesariamente más compensada en comparación con la lesión del cerebro adulto (Goldman, 1971; Kolb y Wishaw, 1985). Además, los resultados de Goldman han demostrado que es posible que los efectos sobre el comportamiento de las lesiones neonatales no parezcan evidentes hasta la adolescencia (Goldman, 1971), lo que ha sido apoyado por Kolb mostrando que los efectos anatómicos de las lesiones neonatales también se evidencian sólo durante la adolescencia (Kolb, 1987). Por último, de nuevo sin hacer frente a la esquizofrenia en sí, el modelo del neurodesarrollo de Weinberger recibió apoyo del estudio de van Praag y cols. (1996),

quienes demostraron que la reorganización de las conexiones axonales consecutivas a la lesión neonatal del hipocampo neonatal puede dar lugar a los déficits en la memoria espacial, lo que sugiere que hay realmente una alteración de la conectividad más que una desconectividad.

Sin embargo, de manera general, la importancia de los modelos animales para el estudio de la hipótesis del neurodesarrollo de la esquizofrenia, sale a la luz con el modelo de la lesión neonatal del hipocampo ventral (Lipska y cols., 1993b). Uno de los importantes descubrimientos en este modelo, en relación con la hipótesis del neurodesarrollo de la esquizofrenia, es el hecho de que los animales no muestran ningún efecto de la lesión sobre el comportamiento cuando se evaluaron en la pre-pubertad (Lipska y cols., 1993b). Otro hallazgo importante a favor de la hipótesis de neurodesarrollo de la esquizofrenia es el hecho de que las ratas lesionadas en el hipocampo ventral en el período neonatal muestran un comportamiento parecido al de las ratas lesionadas en la CPFM en la edad adulta, y no al de las ratas lesionadas en el hipocampo en la edad adulta, lo que sugiere que la LNHV altera el desarrollo de la CPFM (Lipska y cols., 1993b).

1.4. Tratamiento de la esquizofrenia

Delay y Denicker propusieron el término de *neuroléptico* (NL) por primera vez en 1957, basándose los criterios siguientes: tener una actividad psicoléptica sin componente hipnótico; mostrar una acción reductora de ciertas psicosis (acción antipsicótica); inducir

manifestaciones secundarias neurológicas y neurovegetativas, y tener una acción subcortical dominante.

En la actualidad, existen dos tipos de NL, los típicos y los atípicos, estos últimos denominados también neurolépticos de segunda generación, de los cuales forma parte la risperidona (RISP), el fármaco antipsicótico utilizado en nuestro estudio.

1.4.1. Los neurolépticos típicos

Existen muchos NL típicos que responden a la definición de Delay y Denicker y cuyos prototipos son la haloperidol (Haldol®) y la clorpromazina (Largactil®). A nivel clínico, todos los NL típicos permiten mejorar significativamente la sintomatología positiva, reduciendo la intensidad de los trastornos y bajando el riesgo de recaídas. Sin embargo, sus efectos sobre la sintomatología negativa y desorganizada son muy limitados. Por otra parte, el 30% de los pacientes esquizofrénicos no responden al tratamiento con los NL típicos. Además, estos agentes inducen efectos secundarios neurológicos invalidantes en el 10 al 30% de los pacientes, incluyendo el síndrome extra-piramidal y las disquinesias tardías. En cuanto a su mecanismo de acción, todos los NL típicos comparten la característica de ser antagonistas de los receptores de dopamina tipo-D₂ (Tabla 1), aunque también bloquean otros tipos de receptores, lo que va a condicionar tanto su acción terapéutica como sus efectos secundarios. Estudios de neuroimagen han demostrado que los efectos antipsicóticos de los NL típicos están correlacionados con una

tasa de ocupación de los receptores D₂ de 65 a 70% (Remington y Kapur, 1999). La disminución de la transmisión dopaminérgica inducida por el bloqueo de los receptores D₂, particularmente a nivel de la vía mesocorticolímbica implicada en los procesos de motivación y de cognición, podría ser responsable del efecto beneficioso de los NL típicos sobre los síntomas psicóticos. Además, el bloqueo de los receptores D₂ de la vía nigro-estriatal implicada en el control de la función motora voluntaria podría ser responsable de la emergencia de los efectos secundarios neurológicos.

1.4.2. Los neurolépticos atípicos

Debido a la limitación de los efectos beneficiosos de los NL típicos sobre los síntomas negativos y desorganizados y sus efectos secundarios devastadores, la investigación básica y aplicada ha permitido desarrollar nuevas moléculas calificadas de NL de segunda generación o atípicos. Ejemplos de los NL atípicos son: RISP (Risperdal[®]), clozapina (Leponex[®]), amisulprida (Soliani[®]), olanzapina (Zyprexa[®]) o aripiprazol (Abilify[®]).

Los NL atípicos han sido ampliamente prescritos por los clínicos porque han demostrado una mayor eficacia terapéutica, especialmente sobre los síntomas negativos y desorganizados y mínimos efectos secundarios neurológicos. No obstante, los recientes meta-análisis demostraron que el perfil clínico de los NL atípicos es muy variable según la molécula y que su mayor eficacia terapéutica sobre los síntomas

negativos y desorganizados en comparación con los NL típicos no es sistemática (Remington Kapur, 2000, Miyamoto y cols., 2005). Por otra parte, algunos NL atípicos inducen efectos secundarios severos que incluyen complicaciones metabólicas y cardiovasculares, y agranulocitosis,.

En cuanto a su mecanismo de acción, los NL atípicos son también antagonistas de los receptores D_2 , pero los estudios de neuroimagen han puesto de manifiesto un nivel de ocupación de estos receptores por los NL atípicos menor que el de los NL típicos, lo que sugiere que el efecto antipsicótico de los NL atípicos no puede explicarse únicamente por su acción sobre los receptores D_2 . Así, el perfil farmacológico de NL atípicos ha revelado afinidades para otros tipos de receptores, incluyendo los receptores de serotonina de tipo $5-HT_{2A}$, para los cuales tienen una actividad antagonista, los receptores de $5-HT_{1A}$ para los cuales tienen una actividad agonista parcial y los receptores adrenérgicos de tipo α_1 para los cuales tienen también una actividad antagonista (Tabla 1). Las diferencias en las afinidades por los receptores de los NL atípicos podrían ser responsables de la variabilidad de sus efectos clínicos. En la medida en que los receptores $5-HT_{2A}$ ejercen una actividad moduladora sobre la liberación de la DA cortical y sub-cortical, muchos autores han sugerido que el perfil clínico de los NL atípicos podría explicarse por su doble actividad antagonista de los receptores D_2 y antagonista $5-HT_{2A}$ (Meltzer y cols., 1989, Miyamoto y cols., 2005).

| | D ₁ | D ₂ | D ₃ | D ₄ | 5HT _{2A} | 5HT _{1A} | α ₁ | α ₂ | H ₁ | M ₁ |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Clozapina | + | + | + | ++ | +++ | ++ | +++ | + | +++ | ++++ |
| Amisulprida | - | ++++ | ++ | + | - | - | - | - | - | - |
| Risperidona | + | +++ | ++ | - | +++ | + | +++ | ++ | - | - |
| Olanzapina | ++ | ++ | + | ++ | +++ | - | ++ | + | +++ | +++ |
| Aripiprazola | - | ++++ | +++ | +++ | + | + | + | + | + | - |
| Haloperidol | + | ++++ | +++ | +++ | - | - | +++ | - | - | - |

Tabla 1: Afinidad de los NL atípicos y la haloperidol para los receptores de la dopamina según los estudios in vitro (adaptado de Miyamoto y cols., 2005). - mínima o nula; + baja; ++ moderada; +++ alta; ++++ muy alta.

Más allá de la acción fármaco-receptor, los NL atípicos, y también los típicos, pueden ejercer su acción vía otros mecanismos (Konradi y Heckers, 2001), como la plasticidad neuronal (Scherk y Falkai, 2006), mediante la neurogénesis y la plasticidad sináptica (Toro y Deakin, 2007), procesos que se han asociado a mejoras en los procesos cognitivos y mnésicos. Existen evidencias de que el tratamiento crónico con NLs incrementa la neurogénesis en la región subventricular y subgranular del hipocampo, y también de las células gliales en la corteza prefrontal (CPF)(Newton y Duman, 2007). Sin embargo, se necesitan más estudios y análisis *post mortem* para poder precisar la relevancia de estas acciones en la fisiopatología de la esquizofrenia (Newton y Duman, 2007).

El tratamiento con los NL atípicos parece incrementar los volúmenes del tálamo y de la sustancia gris cortical, mejorando los cambios estructurales producidos por la enfermedad (Tomelleri y cols.,

2009). No parece, sin embargo, que los NL aumenten el volumen de los ganglios basales (GB) en pacientes que nunca han tomado medicación, como es el caso de los NL típicos (Miller y cols., 1997; Chakos y cols., 1998), aunque al cambiar la medicación de “típica” a “atípica”, parece producirse una reducción del volumen de los GB, permitiendo una “normalización” de esta estructura en comparación con sujetos normales (Bilder y cols., 1994; Chakos y cols., 1994; Keshavan y cols., 1994; Cakos y cols., 1995). Los NL atípicos antagonizan los receptores D2, pero presentan menor afinidad y menor poder ocupacional de este receptor (Bymaster y cols., 1996; Strange, 2001). Los cambios observados en la estructura cerebral pueden, sin embargo, reflejar alteraciones neuropatológicas progresivas presentes en, por lo menos, algunas formas de esquizofrenia (Falkai y cols., 2004). De acuerdo con esto, dichos fármacos pueden enlentecer o frenar el proceso “esquizofrénico”, mientras que los fármacos convencionales no lo hacen. Es posible que esto se produzca mediante el agonismo de los receptores NMDA (Cosi y cols., 2005; Millan, 2005), aumentando la expresión de factores neurotróficos (Fumagalli y cols., 2004; Angelucci y cols., 2005), y estimulando la neurogénesis (Halim y cols., 2004; Wang y cols., 2004). Estos datos muestran claramente que los antipsicóticos atípicos mejoran la fisiopatología y la degeneración neuronal que naturalmente se produce en la enfermedad.

1.4.2.1. Neurolepticos atípicos y alteraciones metabólicas

El empleo de los NL atípicos puso de manifiesto la asociación entre estos fármacos y el aumento de peso y la aparición de complicaciones metabólicas que aumentan el riesgo cardiovascular y la mortalidad, factores cuya probabilidad y magnitud difieren sustancialmente según el fármaco utilizado y según el paciente (Daumit y cols., 2008).

A partir de numerosos estudios realizados en sujetos esquizofrénicos, se ha concluido que, aunque el riesgo es mayor con el uso de clozapina y olanzapina (Cohen y cols., 2006; Assié y cols., 2008), el empleo de NL, tanto típicos (Dixon y cols., 2000) como atípicos contribuyen al incremento del riesgo de obesidad, diabetes y dislipemia (Lean y Pajonk, 2003). También se han descrito polimorfismos genéticos asociados a un mayor riesgo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en pacientes tratados con antipsicóticos atípicos (Irvin y cols., 2009).

Los mecanismos por los cuales estos fármacos alteran el metabolismo lipídico son muy variados. Se acepta que el aumento de la adiposidad inducida por el tratamiento con medicamentos antipsicóticos, es uno de los mecanismos que puede alterar los procesos metabólicos, aunque estas alteraciones también pueden ser independientes de la adiposidad, ya que pueden aparecer en personas que no aumentan de peso (Cohen, 2006).

Los NL atípicos tienen perfiles farmacológicos muy diversos, con afinidades diferentes para los receptores implicados en la regulación del peso corporal. RISP presenta alta afinidad sobre 5-HT_{2A}, 5-HT₇, α 1, H1, D₂, α 2 y 5-HT_{1D} (Schotte y cols., 1996). En el hombre, se asocia al aumento de peso moderado, unos 2,1 kilogramos durante un período de diez semanas (Allison y cols, 1999).

Entre otros mecanismos por los que los NL atípicos pueden inducir obesidad y alteraciones lipolíticas, podría citarse el aumento de los niveles séricos de leptina días después del inicio del tratamiento (Zhang y cols., 2004). Hay algunos autores que afirman que los NL atípicos deterioran el metabolismo de sustratos lipídicos, principalmente, a través de efectos directos sobre tejidos periféricos, como el tejido adiposo (Vestri y cols., 2007).

Uno de los factores clave en los efectos secundarios de los NL radica en las diferentes afinidades que estos fármacos tienen por los sistemas receptoriales implicados en el metabolismo (Kapur y Seeman, 2001), y que determina su grado de participación en las alteraciones metabólicas inducidas por el tratamiento (Richelson, 1999); Risperidona tiene afinidad por los receptores histaminérgicos H1 correlacionados con el aumento de peso (Kroeze y cols., 2003; Poyurovsky y cols., 2005; Sakata y cols., 1988; Wirshing y cols., 1999), los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2C}, que reducen la ingesta y aumentan el gasto energético (Hayashi y cols., 2004), o los receptores adrenérgicos (β 3) que estimulan la lipólisis. Siendo el exceso de peso el principal responsable del mayor riesgo de hipertrigliceridemia y dislipemia, parece

ser que viene condicionado fundamentalmente por el bloqueo de los receptores histaminérgicos H1 (Kroeze y cols., 2003), y en menor medida de los 5HT₂. Aunque de todos los antipsicóticos atípicos, Clozapina y Olanzapina son los que inducen la mayor ganancia de peso (Davoodi y cols., 2009), RISP también provoca aumentos de peso (Zipursky y cols., 2005). Los antipsicóticos atípicos además, modifican el perfil lipídico, actuando directamente sobre los adipocitos (Yang y cols., 2009), estimulando la lipogénesis e inhibiéndola lipólisis (Minet-Ringuel y cols., 2007), con lo que se altera el tamaño en los adipocitos. Por todo ello, intentaremos comprobar en nuestro estudio el impacto de la administración crónica y aguda de RISP, sobre la adiposidad y la función secretora adipocitaria

1.4.2.2. La risperidona

La RISP (Risperdal[®], Janssen-Cilag) es un compuesto orgánico que pertenece a la familia química de los benzisoxazoles introducida en el mercado en 1992. Su designación química es 3-[2-[4-(6-fluoro-1,2-benzisoxazol-3-il)-1-piperidinil]etil]-6,7,8,9-tetrahidro-2-metil-4H-pirido[1,2-a] pirimidin-4-ona. Su fórmula molecular es C₂₃H₂₇FN₄O₂.

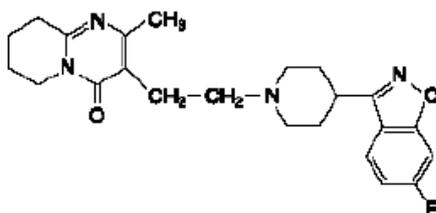


Figura 1: Fórmula molecular de la risperidona.

La RISIP se ha empleado en el tratamiento de otras enfermedades psiquiátricas además de la esquizofrenia, tales como el trastorno bipolar, depresión mayor, depresión psicótica, trastorno obsesivo compulsivo y sus espectros, trastorno por estrés post-traumático y otros trastornos de ansiedad (Ravindran y cols., 2007).

Características farmacocinéticas: La RISIP se absorbe rápidamente por la barrera gástrica y su absorción es independiente del consumo de alimentos. En plasma, se alcanzan concentraciones plasmáticas máximas en 1-2 h después de la administración, y niveles estables a los 5 días. La vida media de la RISIP (3 h) y de su metabolito activo, la 9-hidroxi-RISP (21-30h) también varían según el tipo de metabolismo individual (Ravindran y cols., 2007). La RISIP se metaboliza a 9-hidroxi-RISP mediante el citocromo P-450 IID6 y se distribuye rápidamente. El volumen de distribución es de 1-2 l/kg. La unión de RISIP a las proteínas plasmáticas es del 88%, la de 9-hidroxi-RISP es del 77%. Una semana después de la administración, el 70% de la dosis se excreta por orina y un 14% por heces. En orina, la RISIP y la 9-hidroxi-RISP representan entre el 35 - 45% de la dosis. El resto, son metabolitos inactivos. Un estudio con dosis única demostró concentraciones plasmáticas activas más elevadas y una eliminación más lenta de RISIP en personas de edad avanzada y en pacientes con insuficiencia renal (Snoeck y cols., 1995; Aichhorn y cols., 2005). Las concentraciones plasmáticas de RISIP fueron normales en pacientes con insuficiencia hepática (Snoeck y cols., 1995).

Características farmacodinámicas: El equilibrio del antagonismo de la dopamina y de la serotonina a nivel central permite alargar la actividad terapéutica de este fármaco a los síntomas negativos y afectivos de la esquizofrenia, y también reducir la posibilidad de aparición de efectos extrapiramidales (Adaptado del Simposium terapéutico, 2007). La RISIP, es un antagonista selectivo mono-aminérgico con propiedades únicas, que posee elevada afinidad para los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} y dopaminérgicos D₂. El fármaco se une igualmente a los receptores α -1-adrenérgicos y, con una afinidad más baja, a los receptores histaminérgicos H₁ y α -2-adrenérgicos. La RISIP no posee ninguna afinidad para los receptores colinérgicos. A pesar de que la RISIP sea un potente antagonista de los receptores D₂, mejorando los síntomas positivos de la esquizofrenia, causa menos depresión en la actividad motora e inducción de catalepsia que los NL convencionales.

Tal como hemos dicho en el apartado anterior, el antagonismo D₂/5-HT_{2A} de la RISIP parece ser el mecanismo de acción, que le confiere la capacidad de mejorar también los síntomas negativos de la esquizofrenia, y posiblemente tener algún efecto ansiolítico, antidepresivo y en la mejora de la memoria (Aguilar y cols., 1997; Hillert y cols., 1992). El bloqueo de estos receptores a nivel presináptico produce una mayor liberación de DA, principalmente en la CPF (Stockmeier y cols., 1993). Además, parece

existir estimulación indirecta de receptores 5-HT_{1A} en CPF por la RISP, que también facilitan este proceso (Ichikawa y cols., 2001).

Efectos secundarios: Analizando la extensa experiencia clínica disponible, incluyendo tratamientos a largo plazo, podemos decir que la RISP es generalmente bien tolerada. En muchas circunstancias, ha sido difícil diferenciar los efectos colaterales de síntomas de enfermedades subyacentes. Los efectos colaterales más frecuentes asociados al uso de RISP son: insomnio, agitación, ansiedad, cefaleas; menos comunes son: somnolencia, fatiga, mareos, falta de concentración, diarrea, dispepsia, náuseas/vómitos, dolor abdominal, visión borrosa, priapismo, disfunción eréctil, disfunción eyaculatoria, disfunción orgásmica, incontinencia urinaria, rinitis, eritema y otras reacciones alérgicas. Se han observado casos de accidentes cerebrovasculares durante el tratamiento con RISP. La RISP posee menor propensión a inducir síntomas extrapiramidales que los NL clásicos. Sin embargo, en algunos casos, pueden producirse los siguientes síntomas extrapiramidales: temblor, rigidez, salivación excesiva, bradiquinesia, akatisia, distonía aguda. Éstos son generalmente leves y reversibles con la reducción de la dosis y/o la administración de una medicación antiparkinsoniana, si fuera necesario. También, se ha observado que la administración de RISP produce ocasionalmente una

hipotensión (ortostática) y una taquicardia (refleja) o hipertensión, y a veces un leve descenso en el recuento de neutrófilos y/o plaquetas. La RISP puede inducir un incremento dosis-dependiente en la concentración plasmática de prolactina. Las manifestaciones posibles asociadas son: galactorrea, ginecomastia, trastornos menstruales, y amenorrea. Se ha observado aumento de peso, edema y aumento de enzimas hepáticas durante el tratamiento con RISP.

2. Modelos animales de esquizofrenia

A pesar de las dificultades inherentes a la utilización de los animales para el estudio de las patologías psiquiátricas, el desarrollo de los modelos animales es un paso esencial para la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos de estas enfermedades, por la posibilidad de realizar ciertas aproximaciones que no son posibles en los humanos. Cuatro criterios fueron definidos por McKinney y Bunney (1969) para la validez de un modelo animal de una enfermedad psiquiátrica: la similitud de las condiciones de inducción (validez de la construcción), la similitud de los estados comportamentales (validez del fenotipo), la similitud de los mecanismos neurobiológicos (validez de la expresión) y la similitud de la respuesta a los tratamientos (validez de la predicción).

Aunque la experimentación animal no permite el acceso a toda la sintomatología de la patología humana, sí es posible asociar ciertas anomalías comportamentales con diferentes aspectos sintomáticos de la esquizofrenia. Por tanto, se considera generalmente que una hipersensibilidad comportamental a los factores estresantes y a la administración de psicoestimulantes en los roedores, simula los trastornos asociados a los síntomas positivos de la esquizofrenia, incluyendo sobre todo la agitación psicomotriz y la hipersensibilidad a los agentes psicotomiméticos (Argüello y Gogos, 2006). En relación con el severo aislamiento social y afectivo observado en los pacientes esquizofrénicos, se asume que las alteraciones de las interacciones sociales en los roedores simulan los trastornos asociados a los síntomas

negativos de la esquizofrenia (Argüello y Gogos, 2006). Por último, se considera también que las alteraciones de las capacidades mnésicas, el procesamiento de las informaciones sensoriomotoras y de los procesos atencionales simulan las anomalías asociadas a los síntomas desorganizados de la esquizofrenia (Argüello y Gogos, 2006).

Los modelos animales de esquizofrenia han sido generados para comprobar las diferentes hipótesis de esta enfermedad. Los modelos iniciales se basaron en "la hipótesis dopaminérgica" de la enfermedad; En este modelo, se probó el comportamiento de los animales en respuesta a diferentes agonistas de los receptores dopaminérgicos, como la amfetamina y la apomorfina, y también de los antagonistas de estos receptores, como raclopride (Hantraye, 1998). Este modelo, aunque logró simular muchos de los síntomas de la esquizofrenia (como las respuestas estereotípicas, los déficits sensoriomotores a los agonistas dopaminérgicos y la mejora de los comportamientos aberrantes generados por los antagonistas dopaminérgicos como el haloperidol)(Sams-Dodd, 1998), no era capaz de simular los síntomas negativos de los pacientes esquizofrénicos, por lo que se consideró un modelo incompleto de la enfermedad.

Con la aparición de la "hipótesis glutamatérgica" de la esquizofrenia, se produjeron nuevos modelos manipulando los receptores NMDA, y logrando "reproducir" en estos animales muchas alteraciones comportamentales relacionadas con esta enfermedad. Por ejemplo, los animales con una expresión reducida de los receptores NMDA, muestran

un aumento de la actividad motora, de las estereotipias y déficits en las interacciones sociales (Mohn y cols., 1999). Además, los antagonistas de los receptores NMDA como la PCP y MK-801, fueron utilizados para inducir comportamientos similares a los síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia, y para comprobar el efecto potencial de los fármacos antipsicóticos sobre estos comportamientos (Bakshi y Geyer, 1995; Corbett et cols., 1995). En estos modelos, los antipsicóticos atípicos como clozapina tuvieron un mejor efecto sobre los comportamientos anormales en comparación con los antipsicóticos típicos, lo que indica una alteración de otros sistemas de neurotransmisores en la esquizofrenia.

2.1. Modelos animales basados en la hipótesis del neurodesarrollo

La hipótesis del neurodesarrollo de la esquizofrenia, investigó mediante modelos animales, muchos factores que podrían interferir con el desarrollo normal del cerebro, y aumentar el riesgo de desarrollar esta enfermedad. Las funciones de varios genes implicados en el neurodesarrollo de la esquizofrenia fueron exploradas recurriendo al uso de ratones transgénicos, entre los que podemos citar los siguientes:

- ✓ *ratón heterocigoto (nrg-1 +/-)*, para la Neuregulina-1 (NRG-1), que mostró una conducta exploratoria anormal, déficits en la IEP y la inhibición latente, y un aumento en la expresión de los receptores NMDA (Rimer y cols., 2005). Algunas alteraciones comportamentales observadas en este modelo pueden ser mejoradas con los antipsicóticos atípicos como la clozapina, lo que sugiere que las variaciones del NRG-1 pueden contribuir de algún modo en las anomalías observadas en la esquizofrenia.

- ✓ *ratón con la delección del gen NCAM-180*, que codifica la molécula de adhesión de las células neuronales 180 que participa en la migración neuronal. Este ratón mostró una migración neuronal anormal en la zona subventricular, un alargamiento ventricular, alteraciones morfológicas del hipocampo, y déficit en la IEP (Tomasiewicz y cols., 1993).
- ✓ *ratón con la mutación en la expresión de las subunidades NR1 del receptor NMDA*, es otro ejemplo de estos modelos transgénicos. Este ratón mostró una hiperactividad locomotora, que se puede atenuar después con la haloperidol, y también déficits en el comportamiento social que se pueden reducir con la clozapina (Mohn y cols., 1991).

El impacto significativo sobre el periodo prenatal y postnatal temprano en el neurodesarrollo ha sido también estudiado mediante modelos animales de esquizofrenia.

- ✓ *modelo de deprivación nutricional*, como es el caso de ratas sometidas a una dieta proteica, durante las etapas tempranas del desarrollo cerebral. Esta deficiencia nutricional muestra una alteración en el desarrollo y la función del hipocampo en la edad adulta, que pueden tener relación con los déficits del aprendizaje y la memoria (Bronzino y cols., 1996; Brown y cols., 1996). Otro modelo es aquel en que se estudió el
- ✓ *modelo de infección viral prenatal*, que afecta al neurodesarrollo cortical e hipocampal, mostrando una reducción del área de estas regiones cerebrales y un número bajo de células de reelina positivas, lo que implica un defecto en la migración neuronal (Fatemi y cols., 1999).
- ✓ *modelo de insuficiencia placentaria crónica*, que mostró una restricción en el crecimiento fetal. Esta restricción se manifiesta en el alargamiento de los ventrículos laterales y en la reducción del volumen del hipocampo, junto

con una migración neuronal anormal en la corteza y algunas alteraciones comportamentales análogas a los síntomas de la esquizofrenia (Rehn y cols., 2004).

- ✓ *interrupción temprana del neurodesarrollo prenatal mediante toxinas*, como el caso del metilazoximetanol (MAM). Este modelo mostró alteraciones en las interacciones sociales y en la morfología cerebral en animales adultos (Moore y cols., 2006; Featherstone y cols., 2007).
- ✓ *modelo de privación materna en la vida postnatal temprana*. Ciertas cepas de rata, sometidas a esta práctica, muestran alteraciones en la actividad sensoriomotora y en el aprendizaje espacial en la post-pubertad, lo que indica que la privación materna puede ser responsable de algunos de los déficit cognitivos observados en ciertos grupos de pacientes esquizofrénicos (Garner y cols., 2007).
- ✓ *modelo de la lesión neonatal del hipocampo ventral en rata*. Se introdujo para comprobar que las aberraciones tempranas en el hipocampo y sus conexiones pueden producir un retraso comportamental y anomalías moleculares similares a las observadas en la esquizofrenia (Lawrie y cols., 1998). Este modelo se basó en los resultados de estudios independientes sobre la neuropatología de la esquizofrenia, que han proporcionado datos convergentes que indican anomalías en la estructura y función del hipocampo de los pacientes esquizofrénicos.

2.1.1. Modelo de la lesión neonatal del hipocampo ventral

Como ha sido mencionado anteriormente, datos clínicos obtenidos en pacientes esquizofrénicos han demostrado la presencia de una deaferentación córtico-límbica en la fisiopatología de la enfermedad,

que podría tener su origen en las fases iniciales del desarrollo cortical. En este trabajo, se ha elegido un modelo experimental validado y reconocido por la comunidad científica, que parece el más adecuado para reproducir estos déficits sutiles en la conectividad córtico-límbica durante un período crítico del desarrollo cortical.

2.1.1.1. Bases del modelo

Desde su desarrollo en 1993, el modelo de la lesión neonatal del hipocampo ventral en la rata ha sido objeto de numerosos trabajos, que han permitido un fenotipaje muy completo de este modelo. A continuación presentaremos, aunque de manera rápida, una descripción global de las bases y características de este modelo.

La lesión del hipocampo ventral (LNHV) se realiza en el día postnatal siete (DP 7) mediante inyección bilateral de una neurotoxina, el ácido iboténico. El ácido Iboténico produce efectos excitotóxicos sobre las neuronas sin afectar a las fibras de paso (Köhler y Schwarcz, 1983; Steiner y cols. 1984;). El ácido iboténico ejerce sus efectos neurotóxicos a través de su papel como agonista no selectivo de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA (Heckers y Konradi, 2003). A alta concentración, el ácido iboténico induce una activación tónica de los receptores NMDA presentes en las neuronas, que conduce a un aumento importante de la concentración intracelular del calcio. Este fenómeno, perjudicial para la integridad neuronal, se traduce en la formación de

radicales libres y la activación de procesos apoptóticos que conducen a la muerte neuronal. Esa actividad neurotóxica es mucho más fuerte al DP 7 y se demostró que la unión del GLU a los receptores NMDA es más fuerte entre el DP 4 y 9, que en la edad adulta (Baudry y cols. 1981).

2.1.1.2. Factores de modulación del modelo

La edad de la lesión: La elección del DP 7 para la lesión neonatal del hipocampo ventral ha sido soportada por trabajos que han mostrado que los animales lesionados el DP 3 presentan anomalías asociadas a los síntomas positivos similares a las observadas en los animales lesionados en el DP 7. Sin embargo, los animales lesionados el DP 14, muestran alteraciones comparables a las obtenidas en animales lesionados en la edad adulta y con un fenotipo menos completo (Wood y cols., 1997). Estos datos destacan la importancia de una afectación precoz del desarrollo cortical en la aparición de las anomalías relacionadas con la esquizofrenia. Al ser los animales en el DP 3 demasiado pequeños para la cirugía, la lesión se realiza el DP 7.

Extensión de la lesión: Los animales lesionados (LNHV) que presentan lesiones que alcanzan el hipocampo dorsal y/o la corteza entorrinal manifiestan una hipo-reactividad locomotora en respuesta a la inyección de amfetamina, lo que sugiere que la integridad de estas dos regiones es necesaria para la expresión de manifestaciones específicas

asociadas con este modelo, y que la lesión debe restringirse a la región ventral del hipocampo (Swerdlow y cols., 2001b).

Sexo: Se demostró que la lesión induce anomalías similares en los síntomas positivos entre los machos y las hembras, pero que las ratas LNHV machos presentan déficits sociales más pronunciados (Black y cols., 1998), y las hembras son las que sólo exhiben déficits mnésicos (Silva-Gómez y cols., 2003).

Influencias genéticas y ambientales: El estudio de los efectos locomotores inducidos por los factores estresantes o por la inyección de anfetamina ha mostrado la existencia de respuestas muy diferentes a la edad adulta en función de la cepa de ratas utilizadas, tanto en animales controles como lesionados (Lipska y cols. 1995c). Estos autores y otros (Madera y cols., 2001, 2003) sugieren que las consecuencias sobre el comportamiento de las lesiones están moduladas no sólo por la genética, sino también por variables ambientales.

En general, estos datos ponen de relieve la complejidad de los factores que intervienen en las características comportamentales asociadas a este modelo. Esta modulación sutil de los efectos sobre el comportamiento inducidos por la lesión recuerda el origen multifactorial de la esquizofrenia y subraya el carácter polimorfo de la expresión clínica de la enfermedad.

2.1.1.3. Alteraciones comportamentales análogas a la sintomatología de la esquizofrenia

Los síntomas positivos: Desde 1993, varios equipos han demostrado que las ratas LNHV presentan una hipersensibilidad comportamental a los factores que inducen un estrés moderado, lo que se traduce en un aumento de la respuesta locomotora inducida por la exposición a un nuevo entorno (Lipska y cols. 1993a, 1998, Flores y cols. 1996, Wan y cols., 1998; Kato y cols., 2000, 2001; Bertolino y cols., 2002, Silva-Gómez y cols., 2003, Le Pen y cols., 2000, 2003b; Alquicer y cols., 2004), por la inyección de suero fisiológico (Lipska y cols. 1993a, 1998, Kato y cols., 2000), o por un aumento de la respuesta de inmovilidad inducida por un protocolo de contención (Flores y cols., 2005a). Estos animales también muestran una hipersensibilidad comportamental a los psicoestimulantes, que se manifiesta especialmente por una exacerbación de las estereotipias inducidas por la inyección de dosis altas de apomorfina (Lipska y cols., 1993b, 1994b), y de la respuesta locomotora inducida por la inyección de anfetaminas (Lipska y cols., 1993, 1998, Flores y cols. 1996, Wan y cols., 1996; Kato y cols., 2000, 2001; Bertolino y cols., 2002, Silva-Gómez y cols., 2003). Por otra parte, las ratas LNHV muestran un aumento en el consumo de cocaína en los protocolos de auto-administración por vía intravenosa (Chambers y cols., 2002) y una sensibilización comportamental exacerbada cuando ésta es inducida por la cocaína (Chambers y cols., 2004 y 2005) y por etanol (Conroy y cols.,

2006). Por lo tanto, las ratas LNHV muestran una mayor vulnerabilidad a los efectos adictivos de las sustancias psicoactivas.

Los síntomas negativos: En animales LNHV, la prueba de la interacción social ha revelado la existencia de déficits severos caracterizados por una disminución en el tiempo empleado en las interacciones sociales asociado con el aumento de comportamientos agresivos (Sams-Dodd y cols. 1997, Becker y cols., 1999). Por otro lado, se ha demostrado una anhedonia que se manifiesta especialmente por una disminución de la preferencia por la sacarina (Le Pen y cols., 2002b).

Los síntomas de desorganización: Los animales LNHV han mostrado déficits en la memoria de trabajo espacial, como ha sido demostrado en la prueba del laberinto acuático de Morris (Le Pen y cols., 2000, Silva-Gómez y cols., 2003), del laberinto radial de 8 brazos (Chambers y cols., 1996) y del laberinto en T en la tarea de alternancia espacial (Lipska y cols., 2002, Marquis y cols., 2006). También, se ha observado que estos animales muestran alteraciones en la capacidad mnésica (Becker y cols., 2000), y en el procesamiento de la información, como lo sugiere el déficit severo puesto de manifiesto en la prueba de la inhibición por estímulo previo (Le Pen, 2000, 2002a, 2003b; Angst y cols. 2007) y en los protocolos de la inhibición latente (Grecksh y cols. 1999, Angst y cols., 2007). Por último, también han sido descritos en estos animales trastornos de atención en la tarea visuo-espacial (Le Pen y cols., 2003a).

a) Carácter evolutivo de las alteraciones comportamentales

Una característica fundamental de la esquizofrenia es la aparición tardía de los síntomas positivos, mientras que los síntomas negativos y desorganizados pueden ser perceptibles antes de la adolescencia. Los animales LNHV evaluados antes de la pubertad no han mostrado trastornos asociados con los síntomas positivos, como lo demuestra la reactividad locomotora de estos animales similar a la de los animales controles, en respuesta a los factores que inducen un estrés moderado o a la inyección de amfetamina (Lipska y cols. 1993; Sams-Dodd y cols. 1997, Wan y cols. 1998, Kato y cols. 2001; Bertolino y cols., 2002). Sin embargo, estos animales, en esta misma fase de pre-pubertad, han mostrado anomalías asociadas a los síntomas negativos, como es el caso de la disminución de las interacciones sociales (Sams-Dodd y cols., 1997).

b) Los neurolépticos y las alteraciones comportamentales

La evaluación del efecto de los NL típicos y atípicos sobre la reactividad locomotora ha mostrado una atenuación de la hiperreactividad locomotora en respuesta a los factores que inducen un estrés moderado y a la administración de psicoestimulantes (Lipska y cols. 1993a; Lipska y cols. 1994b; Sams-Dodd y cols. 1997; Al-Amin y cols. 2000; Rueter y cols., 2004; Richtand y cols., 2006). En cuanto a los síntomas negativos,

se ha observado que los NL típicos disminuyen los comportamientos agresivos en la prueba de interacción social (Becker y cols., 2003), mientras que los atípicos no muestran ninguna mejora sobre los déficits sociales (Sams-Dodd y cols. 1997, Becker y cols., 2003; Rueter y cols., 2004). Por último, el efecto de los NL típicos y atípicos sobre los déficits cognitivos es variable según el dominio cognitivo estudiado. Es el caso, por ejemplo, de los NL típicos que mejoran los déficits de memoria de reconocimiento social (Becker y cols., 2000), pero tienen un efecto variable sobre los déficits observados en la prueba de inhibición por estímulo previo (Le Pen y cols., 2002a, Zhang y cols., 2006).

2.1.1.4. Caracterización funcional, celular y molecular

Desde el desarrollo del modelo de LNHV en 1993, numerosos autores han tratado de determinar los mecanismos subyacentes a la aparición y expresión de las diferentes anomalías del comportamiento. Uno de los primeros estudios ha mostrado que el pico de secreción de hormonas gonadales característica de la adolescencia no era responsable de la aparición de cambios del comportamiento en las ratas LNHV, ya que estos trastornos se observaron en los animales que sufrieron una gonadectomía antes de la pubertad (Lipska y cols. 1994a). Además, la implicación del desarrollo aberrante de la CPF en los trastornos del comportamiento se ha demostrado por un estudio que mostró que la lesión de la CPF en el período neonatal o la edad adulta de los animales LNHV, restaura los déficits locomotores inducidos por los factores

estresantes y por la inyección de anfetaminas (Lipska y cols. 1998, Flores y cols., 2005b).

A continuación presentaremos las alteraciones celulares y moleculares descritas en los animales LNHV en la edad adulta, mediante la caracterización estructural y funcional de las principales estructuras implicadas en la esquizofrenia, incluido la CPF y el núcleo accumbens (Nacc).

Alteraciones estructurales: Los datos sobre la arquitectura macroscópica del cerebro de los animales LNHV son bastante limitados, siendo pocos los trabajos que han demostrado la existencia de anomalías. Así, una cartografía de las células en apoptosis ha demostrado que existen células con ADN fragmentado en las zonas de inyección del ácido iboténico. Al contrario de los animales lesionados en la edad adulta, se han encontrado células en apoptosis también en las zonas más remotas como el NAcc, el estriado y las regiones corticales (Khaing y cols., 2000). Además, se ha mostrado una reducción del número de neuronas en la CPF de los animales LNHV asociada a una disminución en la tasa del N-acetilaspártato (NAA), un marcador de la integridad de las neuronas piramidales de la CPF (Bernstein y cols. 1999; Bertolino y cols., 2002). Por otra parte, estudios histológicos han mostrado una disminución de la densidad de las dendritas de las neuronas piramidales de la CPF y una disminución en la densidad de las espinas dendríticas de las neuronas del NAcc (Flores y cols. 2005c). Estas anomalías morfológicas están asociadas a un incremento de las

concentraciones proteicas de ciertos factores presinápticos, como la proteína de la membrana asociadas a vesículas en la CPF (Halim y cols., 2003). En general, estos datos revelan la existencia de alteraciones en la conectividad neuronal, a nivel cortical y sub-cortical y recuerda algunas alteraciones histológicas descritas en pacientes con esquizofrenia.

Alteraciones funcionales: con respecto a la actividad cerebral global, un estudio reciente de imagen funcional en condiciones basales mostró una disminución del flujo sanguíneo cerebral en la corteza temporal asociado con un aumento de flujo sanguíneo cerebral en la CPF, el NAcc, el pallidum ventral y el núcleo basolateral de la amígdala, lo que sugiere una desconexión funcional de las regiones corticales y sub-corticales (Risterucci y cols., 2005). Sin embargo, el nivel local de consumo de glucosa no reveló ninguna diferencia entre los animales controles y los LNHV (Gerrits y cols., 2005). Por último, los registros electroencefalográficos mostraron un aumento de la potencia espectral de algunas ondas lentas (δ y θ) durante las fases de vigilia y sueño ligero durante el período diurno y nocturno (Ahnaou y cols., 2007), sugiriendo déficits en la sincronización entre los diferentes ritmos de actividad del cerebro. Todos estos argumentos funcionales están de acuerdo con los datos histológicos y confirman la implicación de los déficits significativos de la conectividad neuronal en las ratas LNHV.

2.1.1.5. Interés y limitaciones del modelo

Los resultados presentados ponen de manifiesto que el modelo de la LNHV responde a los criterios de validez presentados por Lipska y Weinberger (2000). De hecho, este modelo se basa en la hipótesis del neurodesarrollo de la esquizofrenia, vía la inducción de una alteración de los procesos que intervienen durante un período crítico de desarrollo cerebral. Por otra parte, la evolución del fenotipo de las ratas LNHV desde el estado juvenil hasta la edad adulta, imita el curso de la enfermedad. Los modelos animales que imitan la historia natural de la enfermedad son muy pocos y son herramientas muy interesantes para estudiar los mecanismos responsables de la esquizofrenia. Además, los animales LNHV expresan anomalías estructurales y funcionales que han sido observadas en la esquizofrenia y que incluyen alteraciones de la conectividad neuronal, alteraciones en el funcionamiento. Por último, numerosas anomalías del comportamiento son sensibles al tratamiento con los NL, el tratamiento de referencia de las psicosis esquizofrénicas. Por lo tanto, todos los trabajos demuestran claramente el valor heurístico y predictivo de este modelo y subraya su utilidad en el estudio de la fisiopatología y del tratamiento de la esquizofrenia. No obstante, el uso de este modelo tiene varias limitaciones.

La principal limitación de este modelo es que la lesión producida en el hipocampo ventral induce daños mucho más masivos que las alteraciones neuropatológicas observadas en los pacientes esquizofrénicos. Asimismo, los modelos animales no permiten tener en

cuenta el carácter aleatorio de los eventos ambientales que pueden modificarse en el curso de la vida de un sujeto vulnerable a la esquizofrenia, ya que se considera que todos los animales LNHV evolucionarán inevitablemente a la expresión en la edad adulta de los trastornos del comportamiento asociados con la enfermedad. A pesar de estas limitaciones, la utilización de este modelo es un paso necesario, no sólo para precisar los mecanismos fisiopatológicos de la esquizofrenia, sino también para desarrollar nuevos enfoques terapéuticos más novedosos para la prevención y el tratamiento de la enfermedad.

3. Evaluación comportamental de los efectos de la administración de los NL atípicos.

3.1. Reflejo auditivo de sobresalto e inhibición por estímulo previo

3.1.1. El Reflejo Auditivo de Sobresalto

Ante un estímulo sonoro inesperado y de gran intensidad, se produce en los mamíferos una reacción de alarma generalizada o sobresalto, denominada reflejo auditivo de sobresalto (RAS). Esta reacción presenta una respuesta motora refleja, que consiste en la contracción súbita e instantánea de amplios grupos musculares estriados (respuesta de sobresalto), y una respuesta del sistema nervioso autónomo, caracterizada por un aumento de la presión sanguínea y de la frecuencia cardíaca (Landis y Hunt, 1939; Baudrie y cols., 1997). En el

hombre, se ha definido la respuesta de sobresalto como una respuesta flexora generalizada que afecta principalmente a la parte superior del cuerpo (cara, cuello y hombros) (Brown, 1995). En la rata, la respuesta de sobresalto no produce apenas desplazamiento del animal, observándose una respuesta general de flexión con encogimiento de los hombros, dorsiflexión del cuello y un acortamiento de la longitud del cuerpo en general (Yeomans y Frankland, 1995), como medida preparatoria para un posible golpe o ataque. La contracción súbita de todos estos músculos provoca que el animal dé un respingo, que es proporcional a la intensidad de la respuesta de sobresalto (amplitud), y su medición, junto con la latencia del reflejo, es lo que generalmente se emplea en la cuantificación del reflejo (Davis y cols., 1982), siendo la **latencia** el tiempo transcurrido desde que se presenta el estímulo sonoro hasta que se inicia la respuesta de sobresalto. El significado biológico del RAS es fundamentalmente originar un estado de alerta generalizado que tiene una función de protección frente ataques por depredadores, habiéndose observado esta respuesta incluso en invertebrados (Hoy, 1989; Miller y Surlykke, 2001). Tras la respuesta de sobresalto, se pueden empezar a observar movimientos defensivos, acciones de orientación o también acciones evasivas (Yeomans y Frankland, 1995).

3.1.1.1. Circuito neuronal

El registro de la actividad electromiográfica de las extremidades posteriores de la rata muestra que el RAS presenta una latencia de 8 ms

(Davis y cols., 1982), de 6-7 ms para registros en las extremidades anteriores (Ison y cols., 1973), y de sólo 5-6 ms para registros en los músculos del cuello y cara (Hammond y cols., 1972). Estas latencias tan cortas indican que solamente unas pocas sinapsis son las implicadas en el circuito neuronal de este reflejo (Lee y cols., 1996; López y cols., 1999, lo que indica que es un circuito simple.

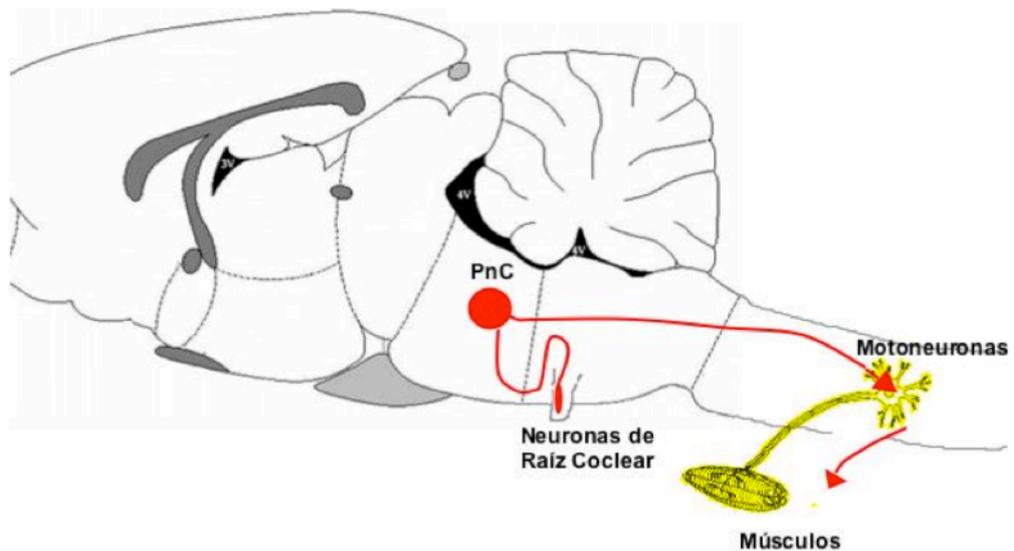


Figura 2: Esquema del circuito neuronal del reflejo auditivo de sobresalto. Las NsRC proyectan a las neuronas del núcleo reticular pontino caudal (PnC), y éstas a las motoneuronas de la médula (Gómez y López, 2006).

3.1.1.2. Modulaciones

El reflejo auditivo de sobresalto posee varias formas de plasticidad como son: la habituación, la sensibilización, la inhibición por estímulo previo y la potenciación por miedo, que hacen de este fenómeno uno de los modelos experimentales más atractivos para la Neurociencia.

De hecho, estas modulaciones o modificaciones del RAS muestran sorprendentes similitudes entre diferentes especies, desde roedores hasta humanos (Brown y cols., 1951; Geyer y Braff, 1987; Grillon y cols., 1994), lo que les convierte en una valiosa herramienta para la extrapolación de datos entre especies. La habituación es el descenso de la amplitud de la respuesta debida a la repetición de un estímulo. Esta habituación se ha descrito que se produce a corto plazo, tras varias estimulaciones, o a largo plazo, tras varias sesiones en las que se valoró el reflejo de sobresalto. La sensibilización es el aumento de la amplitud de la respuesta por la aplicación de un estímulo aversivo que activa otros sistemas sensoriomotores y produce un efecto facilitador.

La potenciación por miedo consiste en lograr un aumento de la respuesta asociando un estímulo aversivo a un estímulo neutro (condicionado) de forma que la aplicación de éste, junto con el estímulo desencadenante provoque una respuesta aumentada, siendo este caso un aprendizaje condicionado. Los procesos neuronales que regulan este paradigma son principalmente el núcleo central de la amígdala y sus proyecciones eferentes hacia varias áreas del cerebro relacionadas con el circuito de sobresalto (Davis, 1990). Otra de las modificaciones que puede sufrir el RAS es la inhibición por estímulo previo, que explicaremos en detalle en el siguiente apartado.

3.1.2. La inhibición por estímulo previo

Una de las modulaciones más interesantes del RAS es la llamada “inhibición por estímulo previo” (IEP) o, en la traducción literal del correspondiente término anglosajón, “pre-pulse inhibition”(Ison y Hammond, 1971). La IEP es un proceso fisiológico en el que la respuesta de sobresalto ante un estímulo auditivo queda reducida, o incluso abolida, cuando el sonido o ruido que en condiciones normales debería desencadenar el RAS, es precedido por otro estímulo sensorial de baja intensidad (pre-estímulo), no desencadenante del RAS (Figura 9). La inhibición del RAS, en el hombre, se produce cuando el intervalo entre los estímulos, es decir el periodo de tiempo comprendido entre el pre-estímulo y el estímulo desencadenante de la respuesta de sobresalto, es de 30-500 ms.

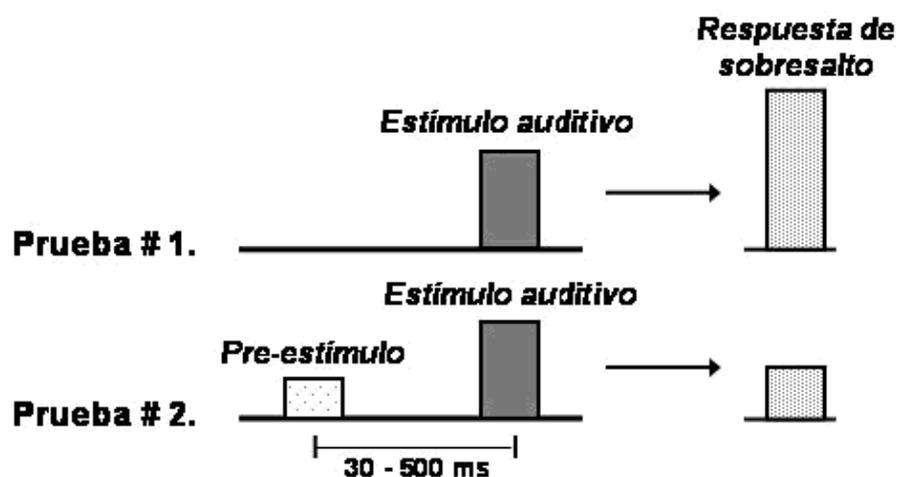


Figura 3: La IEP es una notable disminución en la magnitud de la respuesta de sobresalto (expresada en las ordenadas) cuando el estímulo auditivo es precedido por un estímulo débil.

Este fenómeno de atenuación es un mecanismo general, no sólo concerniente al sistema auditivo, ya que la respuesta de sobresalto puede ser también inhibida por pre-estímulos táctiles o visuales (Buckland y cols., 1969; Pickney, 1976).

La IEP no presenta habituación (Wu y cols., 1984), aunque ésta puede mostrarse si los pre-estímulos tienen una intensidad cercana al umbral de detección (Gewirtz y Davis, 1995). Así pues, la IEP no es un fenómeno condicionado y tampoco presenta extinción. Además, la duración entre el pre-estímulo y la respuesta de sobresalto es demasiado corta para evocar una inhibición voluntaria o un aprendizaje. La IEP depende fundamentalmente de la intensidad del pre-estímulo y del intervalo inter-estímulo. Cuanto mayor es la intensidad del estímulo acústico previo, mayor es la IEP observada (Hoffman y Ison, 1980; Li y cols., 1998). Una característica destacable de este fenómeno es el efecto tan prolongado que tiene el pre-estímulo sobre la respuesta de sobresalto, a pesar de su corta duración.

En cuanto al significado biológico de la IEP, la interpretación más común es que se trata de una simple distracción que interrumpe el procesamiento neuronal (Filion y cols., 1998; Schell y cols., 2000). En la IEP, el procesamiento del estímulo de sobresalto (pulso) podría ser interferido por el procesamiento del preestímulo (prepulso) o por los eventos motores relacionados con la respuesta de sobresalto frente al prepulso. Esto podría ilustrar un mecanismo de control neuronal del comportamiento. Según la teoría de “la protección del procesamiento de

la información” (Graham, 1975), la IEP es necesaria para proteger el proceso de reconocimiento del estímulo y para la organización de secuencias del comportamiento (Blumenthal y cols., 1996) en ese intervalo de tiempo crítico. De esta forma, la percepción de pre-estímulos sería muy importante en ciertos casos, en los que un sobresalto tendría menos valor defensivo o de supervivencia (Graham, 1979).

3.1.3. Bases neuronales de la inhibición del reflejo auditivo de sobresalto

Hasta el momento presente, se han propuesto diferentes modelos neuronales basados en la neuroanatomía y neuroquímica de las estructuras implicadas en la IEP; todos ellos tienen en común que dicho circuito debe de estar localizado cerca del circuito del reflejo de sobresalto, siendo el núcleo reticular pontino caudal (NRPC) presente en la formación reticular la estructura donde tiene lugar esa inhibición (revisado en Fendt y cols., 2001; Swerdlow y cols., 2001).

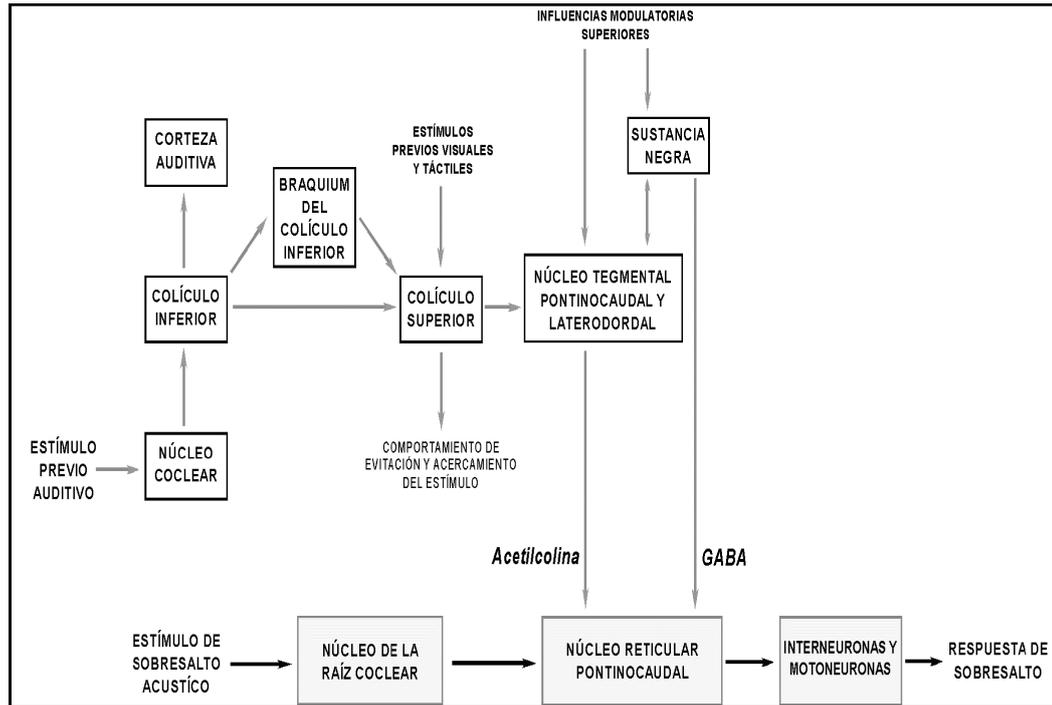


Figura 4: Diagrama ilustrativo del circuito responsable de la inhibición por pre-estímulos del reflejo de sobresalto (Figura modificada de Fendt y cols., 2001). En negro se representan los núcleos del circuito del RAS y en gris las vías que median en la IEP.

3.1.4. La inhibición por estímulo previo como herramienta experimental

Al igual que el RAS, la inhibición por estímulo previo del reflejo de sobresalto se está consolidando como un buen modelo experimental para estudios comportamentales en la rata (Swerdlow y cols., 1992; Swerdlow y cols., 2000). Gran parte del éxito de este modelo experimental radica en la facilidad de la medición de la IEP en este animal. Dentro de cada especie, las características de la IEP son muy similares en todos los individuos sanos y, por ello, la medición de su latencia e intensidad se ha convertido en una prueba cada vez más usada para evaluar el estado del sistema auditivo periférico y central, además de evaluar ciertos

componentes acústico-motores del sistema motor (Swerdlow y cols., 2001). De esta forma, la IEP nos indica la capacidad del cerebro para procesar la información y puede ser medida en diferentes especies, incluidas ratas y humanos (Graham, 1975; Hoffman y Ison, 1980; Valls-Solé, 1998). Debido a este motivo, es importante destacar que la regulación neuronal de la IEP, que se ha descubierto a través de manipulaciones en animales experimentales, ha podido ser validada (Swerdlow y cols., 2001). En las últimas décadas, la investigación sobre la IEP ha crecido en importancia (Fendt y cols., 2001; Hoffman y Ison, 1980; Koch, 1999; Koch y Schnitzler, 1997), ya que la magnitud de la IEP puede modificarse mediante tratamientos farmacológicos, como por ejemplo, tras la administración de agonistas dopaminérgicos (Swerdlow y cols., 1992) o por modificaciones ambientales, como se ha demostrado con ratas sometidas a aislamiento social (Swerdlow y Geyer, 1998).

Un aspecto particularmente relevante es que la IEP se encuentra alterada en determinadas patologías neuropsiquiátricas como la esquizofrenia (Geyer y Braff, 1987; Kumari y cols., 2000; Swerdlow y cols., 1996; Swerdlow y cols., 2000), la enfermedad de Huntington (Swerdlow y cols., 1995), o estados de estrés (Koenig y cols., 2005; Powell y cols., 2003), enfermedades a las que la sociedad actual concede cada vez mayor importancia por los problemas conductuales que llevan asociadas. Hechos como éste, hacen que la medición de la IEP se esté convirtiendo en una herramienta diagnóstica cada vez más utilizada en la práctica clínica por su fiabilidad, sencillez y economía. Así, se está empleando como un marcador fisiológico para el diagnóstico de estas

enfermedades, debido a que la IEP implica un mecanismo de compuerta (*gating*) para la información sensorial (Kumari y cols., 2000; Martínez y cols., 2000). Además, la evaluación de la IEP puede emplearse como parámetro objetivo para evaluar la eficacia de la terapia empleada, así como para ver la acción de diversas manipulaciones experimentales, fisiológicas o conductuales (Geyer y cols., 2001).

3.1.5. Inhibición por estímulo previo y Esquizofrenia

Un hallazgo muy replicado en la esquizofrenia es la disminución de la IEP, proceso cuyas bases tienen relación tanto con la función dopaminérgica como con la función prefrontal. En este proceso, los animales y las personas normales presentan una respuesta de sobresalto reducida cuando se les expone a un ruido intenso precedido por un sonido más débil. Las personas con esquizofrenia, sin embargo, presentan menos inhibición en la respuesta y se sobresaltan significativamente más con el segundo tono.

De esta forma, los cambios corticales en la esquizofrenia podrán verse reflejados en las características de la IEP, como correlato fisiológico-cognitivo. Esta idea se basa en varios hechos. Primero, las funciones de atención/proceso de la información elaborada son en buena medida corticales, y hay un déficit variable de materia gris cortical en la esquizofrenia. Segundo, hay una relación clara del déficit de la IEP con el inicio precoz de la enfermedad (Kumari y cols., 2000), y se admite una relación de ese inicio precoz con una mayor intensidad de trastornos

estructurales cerebrales en la esquizofrenia (Johnstone y cols., 1989). Tercero, la integridad de la función frontal se ha demostrado necesaria para una adecuada IEP en esquizofrenia (Hazlett y cols., 1998). Cuarto, se admite una implicación de la función dopaminérgica en la IEP. Por último, se ha demostrado que los pacientes tratados con atípicos (clozapina y RISP) tenían una IEP normal, pero no los que eran tratados con típicos (Kumari y cols., 2002). El estudio de la IEP ofrece una excelente oportunidad para el estudio del déficit del proceso de la información y la atención en la esquizofrenia. En particular, el déficit de la IEP en esquizofrenia puede reflejar una menor capacidad inhibitoria cortical que contribuyese a la incapacidad de filtrar adecuadamente estímulos y por tanto a procesar peor la información, incluso extrayendo conclusiones aberrantes de los mismos. Un tratamiento adecuado puede mejorar esa capacidad de filtrado y proceso de la información, lo que en el caso de fármacos como la RISP y clozapina es apoyado por los cambios metabólicos corticales (Molina y cols., 2003; Molina y cols., 2005).

3.2. Prueba del Campo Abierto

La prueba del campo abierto (CA) fue descrita por Hall (1934) para el estudio de la emotividad en ratas (Prut y Belzung, 2003). El procedimiento consistía en exponer un animal, generalmente un roedor, a un ambiente desconocido del cual no pudiera huir debido a la existencia de paredes (Walsh y Cummins, 1976). El aparato de Hall consistía en una arena bien iluminada de cerca de 1,2 m de diámetro, delimitada por

paredes con 0,45 m de altura. Se colocaban las ratas en el anillo exterior del campo y se observaba su comportamiento durante 2 minutos, durante ensayos repetidos diariamente. En ocasiones, se estudiaban las ratas después de 24 a 49h de privación alimentaria, observándose que las ratas deambulaban más cuando estaban en ayunas (Hall, 1998). Las ratas que no comían se clasificaron como emocionales/ emotivas y cuando eran comparadas con ratas no emotivas, éstas presentaban menos entradas en la zona central del CA y tenían mayores niveles de defecación (Prut y Belzung, 2003).

Desde entonces, existen distintas versiones del campo abierto, en las cuales se puede cambiar la forma del campo (circular, cuadrada o rectangular), la iluminación (luz desde arriba o luz desde abajo con suelo transparente, o a veces luz roja), la existencia de objetos dentro de la arena, como plataformas, túneles, columnas (Takahashi y Kalin, 1989).

En cualquiera de los casos, el experimento implica la exposición del roedor a una situación novedosa. Se colocan los animales en el centro o cerca de la pared y se registra su comportamiento durante un periodo que puede variar de 2 a 20 minutos. Durante este período, se evalúa la locomoción horizontal (número de veces que se cruzan las líneas marcadas en el suelo), la frecuencia con la que el animal se dispone en posición vertical (*rearing*) y las actividades de aseo y movimientos orofaciales (*grooming*).

Debido a la enorme versatilidad de esta prueba, hay quien duda de su reproductibilidad (Stanford, 2007). Así, y para que se pueda

reproducir, es fundamental la descripción detallada del aparato utilizado, así como de los tiempos de prueba y de las variables empleadas.

La prueba del campo abierto es de gran utilidad para evaluar el estrés y la ansiedad ante un ambiente novedoso. También la locomoción del animal en ese mismo ambiente. No se trata de evaluar un tipo de ansiedad patológica, sino más bien el tipo de ansiedad al que uno se enfrenta cuando confrontado con un ambiente estresante o amenazador (Prut y Belzung, 2003).

3.3. Prueba de Evitación Activa

Thorndike, fue el primer innovador en el campo del condicionamiento instrumental. En su principal experimento (Thorndike, 1898), colocó a unos gatos hambrientos en una caja–problema candada, cuya puerta se abría en cuanto se golpeaba un pestillo situado dentro de la jaula, permitiendo así al gato acceder a la comida que se encontraba fuera de la caja. Cuando Thorndike introdujo por primera vez los gatos en la jaula, éstos se agitaban desordenadamente de un lado para otro, buscando la forma de escapar. Sin embargo, después de cierto tiempo, los gatos golpeaban inevitablemente el pestillo, permitiéndoseles comer tras abandonar la caja. A medida que se repetía esta situación, la conducta de los gatos fue haciéndose más eficaz, necesitando cada vez menos tiempo para golpear el pestillo en los siguientes ensayos. Evidentemente, los gatos habían aprendido una respuesta (golpear el pestillo) tal como lo demuestra el hecho de la ejecutaban inmediatamente

después de volver a ser colocados en la jaula. A este tipo de aprendizaje se le denomina **condicionamiento instrumental**, porque la conducta del animal es un instrumento para obtener la consecuencia deseada (la comida).

Estímulo incondicionado (reforzante): el estímulo incondicionado (EI) es cualquier estímulo intenso o potente que suscita de forma regular una respuesta no aprendida y medible. Estos estímulos tienen efectos predecibles sobre la conducta en el sentido de que siempre provocan una respuesta de tipo refleja sobre la que el sujeto parece no tener control. En el condicionamiento instrumental, el EI se presenta únicamente *después* de que se ha realizado la respuesta deseada. En el experimento de Thorndike, el EI es la comida.

Respuesta incondicionada (RI): respuesta no aprendida y medible suscitada de forma regular por el EI. En el condicionamiento instrumental esta respuesta es frecuentemente anómala en el sentido de que no guarda semejanza alguna con la respuesta condicionada.

Estímulo condicionado (EC): estímulo originalmente “neutro” que antecede la presentación del EI. Es neutro, en el sentido de que no tiene un efecto tan dramático sobre el organismo como el EI, si bien el EC puede suscitar algunas reacciones manifiestas, como movimientos de cabeza o parpadeos si el animal percibe el estímulo y le presta atención. No siempre tiene que existir un EC explícito; puede actuar como EC todo el medio (por ejemplo para los gatos de Thorndike el EC era la caja, no había ni luces ni sonidos). Sin embargo, puede haber una clave explícita a la que se denomina estímulo discriminativo (E_d). El EI no sigue

necesariamente al estímulo discriminativo – sólo lo hace *si el sujeto responde*. Por consiguiente, la clave discriminativa simplemente informa al sujeto de la disponibilidad del reforzamiento.

Respuesta condicionada (RC): la respuesta evocada por el E_d o, en su defecto, por un complejo de EC, y que va seguida por el reforzador. Normalmente es una respuesta voluntaria y motora, sin embargo puede ser cualquier respuesta seleccionada como correcta por el experimentador. Tal como ya se ha dicho, la RC raramente se asemeja a la RI. Es una respuesta arbitraria y adquirida que puede ser fortalecida mediante reforzamiento tanto positivo como negativo.

3.3.1. Paradigmas básicos de condicionamiento

Hay cuatro tipos principales de experimentos de condicionamiento instrumental: el **entrenamiento de recompensa**, procedimiento de ensayo y error mediante el cual el sujeto recibe un reforzamiento positivo para realizar la respuesta correcta; el **condicionamiento de escape o evitación**, en el cual la respuesta especificada es instrumental para terminar un estímulo aversivo o para impedir su aparición; el de **castigo**, que tiene lugar cuando la respuesta del sujeto produce un estímulo aversivo. Se trata de una situación semejante al entrenamiento de recompensa excepto en que la consecuencia es negativa; el entrenamiento de omisión, la situación en que la respuesta impide la presentación de un EI positivo o apetitivo.

En este trabajo, hemos trabajado con el **condicionamiento de escape o evitación**, que se ha popularizado en la experimentación animal.

3.3.2. Factores del condicionamiento de evitación

Intensidad del EI: el choque eléctrico ha de ser lo suficientemente intenso como para producir una respuesta, pero hasta cierto punto, pues niveles altos en la intensidad de choque retrasan la actuación en la evitación debido principalmente a que provocan respuestas competitivas que perturban el aprendizaje. El punto óptimo parece estar entre los 0,5 y los 3 mA.

Intervalo entre EI-EC: la rapidez en la respuesta disminuye a medida que se aumenta este intervalo, sin embargo la tasa de adquisición de la evitación mejora a medida que se aumenta este mismo intervalo. En los intervalos más largos entre EC y EI existen más oportunidades de realizar una respuesta de evitación, lo que posibilita una mejor actuación. El punto óptimo parece estar entre los 2 y los 4 segundos.

Intervalo entre ensayos: las respuestas de evitación se hacen más rápidas y probables cuanto mayor es la duración del intervalo entre ensayos, hasta llegar a un punto máximo después del cual vuelven a disminuir las respuestas. Ese punto parece oscilar entre los 0,5 y los 120 segundos.

3.3.3. Significado de la Prueba

El condicionamiento de evitación activa parece ser un modelo adecuado en el estudio del **aprendizaje** y del deterioro del mismo asociado a la edad (Fuchs y cols., 1986).

De Wied ha utilizado los paradigmas de la Evitación Activa y Pasiva para el estudio de la memoria, en la cual parecen intervenir la vasopresina y oxitocina de forma opuestas (McEwen, 2004).

La prueba de la EA también se emplea en el estudio de procesos **atencionales** y en este caso, la región **PL** de la CPF parece estar implicada de forma indirecta. Estudios de lesión lo indican: al producir una lesión en la CPF, que mantenga la región PL intacta, disminuye la capacidad para la EA. Si la lesión ocurre en la región PL, la EA se realiza con mucho éxito (Brito y Brito, 1990; Fritts y cols., 1998). También es evidente que, cuando se lesiona la PL los animales presentan menos fenómenos relacionados con el miedo (*freezing*), menor aumento en la TA en respuesta al estímulo incondicionado – choque eléctrico. Como la CPF envía eferencias hacia estructuras motoras, límbicas y SN autónomo, es posible que una reducción en la sensación de miedo (como puede ocurrir ante el choque), ayude a responder de la forma adecuada. La remoción de dicha área puede disminuir la sensación de miedo (Fritts y cols., 1998).

II-HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis de trabajo

El impulso para estudiar la esquizofrenia está en gran medida justificado tanto por su prevalencia como por su pobre pronóstico. Teniendo en cuenta los resultados preliminares de nuestro grupo, esperamos obtener una mejoría del déficit de la PPI en el modelo animal de esquizofrenia al tratarlo con antipsicóticos y además, obtener un aumento en el volumen de la sustancia gris cortical. Esperamos poder averiguar a costa de qué elementos estructurales se produce ese incremento volumétrico, probablemente a expensas de un incremento de neuropilo mediado por sinaptogénesis. Una de nuestras hipótesis es que el tratamiento con risperidona inducirá sinaptogénesis de neuronas inhibitorias corticales, cuya consecuencia funcional será una mejoría del déficit de PPI.

Por otro lado, como hemos descrito ampliamente, hay una relación entre las alteraciones metabólicas y la administración de neurolépticos en los enfermos con esquizofrenia. Intentaremos confirmar en este modelo animal la relación de la lesión hipocampal con la aparición de alteraciones metabólicas, de forma similar a lo que ocurre con la esquizofrenia en el hombre. Ya que se desconoce si los efectos metabólicos descritos con algunos antipsicóticos representan una exacerbación de fallos previos a la instauración del tratamiento, es de esperar que el estudio tras la administración crónica de los mismos en un modelo experimental nos dé la respuesta: aparición de alteraciones no

halladas en el modelo, o la intensificación de las ya descubiertas en el mismo.

2. Objetivo general

El objetivo del presente trabajo es profundizar en los efectos conductuales, morfológicos y bioquímicos producidos por la administración crónica de un antipsicótico atípico, la RISP, en un modelo de esquizofrenia experimental en ratas.

2.1. Objetivos específicos

1. Caracterizar las diferencias conductuales entre los animales lesionados y falsos lesionados, tratados de forma crónica con RISP o su vehículo.
2. Estudiar la evolución de los cambios morfológicos producidos en la región prelímbica, tras el tratamiento crónico con RISP.
3. Estudiar las variaciones que puede producir la RISP en el perfil de expresión génica cortical de los receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos en los animales lesionados y falsos lesionados.
4. Estudiar el efecto de la administración crónica de la RISP sobre la actividad lipolítica de los animales lesionados y falsos lesionados.

2.2. Descripción pormenorizada de los objetivos con la metodología a seguir

- Para alcanzar el **objetivo 1**, “*Caracterizar las diferencias conductuales entre los animales lesionados y falsos lesionados, tratados de forma crónica con RISP o su vehículo*”, iniciaremos el estudio con la técnica quirúrgica encaminada a lesionar bilateralmente el hipocampo, mediante inyección de ácido iboténico en las ratas LNHV y de suero fisiológico en las ratas falsas lesionadas.
- Para verificar la eficacia del método de administración de los fármacos, determinando los niveles plasmáticos de los mismos”, nos planteamos analizar por cromatografía líquida / tándem espectrometría de masas la RISP y su metabolito, el 9-OH-RISP en plasma.
- El abordaje experimental para medir los cambios conductuales fue:
 - b. Evaluar la IEP en diferentes momentos del tratamiento.
 - c. Evaluar la actividad locomotora y de exploración ante un ambiente novedoso, vía con la prueba del Campo Abierto.
 - d. Evaluar la modificación del aprendizaje y la memoria, así como los procesos atencionales, a través de la realización de la prueba de Evitación Activa.

- Para alcanzar el **objetivo 2**, *“Estudiar la evolución de los cambios morfológicos producidos en la región prelímbica, tras el tratamiento crónico con RISP”*, la aproximación experimental elegida fue:
 - d. analizar el grosor de la región prelímbica
 - e. determinar inmunohistoquímicamente el número de neuronas y astrocitos en la misma región.

- Para alcanzar el **objetivo 3**, *“Estudiar el perfil de expresión génica de receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos y otros receptores implicados en la esquizofrenia”*, al finalizar el estudio *in vivo*, nos planteamos:
 - f. cuantificar la expresión receptorial mediante técnica de RT-PCR en hipocampo y CPF, de los receptores dopaminérgicos D₂ y serotoninérgicos 5-HT_{2A}.

- Para abordar el **objetivo 4**, *“Estudiar el efecto de la administración crónica de la RISP sobre la actividad lipolítica de los animales lesionados y falsos lesionados”*, las aproximaciones experimentales fueron:
 - g. estudiar el efecto de la administración crónica de RISP sobre el peso y la adiposidad de los animales por medio de una curva ponderal y estudio morfológico de los adipositos
 - h. estudiar el efecto de la lesión en el metabolismo lipídico de las ratas mediante análisis sanguíneo, actividad lipolítica y la

respuesta insulino secretora *in vivo* y en islotes pancreáticos.

- i. Estudiar el efecto de la administración crónica de RISP sobre los parámetros metabólicos descritos en el punto anterior.

III - MATERIALES Y MÉTODOS

1. Diseño experimental

Con el objetivo de evaluar los posibles cambios comportamentales y morfológicos que podría producir la RISP, en los animales LNHV, en comparación con los animales falsos lesionados, los animales se sometieron un tratamiento crónico con dicho fármaco o su vehículo durante un periodo de 65 días. El tratamiento se inició durante el periodo pre-pubertal, el DP35, y se terminó en el periodo de post-pubertad el DP100, de manera que se cubren todos los períodos de madurez del animal.

La figura 5 muestra el esquema cronológico del diseño experimental empleado en nuestro estudio. Se indican los días postnatales en que se realizaron, tanto la cirugía, como las pruebas conductuales, y la toma de muestras para la realización del resto de los estudios llevados a cabo.

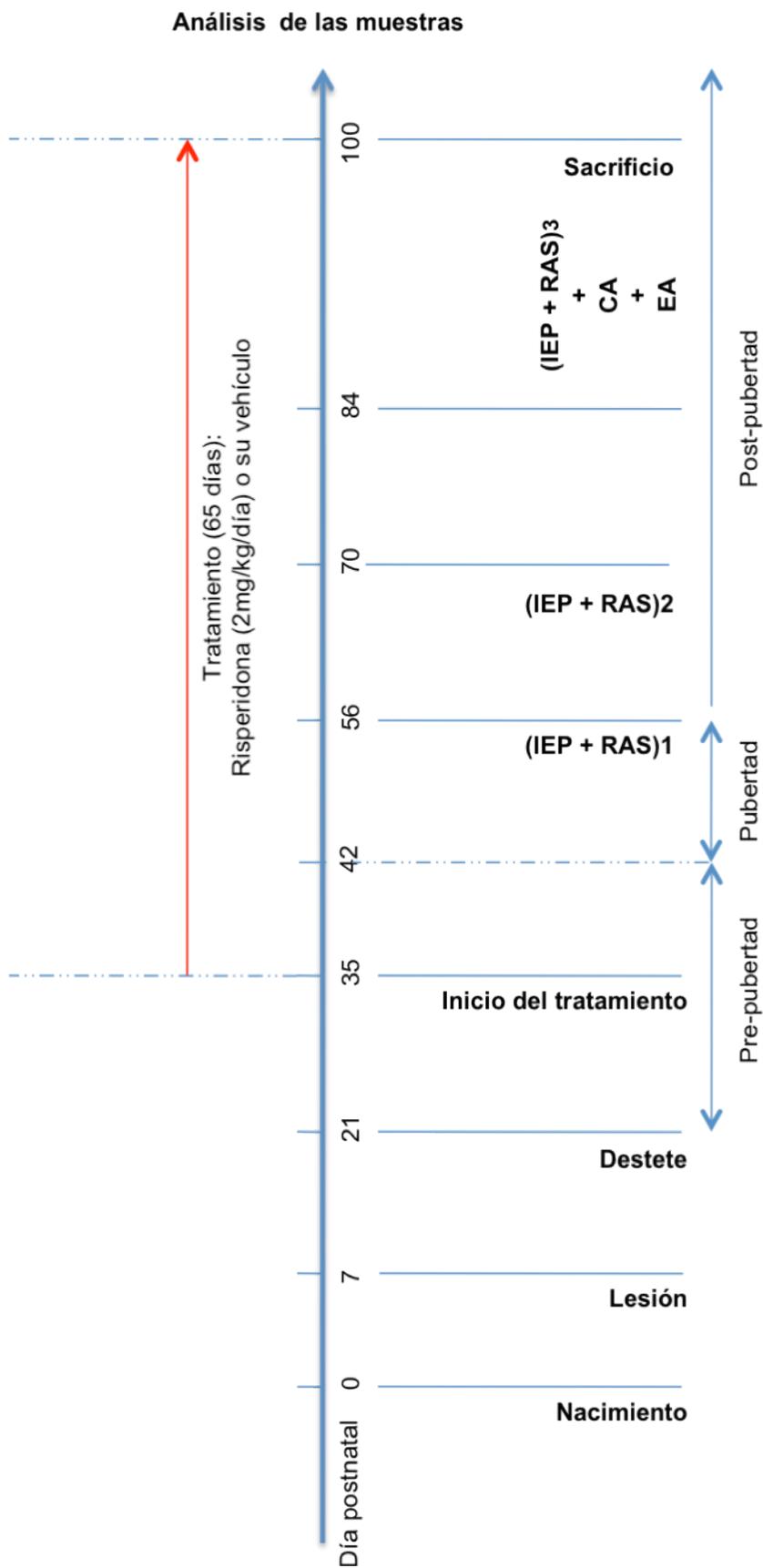


Figura 5. Esquema general del diseño experimental, donde se muestra el desarrollo temporal de las distintas pruebas del comportamiento de los animales. Tras el sacrificio de los animales, se procedió, de una parte, al estudio histológico, y inmunohistoquímico de los cerebros perfundidos y de expresión génica de las muestras frescas del hipocampo y de la CPF, y de otra parte, se realizó un estudio bioquímico de las muestras de sangre y de los tejidos adiposos.

2. Animales de experimentación

En este estudio se emplearon ratas hembras (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar de 15 a 18 días de gestación, facilitadas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (SEA, Universidad de Salamanca, España). La fecha del parto se tomó como día postnatal 0 (DP 0), y en el día P4, se formaron camadas de 4 a 8 crías formadas solamente por machos, que son los que se emplearon en nuestro estudio. Al DP 7, las crías de cada camada se repartieron aleatoriamente en dos grupos, uno que se sometió a la LNHV (n=14), y otro que recibió una falsa lesión en esta misma zona cerebral (n=14). Al DP21, se destetaron las ratas de cada grupo y se asignaron aleatoriamente a dos subgrupos de 7 animales cada uno. Uno se sometió al tratamiento crónico con la RISP, y otro se le administró el vehículo de este mismo fármaco.

En total, se establecieron cuatro grupos experimentales:

- 1- **FL**: formado por los animales falsos lesionados. Se utilizan como controles de los animales con esquizofrenia experimental (LNHV).
- 2- **LNHV**: animales lesionados bilateralmente con ácido iboténico en el hipocampo ventral.
- 3- **FL+Risp**: animales con falsa lesión tratados con RISP.
- 4- **LNHV+Risp**: animales lesionados tratados con RISP.

Todas las ratas, durante todo el periodo del estudio, se mantuvieron bajo condiciones estándar, con un ciclo luz/oscuridad de

12:12 horas y con acceso *ad libitum* a la alimentación y el agua. Todos los protocolos experimentales seguidos este en estudio fueron realizados de acuerdo a la Normativa Española vigente (Real Decreto 1201/2005), y la Normativa Europea (DOCE L 222; 24-08-1999).

3. Cirugía de la lesión neonatal del hipocampo ventral

Las lesiones neonatales en el hipocampo ventral de los animales se realizaron según los protocolos originales descritos por Lipska y cols. (1993). Una semana después de su nacimiento, (DP 7), cada animal con un peso de 15 a 17g, se sometió a una anestesia por hipotermia durante 15 a 20 min, y se le realizó una incisión continua a lo largo de la línea media, exponiendo de este modo el cráneo. El animal se fijó al aparato estereotáxico de pequeños roedores (Stoelting, Wood Dale, EE.UU), y se localizaron bilateralmente en la superficie del cráneo, la zona interés de nuestro estudio, el HV. La fijación del animal en el estereotáxico consistió en colocar sus incisivos al nivel del plano interaural horizontal y aplicar las barras de las orejas contra sus conductos auditivos, permitiendo de este modo inmovilizar la cabeza del animal en un plano perfectamente horizontal. La localización de la zona de interés, por su parte, se realizó refiriéndose al punto Bregma, situado en la intersección de las suturas medianas y anteriores del cráneo, en que todas las coordenadas del sistema se ajustaron al valor 0. Se abrieron después dos ventanas a cada lado del cráneo, y se inyectó el ácido iboténico (Sigma, St Louis, MO) (10 µg/µl en PBS 0,1 M, pH 7,4) o el PBS (0,1 M, pH 7,4) con la ayuda de una

jeringa Hamilton de 5 µl conectada a un microinyector (Kopf Ins., Tujunga, CA, EE.UU), a un flujo continuo de 0,15 µl/min. Las coordenadas de inyección fueron: - 3,0 mm anteroposterior (AP), ± 3,5 mm mediolateral (ML) y - 5,0 mm ventrodorsal (VD) con respecto al bregma (Lipska y cols., 1993). Después de cada inyección, la aguja se mantuvo colocada en el cerebro 3 a 4 min para minimizar de este modo posibles reflujos del neurotóxico o del PBS. Terminado el procedimiento de la lesión, se limpió la herida con alcohol y se cerró con cemento veterinario Vetbond™ (3M™, Veterinary Tissue Adhesive, EE.UU), dejando recuperarse al animal sobre una placa caliente a 37 °C durante unos 30 minutos, antes de devolverlo a su correspondiente madre.

4. Administración de la risperidona

El tratamiento farmacológico al que se sometieron los animales en este estudio consistió en administrarles, individualmente en cada jaula, una dosis diaria de RISP de 2 mg/kg/día, oralmente en el agua de bebida, cuyo pH fue ajustado a 4,5 con ácido cítrico (0,1M). La solución de la RISP se preparó cada 2 días, y se ajustó en función del peso y del volumen diario de agua bebido por cada animal. El vehículo de la RISP que recibieron los animales controles consistió en una solución de ácido benzoico y el ácido tartárico, a concentraciones finales de 8,25 y 25,5 nM respectivamente, con un pH final de 4,5.

5. Estudio comportamental

5.1. Respuesta de inhibición por estímulo previo

Las respuestas auditivas de sobresalto (RAS) y su inhibición por estímulo previo (IEP) se midieron en tres ocasiones de la vida del animal, al DP 56, al DP 70 y al DP84.

Aparato: Las mediciones se realizaron en el sistema SR-LAB (San Diego Instruments, San Diego, CA, USA) (Figura 6). Dicho sistema consiste en una cámara acústicamente aislada (38 x 40,5 x 58,5 cm) que contiene una caja cilíndrica de plexiglás no restrictivo (8,2 cm de diámetro), donde se coloca el animal. Esta caja lleva una plataforma con un acelerómetro piezoeléctrico susceptible de detectar todos los movimientos del animal (diferencias de fuerza ejercida sobre la plataforma). La cámara está equipada con ventilación e iluminación (10 w) propia, y también con tres altavoces. Uno de los altavoces, colocado en el techo de la cámara, permite la generación del ruido de fondo, y los otros dos, localizados a 15 cm de los dos lados de la caja de plexiglás, permiten la producción del ruido blanco (estímulo). Este sistema está conectado a un ordenador (sistema informático SR-LAB) que permite definir las características de los estímulos acústicos, la frecuencia, el orden de su aplicación y los intervalos inter-estímulos. Este sistema también permite registrar las respuestas del animal y obtener los parámetros evaluados.



Figura 6: Sistema SR-LAB donde se han llevado a cabo las mediciones del RAS y de la IEP. En la imagen de la derecha se puede observar en detalle, el cilindro en donde se coloca el animal que lleva una plataforma con un acelerómetro (la flecha) susceptible de detectar todos los movimientos del animal.

Procedimiento: Todas las mediciones fueron hechas entre las 09.00h y 12.00h. En cada medición, el animal fue sometido a un ruido de fondo de 60 dB SPL que permanece durante toda la sesión. Tras un período de aclimatación de 5 min, se le presenta al animal una serie de 64 estímulos auditivos aleatoriamente y según un cuadro latino formado por 4 bloques de 16 estímulos (Tabla 2). Los 64 estímulos están formados por 16 pulsos de 115 dB, con intervalos de 20 ms, que permiten determinar el RAS sin pre-estímulo. Los 48 estímulos que quedan consisten de 16 prepulsos de ruido blanco a cada una de las tres intensidades (65, 70 y 80 dB SPL) de duración de 20 ms, seguidas 50 ms después de un estímulo intenso de 115 dB que desencadena el RAS. En cada sesión, se evalúa el valor máximo del movimiento detectado por el acelerómetro (expresado en unidades arbitrarias y tomando como valor 0 cuando el animal está en reposo), la latencia al valor máximo (expresada en ms) y la magnitud porcentual de la IEP, que es calculada para cada intensidad del prepulso según la fórmula siguiente:

$IEP = 1 - \frac{[(\text{amplitud del RAS en ensayos con estímulo previo}) / (\text{amplitud del RAS en ensayos sin estímulo previo})] \times 100}{100}$.

5.2. Test de Campo Abierto

La actividad locomotora de los animales fue valorada mediante el test del campo abierto, a DP 86 y tras 51 días de tratamiento con RISP.

Aparato: Para la realización de esta prueba, se utilizó una circunferencia de metacrilato de 100 cm de diámetro con una pared de acrílico de 50 cm de altura, descubierta e iluminada por una lámpara de 80 W a una altura 60 cm, colocada en el centro del aparato. El suelo está dividido, mediante líneas pintadas, en 12 áreas externas pegadas a la pared y 7 áreas internas (Figura 7). Estas divisiones son arbitrarias, de dimensiones equivalentes, y permiten contar el número de veces que serán cruzadas por el animal. Las divisiones están dispuestas en círculos concéntricos que el animal puede explorar libremente.

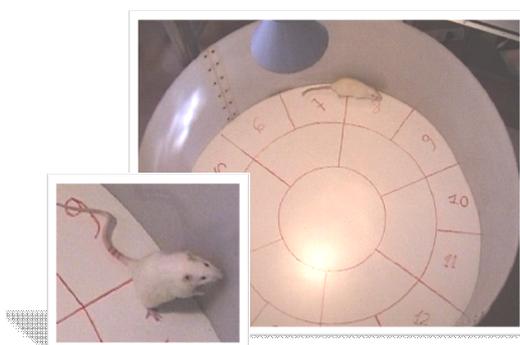


Figura 7: El aparato del campo abierto utilizado en el experimento. Las áreas pegadas a la pared del cilindro, numeradas del 1 al 12, constituyen la zona de exploración externa. Las áreas no numeradas constituyen la zona de exploración interna.

Procedimiento: Los animales se introdujeron en la arena de forma individual durante 3 minutos. El estudio se realizó durante 3 días consecutivos y siempre entre las mismas horas del día (09:00-12:00). Las observaciones han sido realizadas por dos personas, para disminuir así posibles errores de observación.

Los parámetros comportamentales evaluados durante esta prueba son los siguientes:

- **Exploración Externa:** contabilización del número de áreas externas que cruza-atravesa el animal. Los números escritos en el suelo tienen por finalidad facilitar el recuento, ya que es frecuente que los animales se desplacen con gran velocidad en esta área.
- **Exploración Interna:** idéntico a la exploración externa, pero para las áreas descritas anteriormente como internas.
- **Exploración vertical (*Rearing*):** número de veces que el animal se coloca en posición vertical, con o sin contacto con las paredes de la arena, sujetado por los miembros posteriores.
- ***Grooming*:** Movimientos de acicalamiento, restregando los ojos y limpiando el hocico, utilizando miembros superiores o la lengua.

5.3. Test de Evitación Activa

La memoria de aprendizaje de los animales del estudio fue medida al DP 88, tras 53 días de tratamiento con RISP.

Aparato: Para evaluar la modificación del aprendizaje y la memoria, así como los procesos atencionales en los animales, se ha empleado un sistema de evitación activa (Letica scientific Instruments, Spain) (Figura 8). Este sistema consiste en una caja de escape-evitación en dos sentidos, conectado a una unidad de control (Letica LI-2900). La caja (50 x 25 x 25 cm) es metálica, con una pared frontal transparente y una partición vertical de plexiglás restrictivo, que divide la caja en dos compartimentos iguales, con un orificio central (9 x 9 cm) que permite al animal de moverse libremente entre los dos compartimentos. Esto dos compartimentos, están equipados cada uno de una fuente de iluminación que sirve de estímulo condicional (EC), y de un sistema de barras de aluminio en el suelo, conectado en serie a la unidad de control que permite disparar un choque eléctrico, que sirve de estímulo incondicional (EI). Las barras de cada compartimiento están dotadas con un mini-interruptor, permitiendo que el procedimiento de la prueba y las respuestas sean controladas automáticamente.

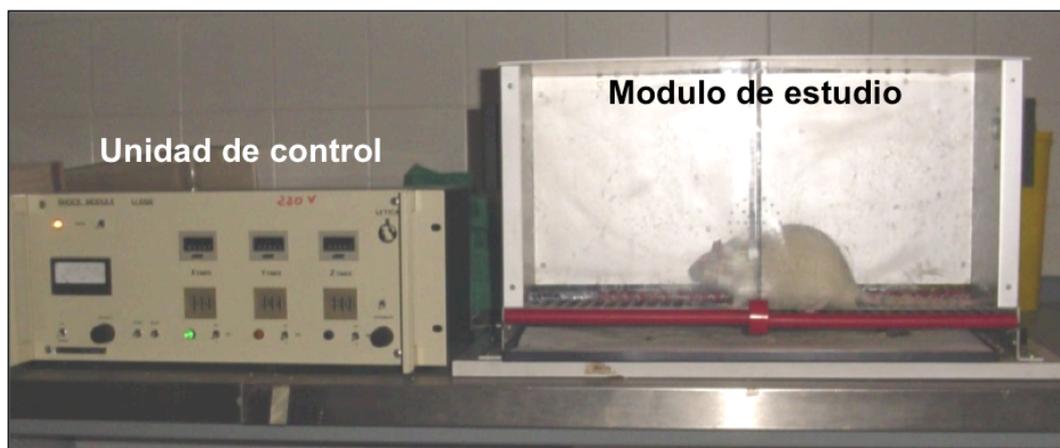
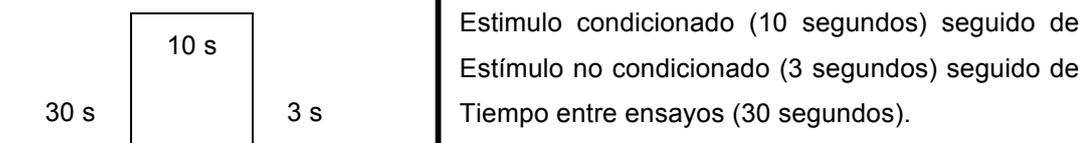


Figura 8: El aparato de evitación activa usado en nuestro experimento. En detalle se muestran la unidad de control y el módulo de estudio.

Procedimiento: Al inicio de cada test, el animal se coloca siempre en el mismo lado de la caja. Cada test es precedido por 5 minutos de adaptación a la situación experimental. A continuación, el animal realiza 10 ensayos o sesiones con un intervalo entre ensayos de 30 segundos. En cada ensayo, se presenta durante 10 segundos un luz blanca (EC), seguida de durante 3 segundos de un choque eléctrico (EI) de baja intensidad (0,25 mA) acompañado por luz. El ensayo se repite 10 veces cada día durante 10 días consecutivos.

Los parámetros de nuestro esquema de condicionamiento, pueden representarse de la manera siguiente:



Las respuestas comportamentales evaluados durante cada sesión diaria son las siguientes:

- **Evitación:** número de veces que el animal responde a la señal de la luz (EC), pasando al otro compartimiento y evitando de este modo el choque eléctrico (EI).
- **Escape:** número de veces que el animal no responde al EC, y no responde que cuando recibe el choque eléctrico.
- **Cruces entre ensayos (CEE):** número de veces que el animal cambia de compartimiento sin ningún tipo de estímulo.
- **Freezing:** número de veces que el animal se queda “congelado” y aletargado en un estado estático, ante el EC.
- **Defecaciones:** número de veces que el animal defeca.

La rata se somete a la prueba hasta que alcanza el requisito de adquisición fijado por nosotros, del 70 % de las respuestas de evitación durante al menos 3 sesiones consecutivas.

Al final de todas las pruebas conductuales, los animales fueron sacrificados a la edad de DP 100, después de 65 días de tratamiento, y se tomaron las muestras para el estudio histológico y bioquímico.

6. Obtención del material biológico para el estudio histológico

6.1. Fijación, extracción y tallado del encéfalo

Antes de iniciar el proceso de fijación, los animales fueron anestesiados profundamente con una sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg/kg de peso) por vía intraperitoneal. Tras comprobar el estado de arreflexia del animal, se procedió a la toma de muestras de sangre y de tejido adiposo para los estudios bioquímicos que detallaremos posteriormente. Después se procedió a la perfusión por vía transcardíaca del animal.

El proceso de la fijación tiene por objetivo de alcanzar una situación estable del tejido, interrumpiendo el desarrollo de los procesos orgánicos, de tal forma que el estado y la situación en que se encontraban los tejidos resulte detenido instantáneamente y conservado de la manera más fidedigna posible. Este proceso consiste en fijar el animal fijado en posición decúbito supino, abrirle la región torácica mediante la tracción del esternón. El corazón expuesto, se le introduce una cánula de perfusión en el ventrículo izquierdo hasta alcanzar la aorta ascendente y después se corta la aurícula derecha y se comienza el proceso de perfusión que consiste de dos partes, el lavado del sistema circulatorio y la fijación propiamente dicha del tejido. El lavado se realiza mediante una variante de la solución de Ringer libre de calcio a un volumen de 150 a 200 ml para cada animal (NaCl 0,85 %, KCl 0,025 % y NaHCO₃ 0,02 %) a 37 °C cuyo pH fue ajustado a 6,9 con una mezcla de CO₂ al 95% y O₂ al 5%. Para la fijación se empleó el paraformaldehído a un volumen de

aproximadamente 2 litros para cada animal (paraformaldehído al 4 % en tampón fosfato [PB] 0,1 M) a temperatura ambiente y a pH 7,4. Tanto la solución de lavado como la solución fijadora se bombean hacia el corazón por gravedad, situando los decantadores con la solución lavadora y el líquido fijador a una altura de 1,10 m. Tras la fijación, se deja reposar el animal al menos una hora antes de proceder a la extracción del cerebro, para evitar que el tejido cerebral pueda sufrir retracción durante el proceso de la fijación. Después, se procede a la extracción cuidadosa del encéfalo y su tallado en dos porciones conteniendo las zonas de interés de nuestro estudio (la CPF y el hipocampo) utilizando un molde adecuado (Brain matrix rodent, #RBH-40000 Bioanalytical System, Inc., West Lafayette, Indiana, EE.UU.), que permite obtener planos de corte coronales de orientación similar en todos los animales. Se retiraron después las meninges a todos los bloques tallados y se crioprotegen por inmersión en sacarosa al 30% en PB 0,1 M pH 7,4, durante 72 h. a 4 °C en agitación constante.

Posteriormente, los bloques conteniendo las zonas rostrales seleccionadas fueron cortados con un micrótopo de congelación (#HM 400 de Microm, Heidelberg, Alemania) y las secciones coronales de 40 µm de grosor fueron recogidas en PB 0,1 M (pH 7,4) en series de 10 pocillos para realizar los diversos estudios propuestos. Un grupo de secciones fueron teñidas con Nissl para visualizar los límites citoarquitectónicos y para corroborar el grado de lesión o en su caso, en los animales falsos lesionados, que no hubiese un daño considerable provocado por la inyección del PBS.

6.2. Tinción de Nissl

La tinción de Nissl permite poner de manifiesto los núcleos de las células nerviosas, así como la sustancia tigróide de las neuronas. Estas dos estructuras se tiñen debido a su composición en ácidos ribonucleicos. Para ello, se emplean colorantes básicos de anilina, en nuestro caso el violeta de cresilo, que se depositan en los radicales ácidos de los ácidos nucleicos debido a fuerzas electropolares.

Todas las series de secciones cortadas contaron con un pocillo procesado para la tinción de Nissl según el procedimiento descrito en el ANEXO II.

6.3. Técnicas inmunohistoquímicas

Se ha utilizado la técnica inmunohistoquímica indirecta (Figura 10) que se fundamenta en la elevada especificidad y alta avidéz que presentan los anticuerpos frente a sus antígenos, permitiendo la visualización de determinadas moléculas en las células. Las moléculas que estudiado son: parvalbúmina (PV), calbindina (CaBP), cFos y proteína fibrilar ácida glial (GFAP). La PV y la CaBP son proteínas ligadoras de calcio, que permiten apreciar particularidades neuronales y también contribuir al estudio topográfico de las estructuras a estudiar; cFos es un marcador de activación neuronal a través de la transcripción de los genes de expresión inmediata y GFAP es una proteína que se expresa en las células gliales maduras, específicamente en los astrocitos.

De manera general, el procesado inmunohistoquímico de las secciones consistió en bloquear los posibles sitios de unión inespecífica de los anticuerpos, mediante incubación con suero bovino fetal (SBF; # SO113-1, Biochrom KG, Alemania) al 10% en TBS-Tx 0,05M a pH 7,6 durante una hora a temperatura ambiente y en ligera agitación. Después de este paso, se procede a la incubación con el anticuerpo primario diluido en TBS-Tx 0,05M a pH 7,6 con SBF al 10%. El tipo de anticuerpo, así como la dilución y el tiempo de incubación empleado para cada caso se muestran en la tabla 3. Seguidamente, las secciones fueron lavadas en TBS para después realizar una nueva incubación con anticuerpos secundarios biotinados (Tabla 3) específicos contra la inmunoglobulina (IgG) de la especie en la que se fabricó el primer anticuerpo. Transcurridas dos horas de incubación a temperatura ambiente, las secciones se lavaron y se pasaron a una solución que contiene el complejo avidina-biotina-peroxidasa (solución estándar de ABC, kit No. PK 4000; Vector Labs., Burlingame, CA, USA). Finalmente, la reacción antígeno-anticuerpo se visualizó, usando como cromógeno DAB sin níquel en el caso de la PV, CaBP y GFAP, y con sulfato de níquel en el caso del cFos.

En la tabla 3 se muestran los anticuerpos empleados y las soluciones de trabajo y los protocolos están detallados en el ANEXO II.

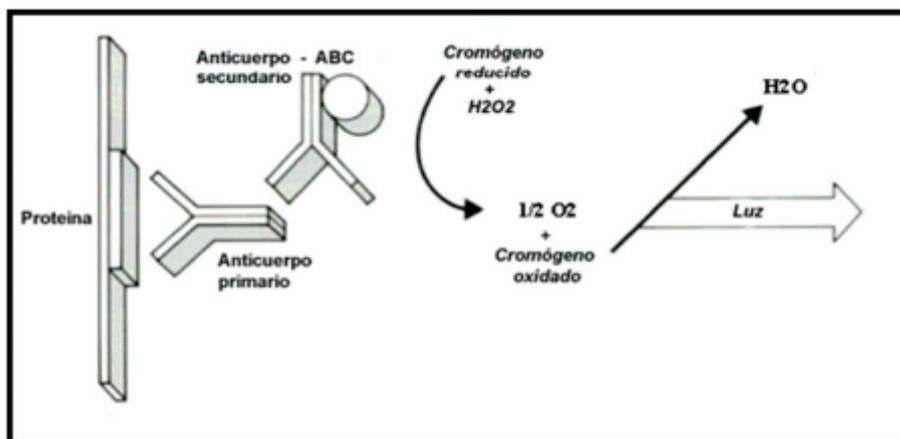


Figura 9. Método de inmunohistoquímica indirecta.

| Antígeno | Ac primario | Referencia | Dilución | Ac secundario | Referencia | Dilución | Color |
|------------|------------------------|-------------|----------|-------------------------------|--------------|----------|--------|
| GFAP | rabitt anti GFAP | #08-0063-Zy | 1/500 | Biotinylated goat anti-rabbit | #BA-1000 Vec | 1/200 | marrón |
| PV 28 | rabitt anti-PV 28 | PV-28-Sw | 1/5000 | | | | |
| CaBP D-28K | rabbit anti-CaBP D-28k | CB-38a-Sw | 1/10000 | | | | |
| cFOS | rabitt sc-52 | # SC52-StC | 1/2500 | | | | negro |

Tabla 3: Anticuerpos empleados y las soluciones de trabajo para los diferentes tipos de procesamiento. Dia- Diasorin, Stillwater, MN, USA; Incstar- Incstar Corp., Stillwater, MN, USA; StC- Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; Stern- Sternberger Monoclonals Inc., Baltimore, MD, USA; Sw- Swant, Bellinzona, Switzerland; Vec- Vector Laboratoires, Burlingame, CA, USA, Zy- Zymed Laboratories (San Francisco, CA, USA).

7. Analisis de las secciones histologicas

7.1. Medición del grosor

El grosor de la región prelímbica de la CPFM se midió en secciones teñidas con Nissl en los animales sacrificados a P100, empleando para ello el sistema StereoInvestigador (MicroBrightField, Inc, Colchester, VT, USA). Las mediciones se realizaron en tres niveles interaurales, $ia = 12,20$; $ia = 11,70$ e $ia = 11,20$, y dentro de ellos, en cada una de las tres regiones: dorsal, media y ventral. Los límites para cada región se establecieron de acuerdo con las coordenadas estipuladas por el Atlas Estereotáxico de Rata de Paxinos y Watson (Paxinos y Watson, 2005), (Figura 9). Usando una transparencia, se dibujó la imagen del atlas de Paxinos que se adaptó y se sobrepuso a nuestra imagen real, para así permitir la medición del grosor cortical con mayor precisión.

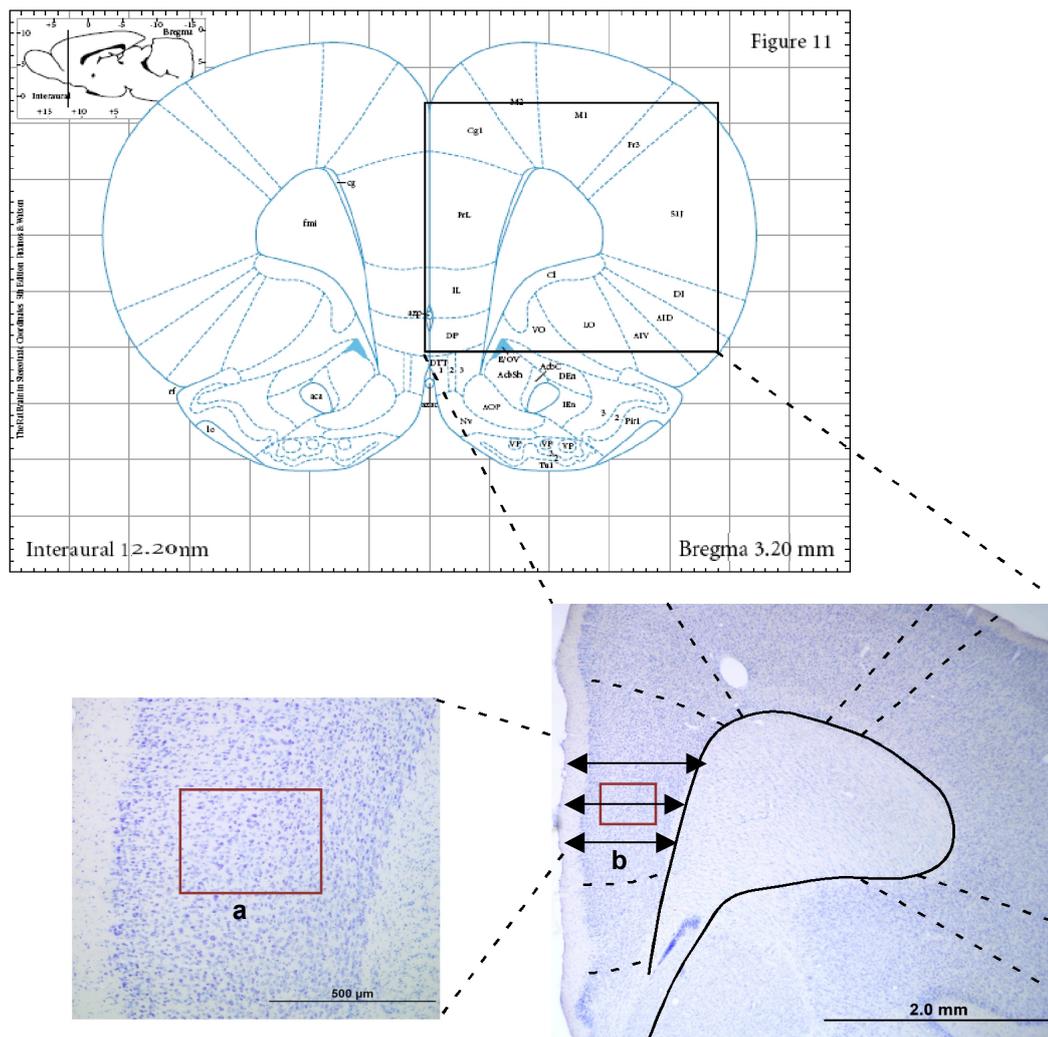


Figura 10: Esquema donde se muestra una de las regiones del área prelímbica de la CPFM que se utilizó para medir el grosor cortical y para hacer recuento celular. El diagrama del Atlas Paxinos muestra una sección en el nivel 12,20 mm interaural. El cuadro (a) (40 x 40 mm) ilustra la región prelímbica (PrL) de la CPFM. Las flechas (b) indican los tres niveles analizados para la estimación del grosor de la región PrL.

7.2. Recuento celular

Se realizó la cuantificación de células inmunoreactivas al antisuero contra Fos, GFAP, PV y CaBP 28Kd en la región prelímbica de la CPF. El recuento celular se llevó a cabo en 3 secciones de la corteza prelímbica (Figura 21), en los niveles interaurales (ia = 12,20; ia = 11,70; ia = 11,20). Se delimitó la corteza prelímbica con el objetivo 2,5 X,

utilizando un microscopio, Leica (modelo #DMRB). El área de recuento es un cuadrado de $4.000 \times 4.000 \mu\text{m}$ que se dibujó en una transparencia y se superpone a la imagen de estudio sobre la pantalla del ordenador. Para cada una de las preparaciones, se contaron el número de células positivas al marcador empleado, usando el objetivo 40 X y haciendo una marca sobre cada célula inmunotegida. Como célula inmunotegida se asumen todas aquellas que presentan una evidente coloración marrón, o negra, en función del marcaje utilizado, que se destaca inequívocamente del fondo.

8. Estudio de la expresión génica de los receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos.

De forma genérica, se estudió el perfil de expresión génica de receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos en relación a la lesión y a la administración crónica de RISP (2mg/Kg/día) y más concretamente, se planteó cuantificar receptores dopaminérgicos D_2 y serotoninérgicos $5HT_{2A}$, mediante técnica de RT-PCR cuantitativa en hipocampo y CPF.

Para ello, al finalizar el estudio conductual (después de 65 días de tratamiento), se extrajeron el hipocampo y la CPF de 3 animales de cada grupo, seleccionados al azar, trase una breve anestesia con CO_2 , congelándolos en nitrógeno líquido a -80°C para determinar la expresión génica mediante técnica de RT-PCR y qPCRs de los receptores dopaminérgicos (D_2) y serotoninérgicos ($5-HT_2A$).

8.1. Extracción y purificación del RNA

Para la extracción de RNA total de tejido se empleó una modificación del método de Chomczynski y Sacchi (1987), usando el reactivo Trizol™ (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA). Para ello, se utilizó 1 ml de Trizol por cada 100 mg de tejido, y se procedió a la homogeneización del mismo mediante un homogeneizador Brinkmann Polytron. Tras incubar el preparado durante 5 min a temperatura ambiente, se realizó una extracción selectiva del RNA por separación de fases mediante la adición de 200 µl de cloroformo por cada ml de Trizol y centrifugación a 12000 g durante 15 min a 4 °C. El RNA obtenido en la fase acuosa superior se precipitó con un volumen de isopropanol igual a la mitad del Trizol utilizado en el primer paso, se centrifugó a 12000 g durante 10 min a 4 °C y, finalmente, después de eliminar el sobrenadante y secar el RNA, se resuspendió en agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato 0.1%, Sigma), incubando a 60 °C durante 10 min para favorecer la disolución del mismo. Posteriormente, se cuantificó y determinó la calidad del RNA purificado para comprobar que el RNA extraído no había degradado, mediante el análisis de una alícuota de cada muestra del RNA purificado en un RNA 6000 NanoLabChip utilizando un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA). La visualización clara de los picos de rRNA 18S y 28S, significa que los RNAs extraídos tienen una buena calidad.

8.2. RT-PCR

Las RT-PCRs se llevaron a cabo en dos pasos; un primer paso consistente en la retrotranscripción de los RNA mensajeros (síntesis de cDNA), seguido de una amplificación selectiva mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En la síntesis de cDNA se utilizó el kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega Corporation, Madison, WI, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Inicialmente se desnaturalizó una mezcla de 1 µg de RNA total y 0.5 µg del oligo-dT a 70 °C durante 5 min, tras lo cual se enfrió en hielo. Esta reacción se añadió a una mezcla preparada previamente que contiene 1µl de transcriptasa inversa ImProm-II™, 4 µl de buffer 5 X ImProm-II™, MgCl₂ 1.5-8.0 mM, una mezcla de desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTPs) 0.5 mM, 20 U del inhibidor de ribonucleasas Recombinant RNasin® y agua libre de RNasas (H₂O tratada con DEPC) hasta un volumen final de 15µl. La reacción se sometió durante 5 min a 25 °C, lo que permitió que el cebador anille con el RNA molde. Posteriormente se incubó a 42 °C durante 1 hora, para que la transcriptasa sintetice el cDNA. Finalmente la transcriptasa inversa se inactivó incubando las mezclas de reacción a 70 °C durante 15 min.

Para comprobar que la síntesis de cDNA se realizó con éxito, se llevó a cabo una amplificación por PCR de tres fragmentos de cDNA correspondientes a tres genes "housekeeping", los cuales se expresan constitutivamente y a niveles de expresión aproximadamente iguales en todos los tejidos.

- β -actina de rata (GenBank, N° NM_031144)
- Una enzima de la glicolisis (gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa-GADPH)
- Gen de la proteína ribosómica L19 (RPL19).

Seguidamente, se realizaron distintas PCRs con el Kit PCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se añadieron al tubo de reacción una mezcla de reacción (Tris-HCl 22 mM, pH 8.4, KCl 55 mM, MgCl₂ 1.65 mM, dNTPs 220 μ M y 22 U de Taq DNA polimerasa), 100 ng de DNA y 0.2 μ g de cada uno de los cebadores específico (Tabla 4) de cada reacción. Para descartar la posibilidad de amplificar fragmentos de PCR resultantes de DNA genómico residual, la pareja de oligonucleótidos-cebadores fueron diseñados en dos exones distintos. Por tanto, el producto de amplificación, en el caso de amplificar el DNA genómico, sería de mayor tamaño que el correspondiente a únicamente la amplificación del transcrito (cDNA), al incluirse al menos un intrón. El volumen final de reacción fue de 25 μ l y siempre se realizó una reacción sin DNA molde como control negativo. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer (Geneamp[®] PCR system 9700). El programa de amplificación de las PCRs consistió en un primer paso de desnaturalización inicial (1 ciclo a 95 °C durante 5 minutos), seguido de una desnaturalización a 95 °C durante 30 segundos, y un anillamiento a 55-60 °C dependiendo de la pareja de cebadores a utilizar (ver detalles en

Materiales y métodos

la Tabla X) durante 30 segundos. Por último, se realizó una extensión a 72 °C durante 45 segundos (estas tres etapas se repitieron durante 45 ciclos). Finalmente, se llevó a cabo un único ciclo de extensión final durante 10 minutos a 72 °C. El número de ciclos utilizados en las PCRs nos aseguró la obtención de los productos de PCR en fases lineal de amplificación para poder realizar estudios semi cuantitativos de niveles de expresión génica.

A continuación, los productos de la PCR se corrieron en electroforesis, en geles de agarosa al 2,5 % con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) embebidos en TBE 1 X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA, pH 8,0). Paralelamente, en los geles se incluyó un marcador de peso molecular, que consistió en DNA del fago X-174 digerido con la endonucleasa HaeIII y que generó fragmentos de tamaño: 1,35; 1,08; 0,87; 0,63; 0,31; 0,28; 0,27; 0,23; 0,19; 0,12; y 0,07 kb. El patrón de migración de fragmentos se registro con una cámara digital (Bio-Rad) bajo iluminación ultravioleta, usando el programa Bio-Rad.

| | Número del Gene bank | Cebador 1 (For) | Posición del cebador 1 en el cDNA | Cebador 2 (Rev) | Posición del cebador 2 en el cDNA | Tamaño del producto de PCR (pb) | Tª de anillamiento (°C) |
|--------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| 5-HT _{2A} | NM_017254 | AACGGT CCATCC ACAGAG | 946-964 | AACAGG AAGAAC ACGATGC | 1036-1054 | 109 | 60 |
| D ₂ | NM_012547 | AGACGA TGAGCC GCAGAAAG | 1416-1435 | GCAGCCA GCAGATG ATGAAC | 1492-1511 | 96 | 60 |

Tabla 4: Localización en el GenBank de los cebadores, la secuencia de los cebadores, así como su localización en el cDNA. En las últimas columnas, se muestra el tamaño del transcrito obtenido y la temperatura de anillamiento de los cebadores.

8.3. PCR Cuantitativa (qPCR)

Realizamos PCR cuantitativas en tiempo real (qPCR) utilizando la sonda inespecífica SYBR Green I para cuantificar mediante el método de cuantificación relativa de las Ct (“ciclo umbral”) el grado de expresión de los dos genes a estudio, D2 y 5HT2A, respecto al gen endógeno GADPH.

El método de cuantificación que empleamos se basa en la detección continua del producto de PCR mediante el fluoróforo SYBR Green I. Esta molécula se intercala en el surco menor de la doble hélice del DNA y emite fluorescencia en el espectro UV con pico máximo a 520 nm. Por tanto, en cada ciclo de la PCR, la fluorescencia será muy baja o nula durante la etapa de desnaturalización y aumenta gradualmente durante la etapa de extensión. El termociclador, provisto de un láser y detectores de fluorescencia (fluorímetro), recoge la señal al final de cada ciclo, permitiendo un seguimiento del proceso en tiempo real. A medida que pasan los ciclos, el producto de PCR, y por tanto la señal detectada, aumentan de forma exponencial, hasta que los reactivos comienzan a agotarse o se produce inhibición por producto final. En los experimentos de qPCR en el que se emplea una sonda inespecífica como el fluoróforo SYBR Green I, al final de la PCR como tal se realiza un análisis de curva de desnaturalización de los productos de PCR obtenidos para establecer la especificidad de tales productos. Para ello, partiendo de una temperatura a la que todos los posibles productos de PCR generados están renaturalizados, es decir, en forma de doble cadena, se incrementa dicha t^a de forma paulatina y la fluorescencia del conjunto de la muestra se mantiene constante hasta que se alcanza la T_m (t^a de

Materiales y métodos

desnaturalización a la cual el 50% de un mismo tipo de DNA se desnaturaliza) de algún producto de PCR, momento en que la fluorescencia se reduce drásticamente.

La aplicación del método de cuantificación relativa basado en el análisis de los datos de Ct, el cual determina el ciclo inicial de amplificación y es inversamente proporcional al nº de copias inicial del molde, en contraprestación al método de la curva estándar, se fundamenta en el hecho de que las Eficiencias (E) y/o pendientes (b) de las rectas patrón [rectas de regresión, ($Y = a * X + b$)] de cada gen objeto de estudio (D_2 o $5HT_{2A}$) y el gen endógeno (GADPH) eran estadísticamente significativas iguales.

Desde el punto de vista práctico, las Eficiencias (E) se calcularon al realizar qPCRs con al menos tres cantidades diferentes de producto de diluciones seriadas de DNA diana para una misma pareja de cebadores, esto es, realización de una recta patrón

$$E = [10^{(-1/b)} - 1] * 100$$

Por su parte, el método de las Ct consistió en normalizar las Ct del gen objeto de estudio ("target") y del gen endógeno ("housekeeping") para cada condición a estudiar del siguiente modo:

$$\begin{aligned}\Delta Ct \text{ "condición 1"} &= Ct \text{ "target"} - Ct \text{ "housekeeping"} \\ \Delta Ct \text{ "condición 2"} &= Ct \text{ "target"} - Ct \text{ "housekeeping"} \\ \Delta Ct \text{ "condición 3"} &= Ct \text{ "target"} - Ct \text{ "housekeeping"} \\ &\dots \\ &\dots \\ \Delta Ct \text{ "condición N"} &= Ct \text{ "target"} - Ct \text{ "housekeeping"}\end{aligned}$$

Seguidamente, para establecer la cuantificación relativa de una determinada condición respecto a otra, se aplicó una segunda normalización con la siguiente fórmula:

$$\begin{aligned}\Delta\Delta\text{Ct} \text{ "condición 1"} &= \Delta\text{Ct} \text{ "condición 1"} - \Delta\text{Ct} \text{ "condición 1"} \\ \Delta\Delta\text{Ct} \text{ "condición 2"} &= \Delta\text{Ct} \text{ "condición 2"} - \Delta\text{Ct} \text{ "condición 1"} \\ \Delta\Delta\text{Ct} \text{ "condición 3"} &= \Delta\text{Ct} \text{ "condición 3"} - \Delta\text{Ct} \text{ "condición 1"} \\ &\dots \\ \Delta\Delta\text{Ct} \text{ "condición N"} &= \Delta\text{Ct} \text{ "condición N"} - \Delta\text{Ct} \text{ "condición 1"}\end{aligned}$$

El incremento o aumento de la cantidad de DNA diana de la "condición N" respecto a la "condición 1" (control) vendrá finalmente definido por R.

$$\begin{aligned}R_{\text{"condición 1"}} &= E^{-\Delta\Delta\text{Ct} \text{ "condición 1"}} = E^0 ; & R_{\text{"condición 1"}} &= 1 \\ R_{\text{"condición 2"}} &= E^{-\Delta\Delta\text{Ct} \text{ "condición 2"}}, & -\infty < R_{\text{"condición 2"}} < +\infty\end{aligned}$$

9. Estudio bioquímico

9.1. Obtención del material biológico

Como ya se indicó anteriormente, además del encéfalo, también se obtuvieron muestras de sangre y de tejido adiposo de las ratas.

Las muestras de sangre obtenidas por punción cardiaca fueron repartidas en tubos con y sin EDTA (EUROTUBO K3-EDTA, España) para la obtención de plasma y de suero, tras la centrifugación a 3500 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Las muestras de plasma fueron utilizadas para

las determinaciones de los niveles de la RISP y su metabolito activo, el 9-OH-RISP. Las otras muestras de suero fueron congeladas a - 80 °C hasta su uso en análisis que no forman parte de esta tesis.

Las muestras de tejido adiposo fueron obtenidas de los panículos intra-abdominales (perirrenal, omental y epididimario) para el estudio del efecto de la RISP en este modelo experimental de esquizofrenia sobre la lipólisis.

9.2. Niveles de la risperidona en el plasma

Las mediciones de los niveles de RISP y su metabolito se realizaron por cromatografía líquida / tándem espectrometría de masas (LC MS/MS), según la metodología descrita por Zhang y cols. (2007). A cada muestra de 250 µl del plasma, se le añadió 25 µl del estándar interno (40 ng/ml midazolam) y 0,2 ml de 0,5 M de Na₂HPO₄ (pH=10,7). Las muestras fueron brevemente mezcladas y extraídas en 3 ml de éter isopropílico durante 10 min. Después de la centrifugación a 2000 X g por 10 min., la capa orgánica superior fue evaporada por sequedad. Al residuo se le añadió 100 µl de metanol: 20 mM del formato de amonio (pH=3.9) (70:30), después la mezcla se sónico, se agitó y se centrifugó a 16 000 g por 10 min., finalmente, 15 µl de la fase acuosa fueron inyectados en el equipo LC MS/MS.

9.3. Actividad lipolítica

Obtención de adipocitos aislados: Se sacrifica al animal, no ayunado, a primera hora de la mañana y se extrae el tejido adiposo blanco, que es obtenido de los panículos intraabdominales (perirrenal, omental y epididimario). La grasa obtenida se trocea en pequeños fragmentos y se deposita en frascos con buffer Krebs Ringer Bicarbonato-albúmina (KRBA). Los adipocitos son aislados por digestión enzimática de la trama proteica, tras 30-45 min de agitación en baño a 37 °C. en presencia de colagenasa. Para separar las células adiposas del estroma conectivo se filtra a través de una malla de nylon. Los adipocitos filtrados quedarán en la superficie y, para eliminar la colagenasa, las células se lavan con 15 mL del KRBA a 37 °C, repitiendo este paso 3 veces. Tras cada lavado se agita suavemente, y se deja el tubo durante unos 3-5 min en el baño hasta que se estabilizan ambas fases; luego, se desecha la fase inferior por aspiración. Finalmente, una pequeña muestra de los adipocitos obtenidos se coloca sobre un portaobjetos, y se observa al microscopio su integridad y tamaño, fotografiaron con una cámara digital (Olympus DP70, midiéndose posteriormente con el programa SCION IMAGE (NIH).

Determinación de actividad lipolítica: La lipólisis se analiza tomando como criterio la cantidad de glicerol liberado en el medio por los adipocitos en el curso de la incubación con los fármacos a ensayar, en una proporción fármaco-suspensión de adipocitos de 1:100. Esta liberación de glicerol al medio extracelular refleja fielmente la intensidad

de la lipólisis. La incubación se realiza por espacio de 90 minutos, período durante el cual la lipólisis es una función lineal del tiempo.

Para determinar el glicerol liberado se añade a las muestras un tampón de hidracina durante 40 min, midiendo a continuación la absorbancia de las muestras, en un espectrofotómetro con luz UV (Beckman DU-40) a una longitud de onda de 340 nm.

Los resultados se expresan en μ moles de glicerol liberados en el medio/100 mg de lípidos celulares/ 90 min, después de determinar los lípidos totales de los adipocitos.

10. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa SPSS (versión 15.0 para Windows; SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA). La descripción de los datos se efectuó mediante media \pm error estándar de la media (EEM) tanto para variables continuas como para frecuencias absolutas y relativas de variables categóricas.

Los resultados se compararon entre los diferentes grupos haciendo uso del módulo ANOVA, y en los casos apropiados, se realizaron comparaciones múltiples post-hoc y el test t de Student.

En los estudios longitudinales, los resultados se compararon entre los diferentes grupos haciendo uso del test de ANOVA mixto split-plot, con comparaciones por pares Sheffe (análisis inter-sujetos) y Bonferoni (análisis intra-sujetos). El nivel de significación estadística aceptado fue $p \leq 0,05$.

IV - RESULTADOS

1. Resultados del estudio comportamental

1.1. Inhibición del reflejo auditivo de sobresalto por un estímulo previo

Hemos estudiado la IEP en los diferentes grupos del estudio a las 8, 10 y 12 semanas de edad, tal y como se observa en la figura 11. Las comparaciones entre los grupos animales sin tratamiento no mostraron ninguna diferencia significativa entre los animales lesionados y falsos lesionados, en ninguna de los tres periodos en que se hicieron las pruebas. Las comparaciones entre estos grupos con los grupos correspondientes tratados con la RISP, tampoco mostraron diferencias significativas en ninguno de estos tres periodos. Sin embargo, aunque las diferencias no son significativas, se observó que el tratamiento con la RISP tendió a aumentar los valores de la IEP tanto en los animales lesionados como falsos lesionados. El estudio longitudinal de la variación de IEP, tampoco indicó variaciones significativas de este parámetro a lo largo de los tres periodos en los que se midió la IEP. Sin embargo, aunque estas diferencias no son significativas, la IEP de todos los animales, con y sin tratamiento, mostró una tendencia a aumentar en la décima semana de edad de los animales (DP 70), en comparación con la octava semana (DP 56), y a reducir en la duodécima semana. Estas tendencias de variación de la IEP se observaron en todos los animales lesionados y falsos lesionados, con y sin tratamiento.

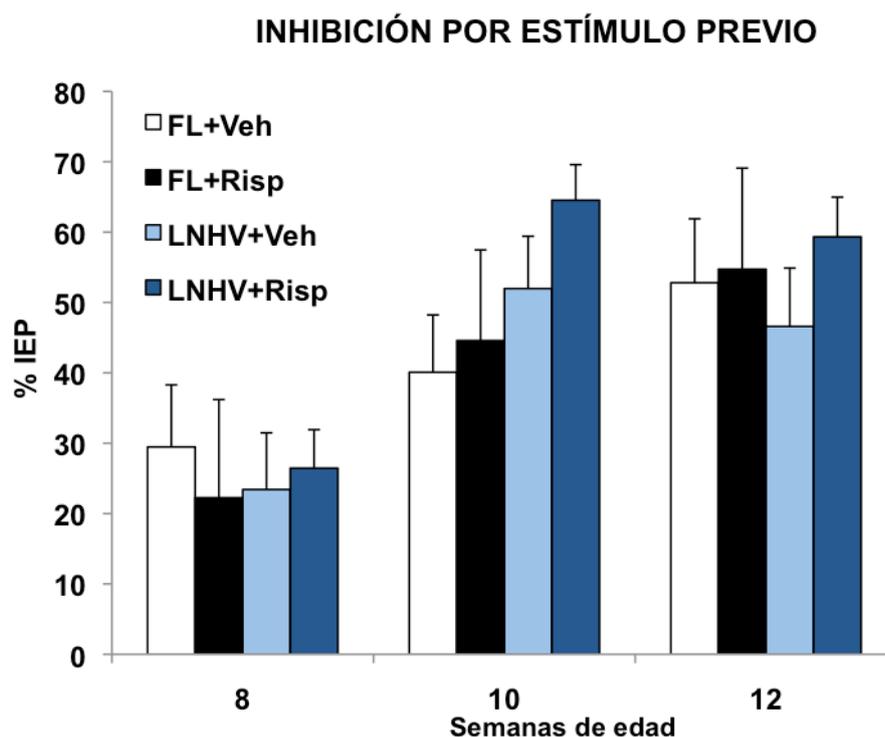


Figura 12. Valor medio del porcentaje de IEP (\pm ESM) de cada uno de los grupos experimentales, falsas lesionadas (FL) y lesionadas (LNHV), en presencia y ausencia de Risperidona (Risp: 2mg/kg/día), a las 8, 10 y 12 semanas de edad. Las comparaciones entre los grupos experimentales a la misma edad no indicaron ninguna diferencia significativa.

1.2. Campo abierto

Como se indicó anteriormente, para evaluar el efecto de la RISP sobre los posibles cambios conductuales inducidos por la LNHV ante un ambiente novedoso, fueron evaluados cinco parámetros en esta prueba: la actividad locomotora y exploratoria, con sus dos variantes, la actividad horizontal y vertical, las actividades de aseo y movimientos orofaciales (grooming) y el número de defecaciones.

1.2.1. Actividad horizontal

La actividad horizontal se evaluó midiendo la actividad exploratoria total de los animales, suma de la actividad exploratoria externa (en las zonas periféricas del campo abierto) y la actividad exploratoria interna (en las zonas céntricas del aparato). Después, se desglosaron los resultados de cada uno de estos parámetros para saber cuál de los dos fue más afectado por la lesión y cómo ha reaccionado frente al tratamiento con la RISP. Por último, se calculó también el cociente de la exploración interna/exploración total, como parámetro indicador del grado de ansiedad de los animales.

Actividad exploratoria total

La comparación entre los grupos animales no sometidos al tratamiento con la RISP indicó que los animales lesionados mostraron una actividad exploratoria total significativamente mayor en comparación con los animales falsos lesionados ($40,30 \pm 6,48$ vs. $25,63 \pm 7,24$; $p= 0,03$) (Figura 12). Sin embargo, las comparaciones de estos grupos animales con los grupos correspondientes tratados con la RISP, no mostraron ningún efecto significativo del fármaco ni en los animales lesionados ni en los falsos lesionados. Estas diferencias, aunque carecen de significación estadística, muestran que la RISP aumenta la actividad exploratoria total de los animales lesionados ($40,30 \pm 6,48$ vs. $48,22 \pm 6,83$), y reduce la de los animales falsos lesionados ($25,63 \pm 7,24$ vs. $18 \pm 7,74$).

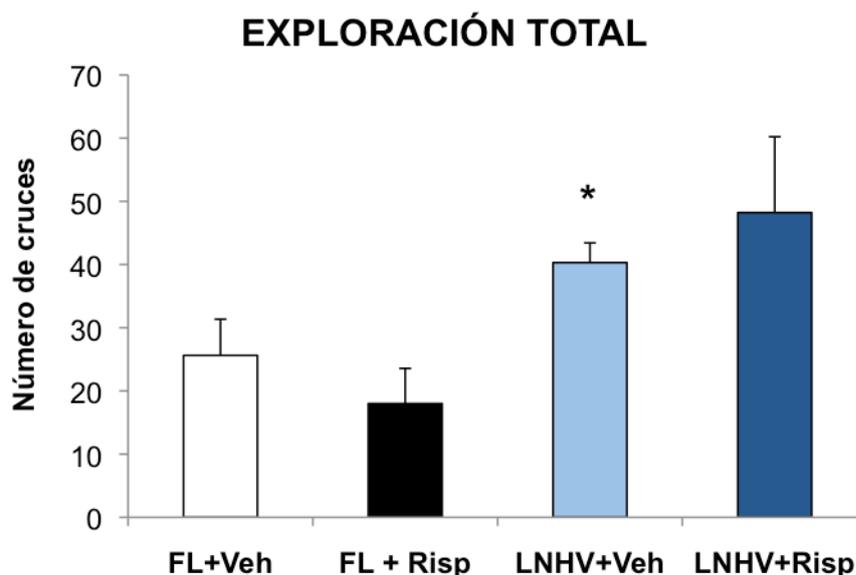


Figura 13. Prueba de campo abierto, Actividad exploratoria total media (\pm ESM) realizada por cada uno de los grupos experimentales, falsas lesionadas (FL) y lesionadas (LNHV), en presencia y ausencia de Risperidona (Risp: 2mg/kg/día). * indica una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre los animales sin tratamiento, falsos lesionados (FL+Veh) y los lesionados (LNHV+Veh).

Actividad exploratoria horizontal externa e interna

Los animales sin tratamiento mostraron actividades exploratorias externas e internas, con un perfil de respuesta comparable a lo que se observó en la actividad exploratoria total, siendo los animales lesionados los que mostraron siempre una actividad exploratoria mayor que la de los animales falsos lesionados, no alcanzando significación estadística la diferencia en el caso de la actividad exploratoria interna ($37,80 \pm 6,51$ vs. $23,63 \pm 7,28$; [$p = 0,01$] y $2,5 \pm 1,51$ vs. $2 \pm 1,69$, respectivamente en el caso de la actividad exploratoria externa y interna de los animales lesionados vs. falsos lesionados sin tratamiento) (Figuras 13 y 14).

Los animales tratados con RISP mostraron también un perfil de respuesta similar a lo observado en la actividad exploratoria total, salvo el caso de los animales lesionados en que se observó que la RISP redujo

también la actividad exploratoria interna, además de la exploración externa ($37,80 \pm 6,51$ vs. $46,89 \pm 6,86$; $23,63 \pm 7,28$ vs. $17 \pm 7,78$ y $2,5 \pm 1,51$ vs. $1,33 \pm 1,59$ vs.; $2 \pm 1,69$ vs. $1 \pm 1,81$, respectivamente en el caso de la exploración externa e interna de los animales lesionados vs. falsos lesionados, sin y con tratamiento).

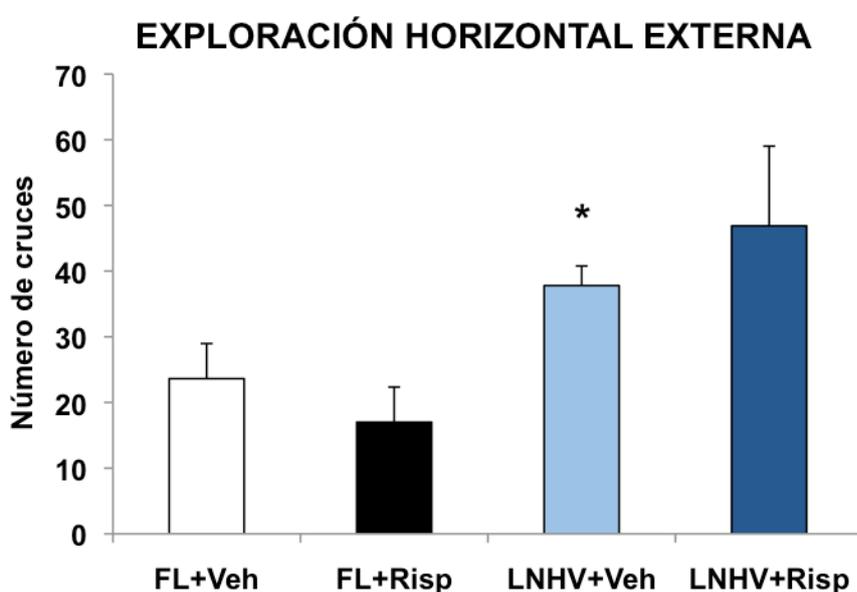


Figura 14. Prueba de campo abierto. Actividad exploratoria externa (media \pm ESM) realizada por cada uno de los grupos experimentales, falsas lesionadas (FL) y lesionadas (LNHV), en presencia y ausencia de Risperidona (Risp: 2mg/kg/día). * indica una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre los animales sin tratamiento, falsos lesionados (FL+Veh) y los lesionados (LNHV+Veh).

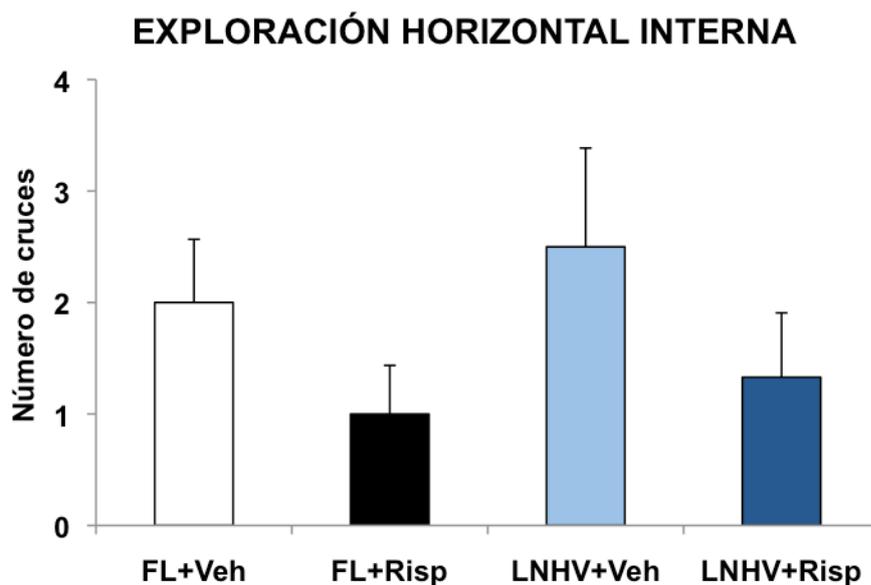


Figura 15. Prueba de campo abierto. Actividad exploratoria interna (media \pm ESM) realizada por cada uno de los grupos experimentales, falsas lesionadas (FL) y lesionadas (LNHV), en presencia y ausencia de Risperidona (Risp: 2mg/kg/día). Las comparaciones entre los grupos experimentales no muestran diferencias significativas.

Cociente de exploración interna/exploración total

Las comparaciones entre los grupos no indicaron diferencias significativas entre los animales lesionados y falsos lesionados con o sin tratamiento (Figura 15). Sin embargo, aunque las diferencias no son significativas, los animales lesionados muestran valores ligeramente menores que los obtenidos en los falsos lesionados ($6,05 \pm 2,46$ vs. $9,73 \pm 3,05$). Las comparaciones de las respuestas de estos dos grupos, con los correspondientes grupos tratados con la RISP, tampoco mostraron diferencias significativas. Sin embargo, aunque estas diferencias no han sido significativas, se observó que los animales respondieron también de manera opuesta al tratamiento con la RISP, como lo observado en la exploración total y la exploración externa. Los valores del cociente de la

actividad exploratoria interna/total se redujeron en el caso de los animales falsos lesionados ($9,73 \pm 3,05$ vs. $5,96 \pm 2,48$) y aumentaron en el caso de los animales lesionados ($6,05 \pm 2,46$ vs. $7,07 \pm 4,08$).

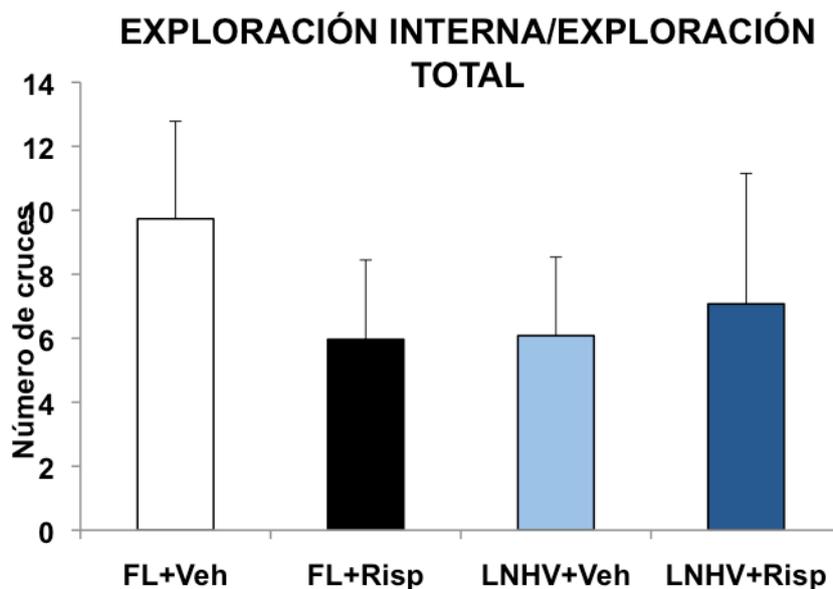


Figura 16. Prueba de campo abierto. Cociente de las exploraciones interna/total (media \pm ESM) realizada por cada uno de los grupos experimentales, falsas lesionadas (FL) y lesionadas (LNHV), en presencia y ausencia de Risperidona (Risp: 2mg/kg/día). Las comparaciones entre los grupos experimentales no muestran diferencias significativas

1.2.2. Exploración vertical (*Rearing*)

La cuantificación de la exploración vertical (*rearings*) en los grupos de animales no sometidos al tratamiento con la RISP no mostró una diferencia significativa entre los animales falsos lesionados y lesionados. Sin embargo, los animales lesionados presentan menor actividad vertical que los falsos lesionados ($4,5 \pm 1,38$ vs. $7,75 \pm 1,54$). Las comparaciones entre estos grupos animales con los correspondientes

grupos tratados, mostraron que la RISP aumentó significativamente el número de *rearings* en el caso de los animales lesionados ($9,22 \pm 1,45$ vs. $4,5 \pm 1,38$, $p = 0,01$), mientras que no afectó significativamente este número en el caso de los animales falsos lesionados, aunque tendió a aumentarlo ligeramente ($9 \pm 1,65$ vs $7,75 \pm 1,54$).

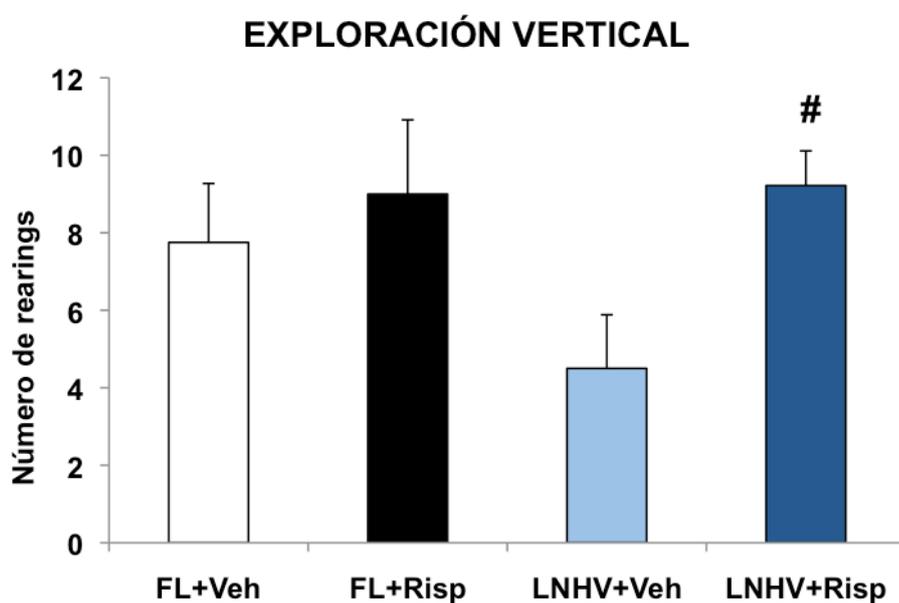


Figura 17. Prueba de campo abierto. Exploraciones verticales (media \pm ESM) realizadas por cada uno de los grupos experimentales, falsas lesionadas (FL) y lesionadas (LNHV), en presencia y ausencia de Risperidona (Risp: 2mg/kg/día). # indica diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los animales sin tratamiento, falsos lesionados (FL+Veh) y lesionados (LNHV+Veh).

1.2.3. Actividades de aseo y movimientos orofaciales (*grooming*)

Los animales lesionados presentaron un número de *groomings* significativamente menor que los falsos lesionados ($0,1 \pm 0,37$ vs. $1,5 \pm 0,42$, $p= 0,03$). Las comparaciones de estos grupos animales con los correspondientes grupos tratados con la RISP mostraron un aumento significativo del número de *groomings* de los animales lesionados, mientras que los animales falsos lesionados no mostraron cambios importantes [respectivamente, $0,78 \pm 0,39$ vs. $0,1 \pm 0,37$, ($p=0,02$); $1,43 \pm 0,44$ vs. $1,5 \pm 0,42$].

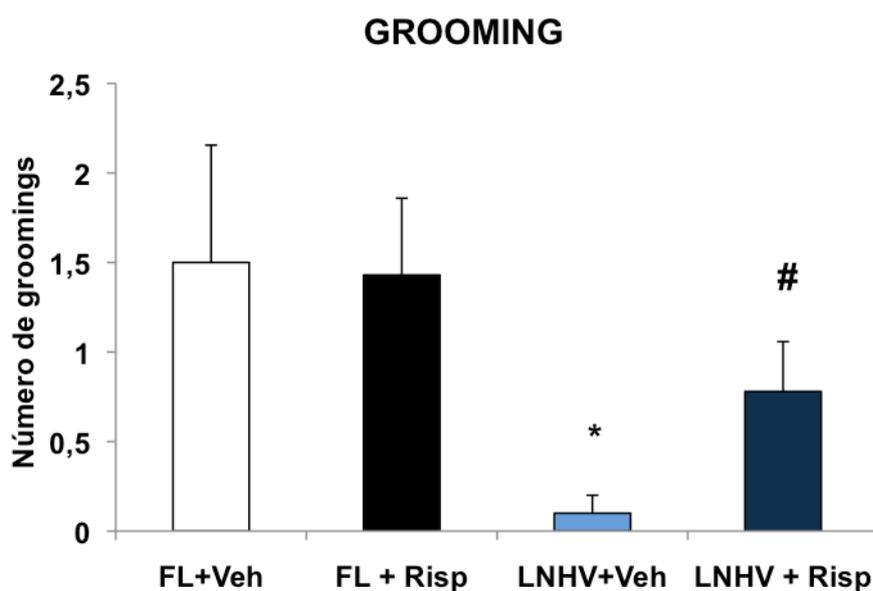


Figura 18. Prueba de campo abierto. Número de groomings realizados (media ± ESM) por cada uno de los grupos experimentales. falsas lesionadas (FL) y lesionadas (LNHV), en presencia y ausencia de Risperidona (Risp: 2mg/kg/día). * y # indican respectivamente las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre los animales sin tratamiento, falsos lesionados (FL+Veh) y lesionados (LNHV+Veh), y los animales lesionados tratados con RISP (LNHV+RISP) vs. los no tratados (LNHV+Veh).

1.3. Evitación activa

En la prueba de condicionamiento de evitación activa hemos valorado la respuesta de evitación y el número de cruces entre compartimentos, para evaluar el aprendizaje y la memoria de los animales. También hemos analizado el freezing y la defecación, como control del nivel de ansiedad de los animales. En nuestros experimentos, hemos adoptado como criterio de condicionamiento cuando son capaces de evitar el choque eléctrico por lo menos en 70% de las veces y durante dos sesiones consecutivas.

1.3.1. Respuestas de evitación

Uno de los resultados más destacables de esta prueba es sin lugar a duda las respuestas de evitación de los grupos animales sin tratamiento con RISP. Los animales falsos lesionados superaron el requisito pre-establecido en esta prueba, realizando respuestas de evitación correctas superiores al 70 % en tres sesiones consecutivas, mientras que los animales lesionados no llegaron a cumplir esta condición en ninguna de las sesiones de la prueba (Figura 18 A).

Los animales falsos lesionados mostraron una mayor capacidad de evitar estímulos adversos condicionados, en comparación con los animales lesionados, con respuestas de evitación significativamente mayores ($p \leq 0,01$) en casi todas las sesiones de la prueba, salvo la segunda. Los animales falsos lesionados lograron evitar el estímulo aversivo, a partir de la séptima sesión, mientras que los animales

lesionados no lo aprendieron, llegando apenas a alcanzar una respuesta máxima del 15,79 % en la décima y última sesión de la prueba.

La comparación de las respuestas obtenidas en esta prueba entre los grupos con o sin tratamiento con RISP, no mostraron ninguna diferencia significativa ni en los animales falsos lesionados ni los lesionados (Figura 18 B). Sin embargo, aunque las diferencias no son significativas, pueden destacarse algunas tendencias, ya que los animales falsos lesionados tratados con RISP muestran respuestas ligeramente menores que las obtenidas en los animales falsos lesionados sin tratamiento, a partir de la quinta sesión de la prueba. Esta tendencia se invirtió en el caso de los animales lesionados, exhibiendo respuestas mayores los animales tratados con RISP en comparación con los animales sin tratamiento a partir de la cuarta sesión de la prueba.

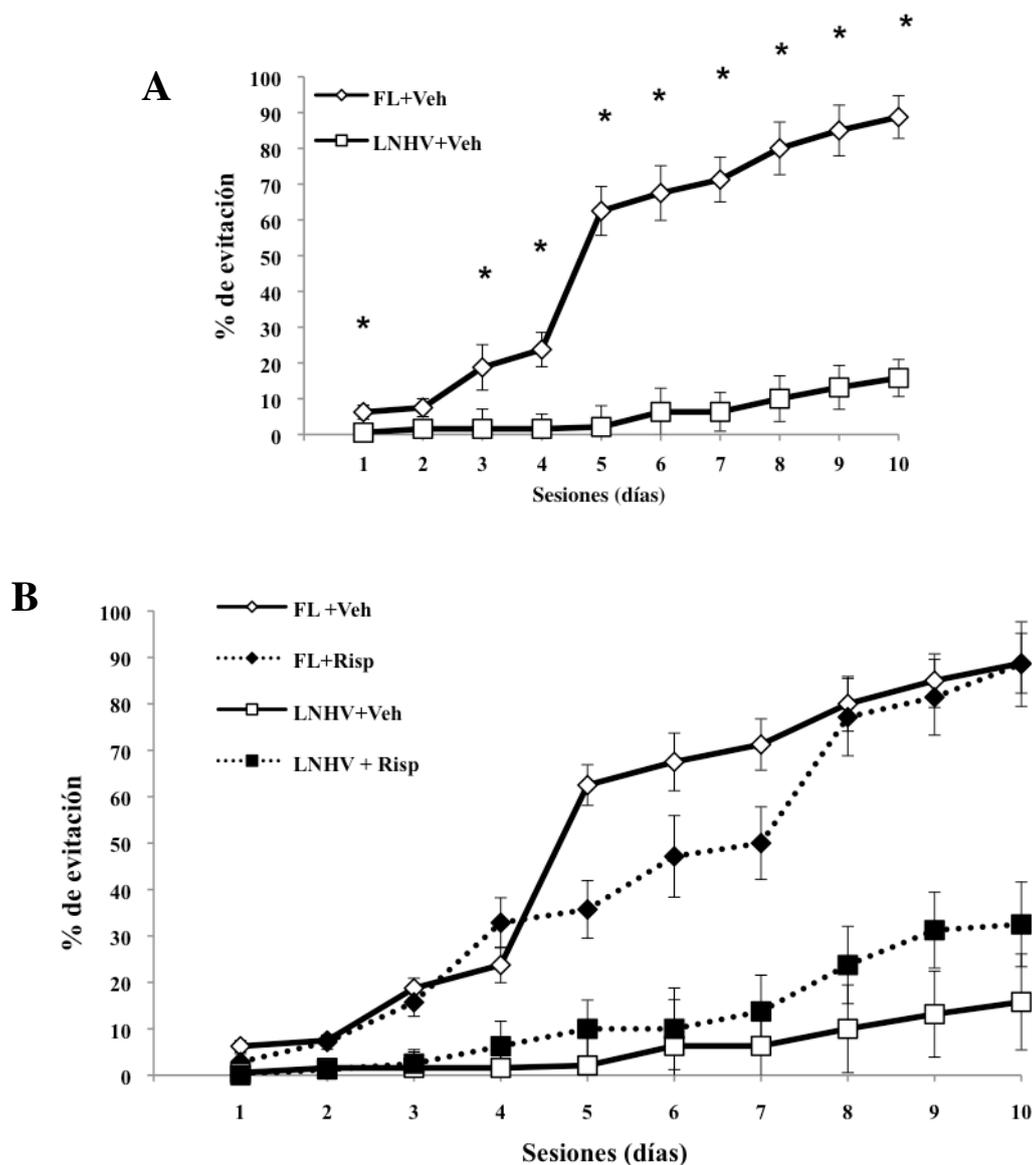


Figura 19. Evitación Activa. Respuestas de evitación realizadas por cada uno de los grupos experimentales durante las 10 sesiones de la prueba. (A) Efecto de la lesión neonatal del hipocampo ventral en los animales sin tratamiento (FL+Veh vs. LNHV+Veh). (B) Efecto de la RISP (2 mg/kg/día) en los animales falsos lesionados (FL+RISP vs. FL+Veh) y los lesionados (LNHV+RISP vs. LNHV+Veh). * indica las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) que se obtuvieron entre los animales FL+Veh y LNHV+Veh. No se obtuvo ninguna diferencia significativa en el efecto de la RISP ni en los animales falsos lesionados (FL+RISP vs. FL+Veh), ni en los lesionados (LNHV+RISP vs. LNHV+Veh).

1.3.2. Cruces realizados durante los intervalos entre ensayos

Los resultados de los cruces realizados durante los intervalos entre ensayos (IEE) mostraron perfiles de respuestas semejantes a los que se obtuvieron en las respuestas de evitación.

Los animales sin tratamiento mostraron números de cruces IEE mayores en el caso de los animales falsos lesionados, en comparación con los animales lesionados; las diferencias siendo significativas a partir de la cuarta sesión de la prueba (Fig. 19 A).

De la misma manera, como lo que se observó en las respuestas de evitación de los animales frente al tratamiento con RISP, ninguna diferencia significativa se obtuvo entre los grupos animales sin tratamiento con sus homólogos tratados con RISP (Fig. 19 B). La única excepción fue la obtenida en la novena sesión, donde los animales falsos lesionados tratados con RISP mostraron un número de cruces IEE ligeramente mayor en comparación con los animales sin tratamiento.

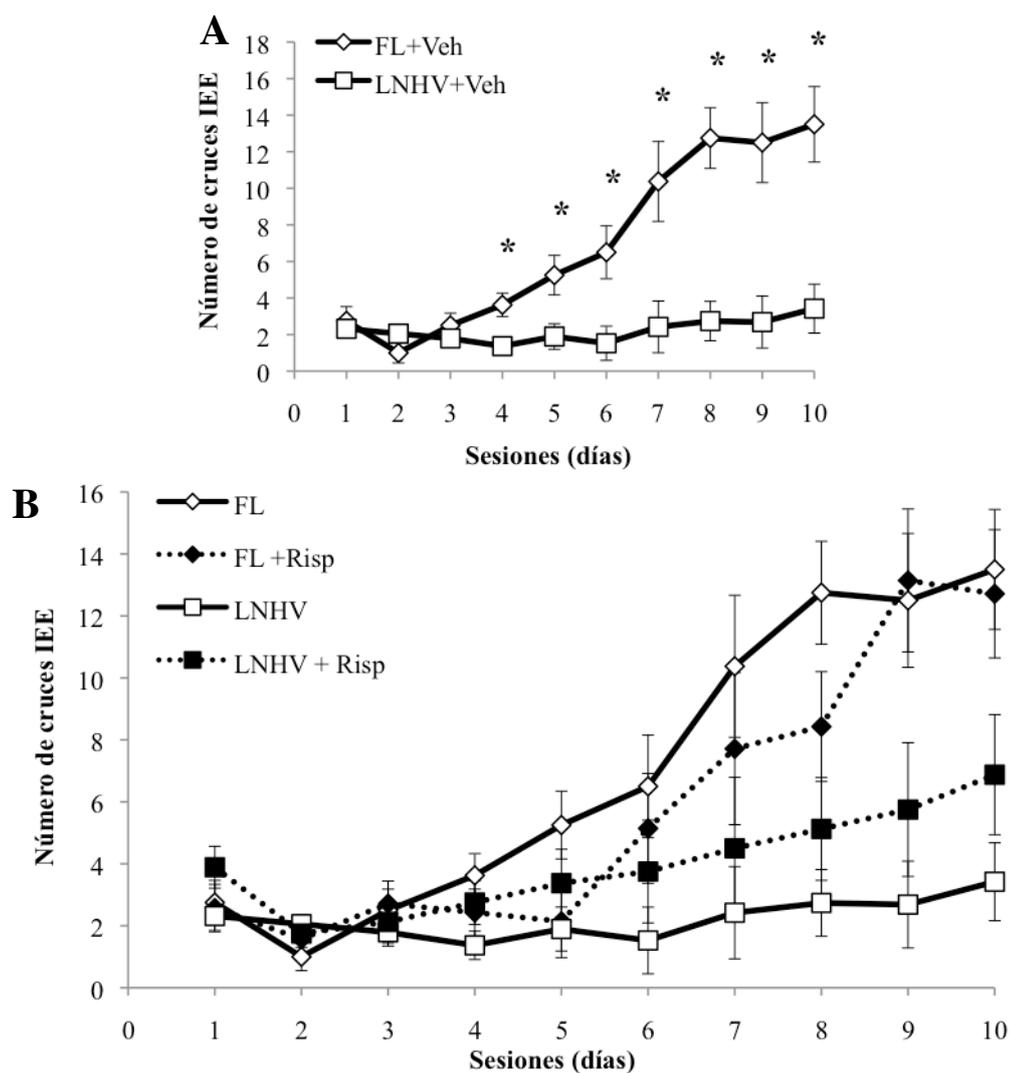


Figura 20. Evitación Activa. Número de los cruces realizados durante los intervalos entre ensayos (IEE) por cada uno de los grupos experimentales en las 10 sesiones de la prueba. (A) Efecto de la lesión neonatal del hipocampo ventral en los animales sin tratamiento (LNHV+Veh vs. FL+Veh). (B) Efecto de la RISP en los animales falsos lesionados (FL+RISPvsFL+Veh) y lesionados (LNHV+RISPvsLNHV+Veh). * indica las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) que se obtuvieron en los animales FL+Veh vs. LNHV+Veh. Ningún efecto significativo de la RISP se obtuvo ni en los animales falsos lesionados (FL+RISP vs. FL+Veh), ni en los lesionados (LNHV+RISP vs. LNHV+Veh).

1.3.3. Freezing

La comparación del número de *freezings* entre los grupos animales sin tratamiento mostró un número de *freezings* mayor en el caso de los animales lesionados que en los animales falsos lesionados, en todas las sesiones de la prueba, siendo significativas las diferencias a partir de la tercera sesión (Fig.20 A).

Las comparaciones de estos animales sin tratamiento con los correspondientes tratados con RISP, indicaron un número de *freezings* significativamente mayor en el caso de los animales lesionados sin tratamiento, que en los animales lesionados tratados con RISP, en la quinta y la décima sesión de la prueba ($p=0,01$ en los dos casos). En las otras sesiones de la prueba, se observó la misma tendencia a partir de la segunda sesión de la prueba, aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. En cuanto a los animales falsos lesionados tratados con RISP en comparación con los animales falsos lesionados sin tratamiento, estos mostraron un número de *freezings* menor entre la tercera y la sexta sesión, y a partir de esta última sesión, esta tendencia se invirtió mostrando valores mayores, aunque las diferencias entre ambos grupos no alcanzaron significación estadística en ninguna de las sesiones de la prueba. (Fig. 20 B).

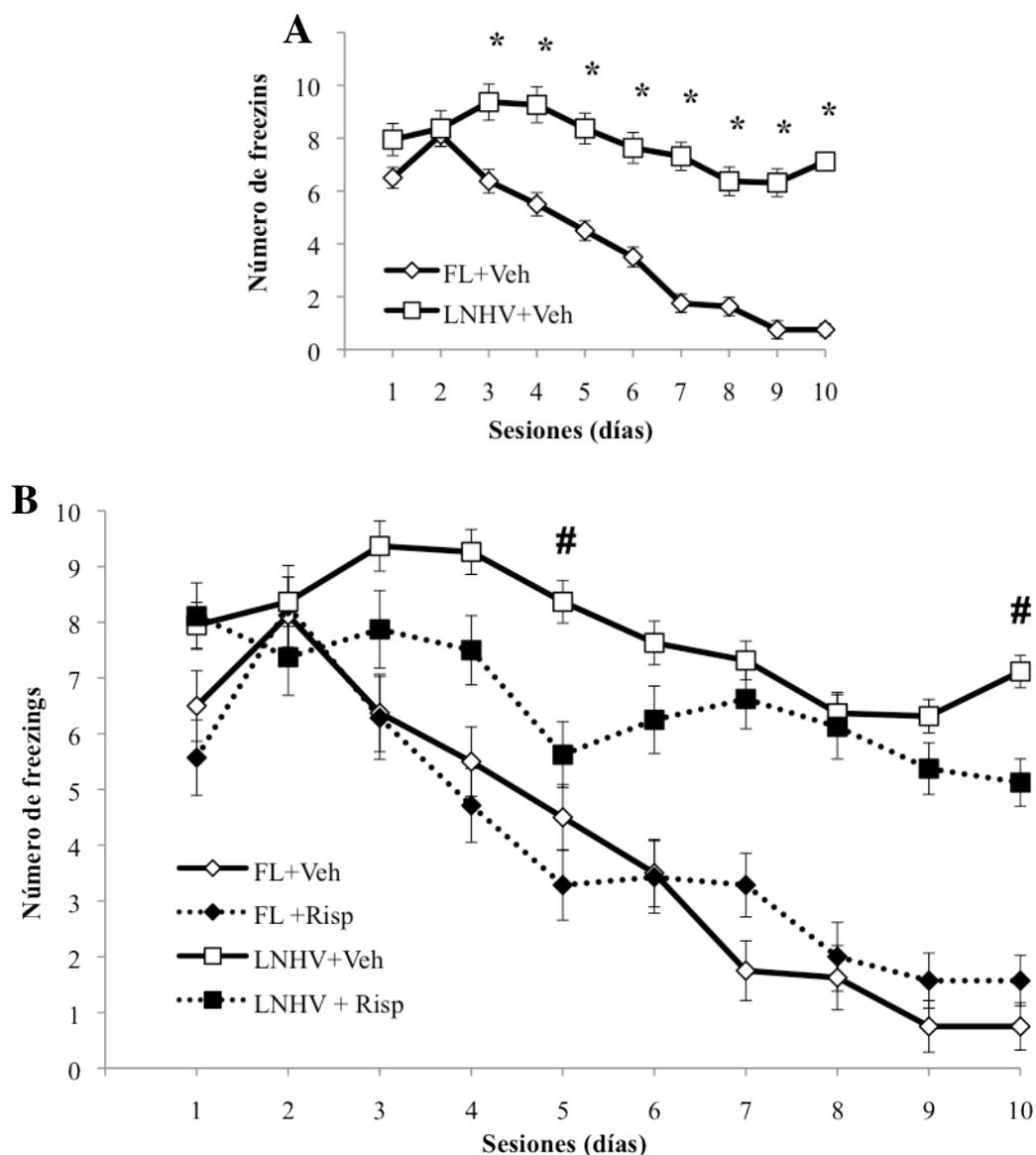


Figura 21. Evitación activa. Valores de freezings realizados por cada uno de los grupos experimentales durante las 10 sesiones de la prueba. (A) Efecto de la lesión neonatal del hipocampo ventral en los animales tratados con vehículo (LNHV+Veh vs. FL+Veh). (B) Efecto de la RISP en los animales falsos lesionados (FL+RISPvsFL+Veh) y los lesionados (LNHV+RISPvsLNHV+Veh).* y # indican respectivamente las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) obtenidas en los animales FL+Veh vs. LNHV+Veh, y los animales LNHV+ Veh vs. LNHV+RISP.

1.3.4. Defecación

Los animales falsos lesionados sin tratamiento mostraron números de defecaciones decrecientes a lo largo de las sesiones de la prueba, mientras que los animales lesionados sin tratamiento indicaron números de defecaciones bastante estables, alrededor de 4 defecaciones/día, en todas las sesiones (Fig. 21 A). Las comparaciones entre ambos grupos muestran que las diferencias alcanzaron la significación estadística únicamente en la décima y última sesión de la prueba ($p = 0,01$).

Los animales falsos lesionados tratados con RISP y los animales falsos lesionados sin tratamiento mostraron números de defecaciones similares, pero decrecientes a lo largo de las sesiones, siendo las comparaciones entre ambos grupos, no significativas en todas las sesiones de la prueba. En el caso de los animales lesionados, las ratas tratadas con RISP, en comparación con las ratas sin tratamiento, mostraron un mayor grado de defecaciones en las 4 primeras sesiones, marcando una diferencia significativa en la segunda sesión ($p= 0,01$), y disminuyendo a partir de la séptima sesión, aunque sin alcanzar significación estadística en ninguna de estas sesiones (Fig. 21 B).

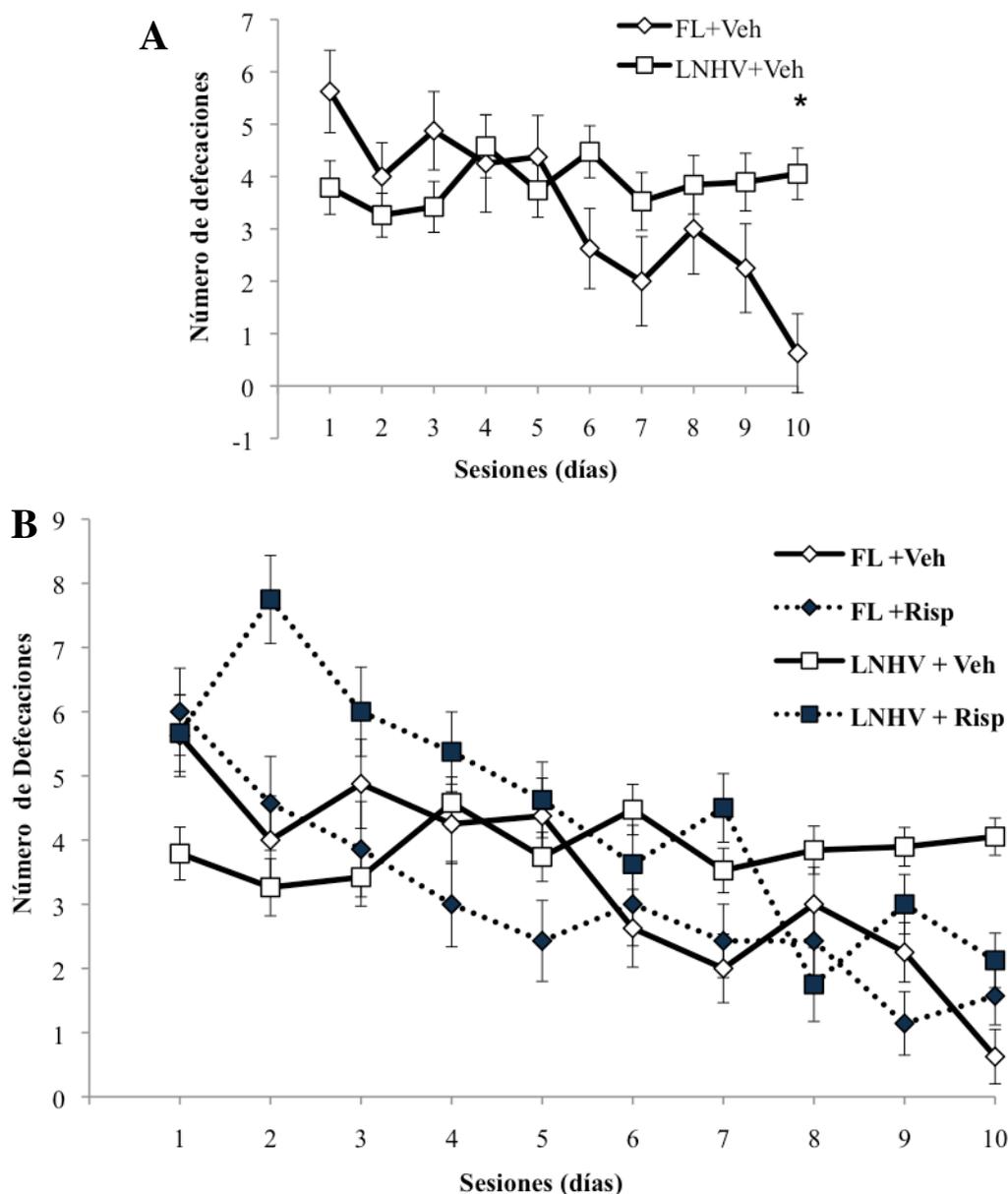


Figura 22. Prueba de evitación activa: cuantificación de las defecaciones realizadas por cada uno de los grupos experimentales durante las 10 sesiones de la prueba .(A) Efecto de la lesión neonatal del hipocampo ventral en los animales sin tratamiento (LNHV+Veh vs. FL+Veh). (B) Efecto de la RISP en los animales falsos lesionados (FL+RISPvsFL+Veh) y los lesionados (LNHV+RISPvsLNHV+Veh).* y # indican respectivamente las diferencias significativas ($p \leq 0,05$) que se obtuvieron en los animales FL+Veh vs. LNHV+Veh, y los animales LNHV+ Veh vs. LNHV+RISP.

2. Resultados del estudio morfológico

2.1. Extensión y localización de las lesiones

Una vez completados los estudios comportamentales, los animales fueron procesados para el estudiar la características morfológicas y funcionales de las lesiones, aplicando técnicas histológicas convencionales y métodos inmunohistoquímicos.

La lesión bilateral del hipocampo ventral se verificó con la tinción de Nissl de las secciones del hipocampo de los animales lesionados y falsos lesionados. Como se muestra en la figura 22, en el hipocampo ventral (CA1, CA2 y algunos CA3) y el subiculum ventral de los animales lesionados, se observó pérdida neuronal bilateral, atrofia, retracción del hipocampo, y algunas veces cavidades, alteraciones que no se observaron en los animales falsos lesionados.

En el estudio, se tuvieron en cuenta sólo los datos provenientes de los animales que presentaron lesiones únicamente en el hipocampo ventral, y que no se extendieron a las áreas adyacentes, como las regiones dorsales del hipocampo, el tálamo o la amígdala. Los animales con un grado de lesión insuficiente o demasiado extensa fueron desechados y por tanto, excluidos del estudio.

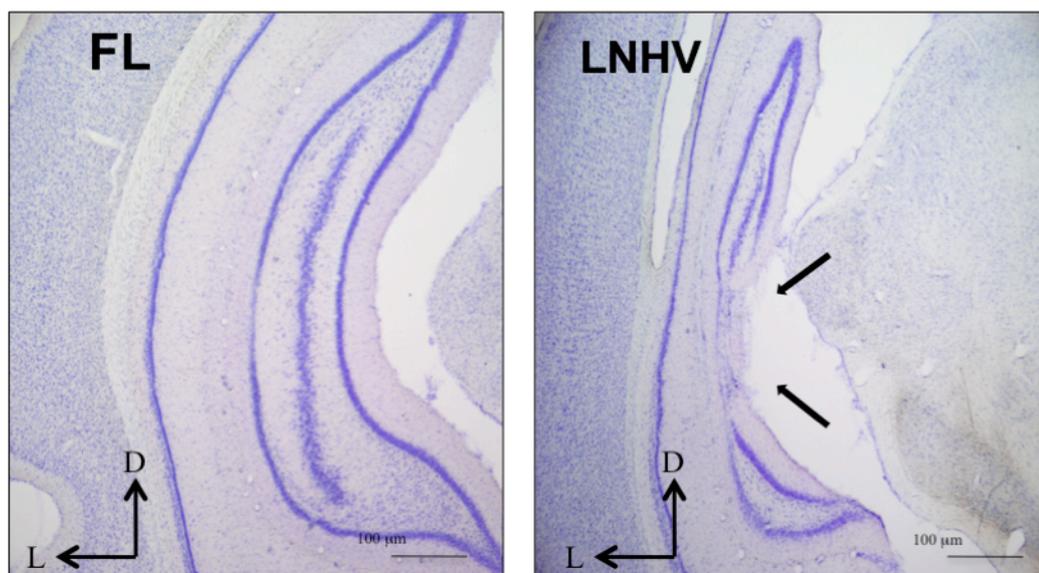


Figura 23: Secciones coronales teñidas con Nissl, representativas de la región del hipocampo ventral de una rata falsa lesionada y de una rata LNHV. Las flechas indican el área de la pérdida celular. Se aprecia la clara alteración estructural del hipocampo provocada por la lesión, tanto en celularidad como en grosor.

2.2. El grosor de la corteza

La comparación del grosor de la CPFm prelímbica de los animales sin tratamiento no mostró ninguna diferencia significativa entre los animales lesionados y falsos lesionados. Las comparaciones de los resultados obtenidos en estos grupos, con los grupos correspondientes tratados con RISP tampoco mostraron diferencias significativas, ni en los animales falsos lesionados ni en los lesionados (Fig. 23). Sin embargo, hay que resaltar que en el caso de los animales sin tratamiento, los animales lesionados presentaron un grosor ligeramente mayor de la corteza que los animales falsos lesionados, sin llegar a tener significación estadística.

Los animales lesionados tratados con RISP presentan una disminución en el grosor de la CPF en comparación con los animales

lesionados sin tratamiento. Los animales falsos lesionados tratados con RISP, por el contrario, presentan un aumento del grosor en comparación con los animales sin tratamiento.

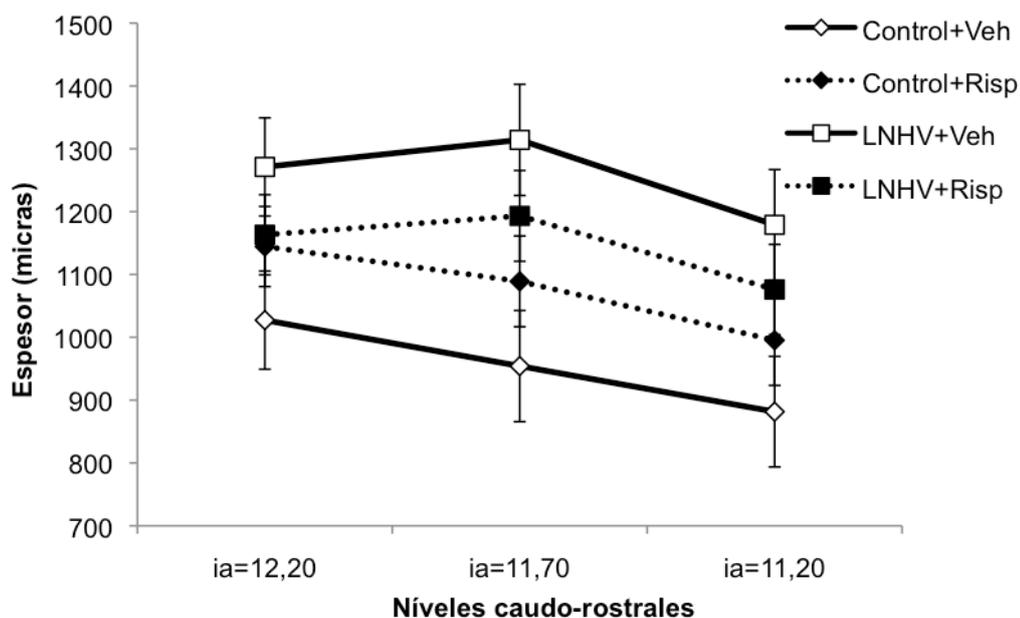


Figura 24. Representación gráfica del grosor de la región prelímbica de la CPFM de cada uno de los grupos experimentales (media \pm ESM). Las curvas indican las tres medidas realizadas (medial, dorsal y ventral) en cada uno de los tres niveles en el plano rostro-caudal. No se han obtenido diferencias significativas en ninguna de las comparaciones.

2.3. Recuento celular

El recuento neuronal se realizó sobre las preparaciones inmunoteñidas para la visualización de la GFAP, c-Fos, PV, CaBP. El análisis estadístico de los datos del recuento celular no mostró diferencias significativas entre los grupos del estudio para todos los marcadores inmunohistoquímicos utilizados (Fig. 24). Sin embargo, hay que destacar que el número de células observado en los animales tratados con RISP

(lesionados y falsos lesionados), fue ligeramente mayor para todos los marcadores inmunohistoquímicos utilizados.

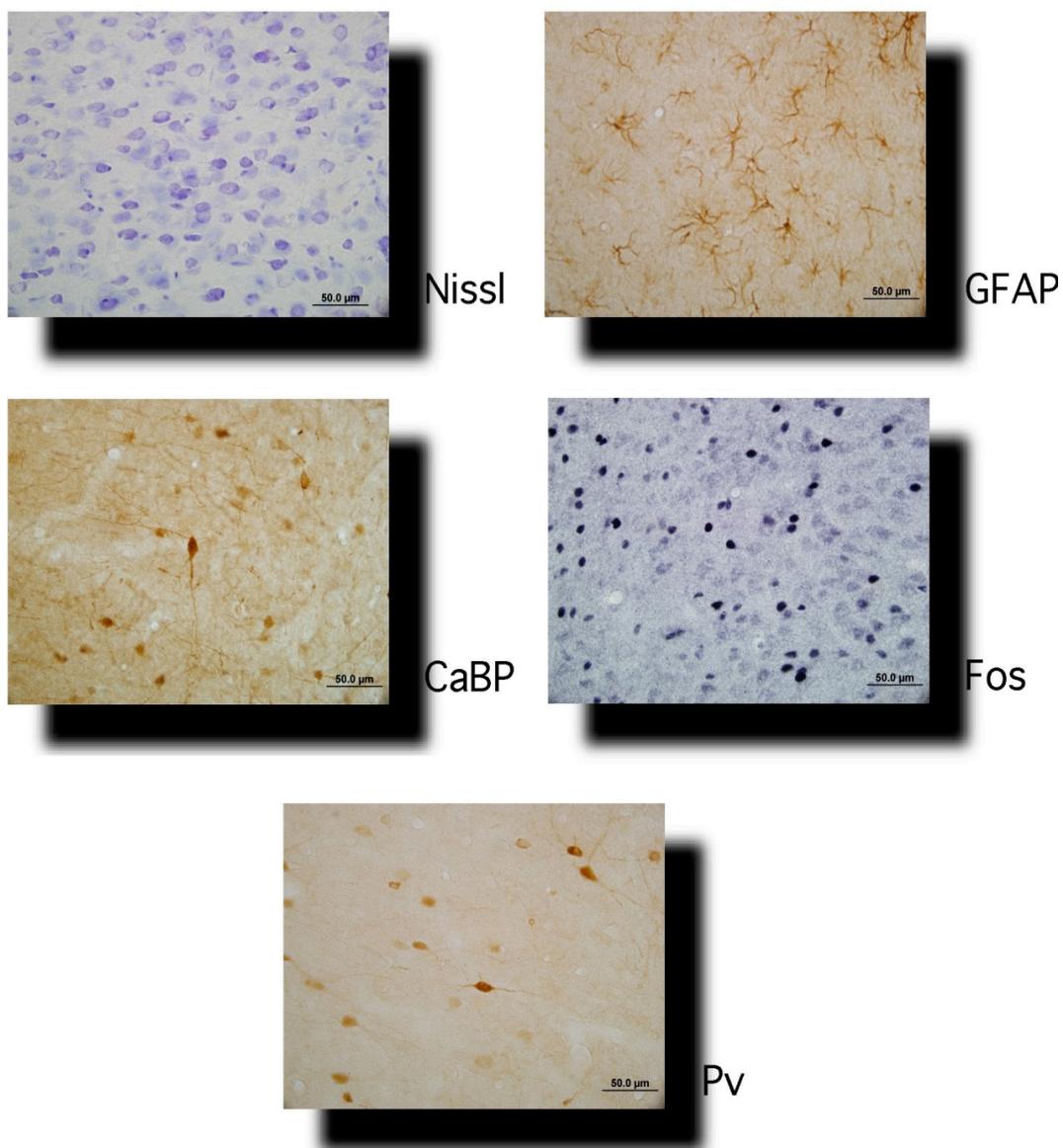


Figura 25. Imágenes del procesado de tejido para distintas tinciones empleadas

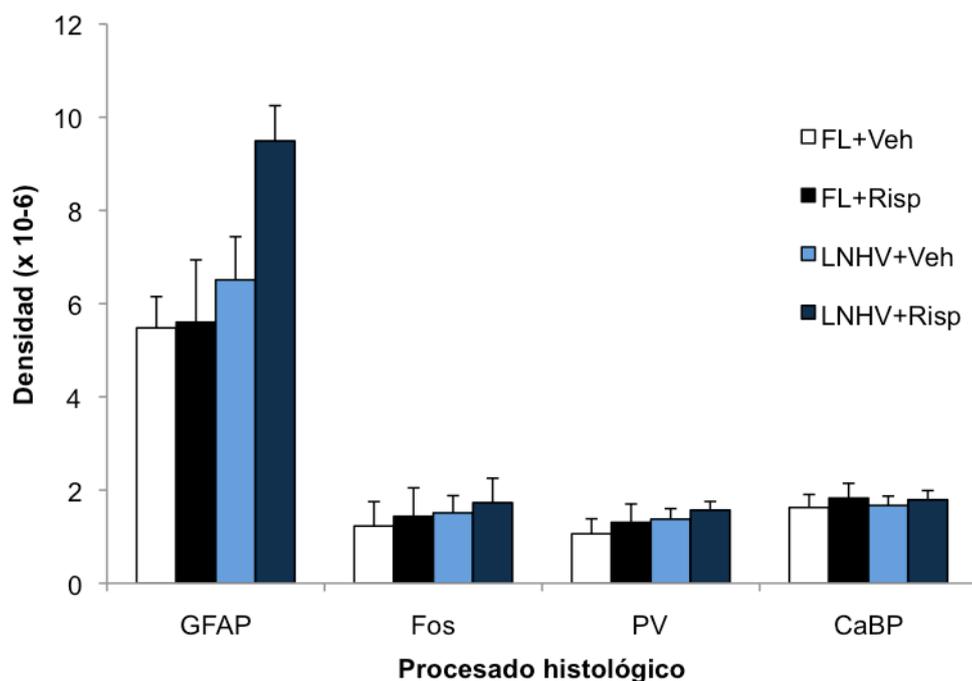
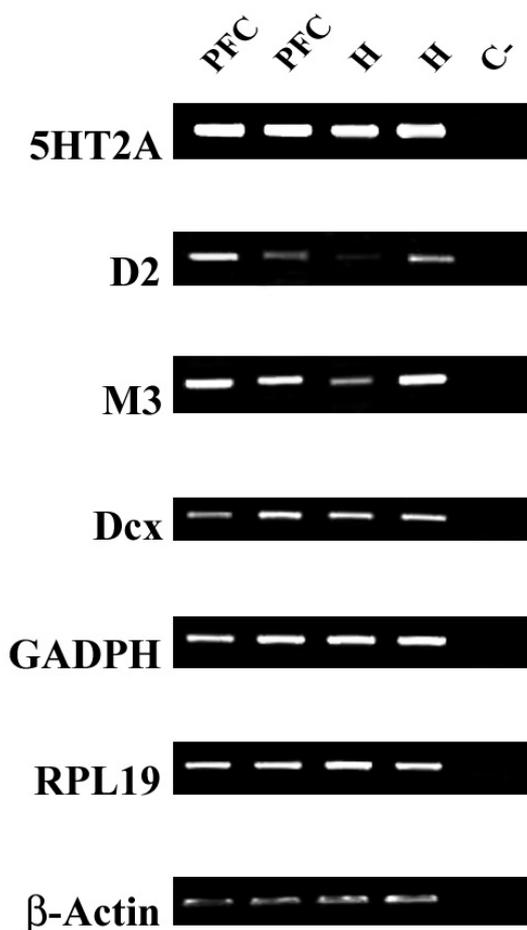


Figura 26. Número medio de células obtenidas en la región prélimbica de la CPFM en cada uno de los grupos experimentales, para los diferentes marcadores inmunohistoquímicos utilizados. GFAP (*proteína fibrilar ácida glial*), Fos, PV (*parvoalbúmina*) CaBP (*calbindina D28k*)

3. Resultados de la expresión genética de los receptores dopaminérgicos D2, serotoninérgicos 5-HT2A

En un primer paso, extrajimos ARN y comprobado su pureza, utilizando un bioanalizador (Agilent 2100), realizando a continuación la retrotranscripción de los RNA mensajeros (síntesis de cDNA) utilizando 1 µg de RNA total de tejido, con el kit “ImProm-IITM Reverse Transcripción System”. Para comprobar que la síntesis de cDNA se realizó con éxito y



poder realizar los controles estándar para cuantificar la expresión, hemos realizado como control la amplificación por PCR de tres fragmentos de cDNA correspondientes a tres genes “house keeping”:

- α -actina de rata (GenBank, N° NM_031144), el cual se expresa constitutivamente y a niveles de expresión aproximadamente iguales en todos los tejidos
- una enzima de la glicolisis, que es un gen constitutivo de todas las células (gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa-GADPH)
- gen de la proteína ribosómica L19 (RPL19).

Figura 27. Estandarización de RT-PCR de genes a estudiar en muestras controles

Los resultados observados en la figura anterior, demuestran cómo en corteza e hipocampo de animales controles hay expresión de los genes a estudiar.

Para poder llevar a cabo los análisis cuantitativos del nivel de expresión de los genes mencionados en las distintas condiciones (falso lesionado vs. falso lesionado +risperidona, lesión y/o lesión+risperidona), procedimos a optimizar las condiciones adecuadas de PCR para cada uno de estos genes, esto es, hemos determinado las condiciones de temperatura de anillamiento, concentración de magnesio y cebadores, así como la eficiencia de los primers, lo que es lo mismo, determinamos la pendiente en la recta patrón de cada pareja de primers-gen utilizando los estándares de las PCR cuantitativas (qPCRs).

Los resultados de la expresión génica de receptores dopaminérgicos D₂, serotoninérgicos 5-HT_{2A}, presentados en las figuras 26 y 27, mostraron que los animales lesionados experimentan un descenso drástico en los niveles de expresión del receptor D₂ y de serotonina 5-HT_{2A} en la corteza prefrontal ($p < 0.001$ en los dos casos), mientras que en el hipocampo de estos mismos animales, sólo es significativo el descenso en la expresión de D₂ ($p \leq 0,001$). Los niveles de expresión del receptor 5-HT_{2A} son muy variables en esta estructura, tendiendo a incrementarse en relación a los falsos lesionados.

La RISP incrementa también significativamente la expresión del receptor D₂ y 5-HT_{2A} en la corteza de los animales lesionados ($p < 0.001$ en los dos casos) y la disminuye en los falsos lesionados. En el hipocampo, sin embargo, no se aprecia un efecto notable del fármaco en

los animales lesionados sobre la expresión de D_2 y $5-HT_{2A}$; sólo se encuentran cambios significativos en los falsos lesionados, donde disminuye significativamente la expresión del receptor D_2 tras el tratamiento farmacológico ($P < 0,001$).

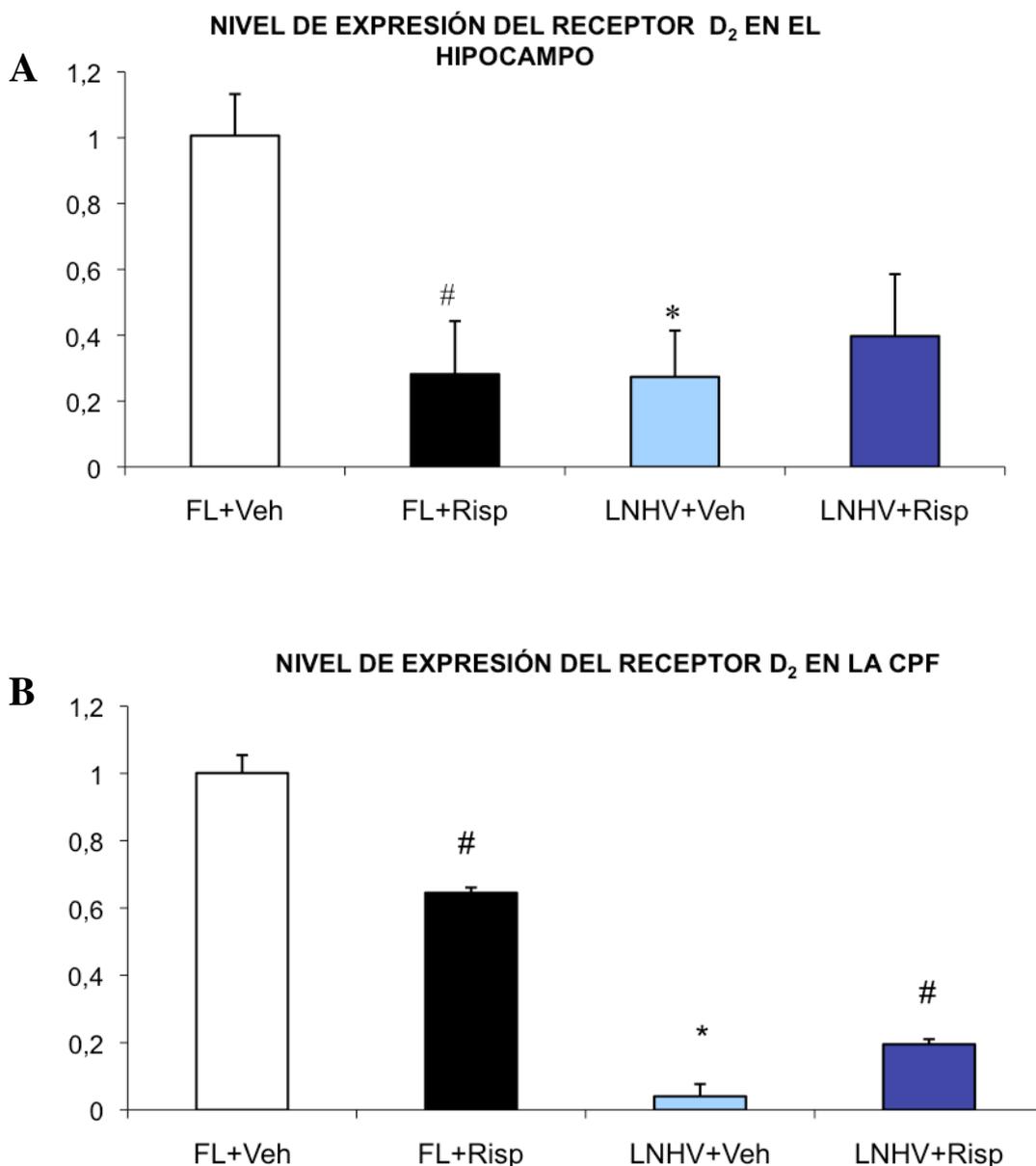


Figura 28: Nivel de expresión del receptor dopaminérgico D_2 en el hipocampo (A) y en la corteza prefrontal (B). * ($p < 0,05$) indica la diferencia significativa entre los animales falsos lesionados y lesionados sin tratamiento (FL+Veh vs LNHV+Veh), y # ($p < 0,05$) la diferencia entre animales sin / con tratamiento.

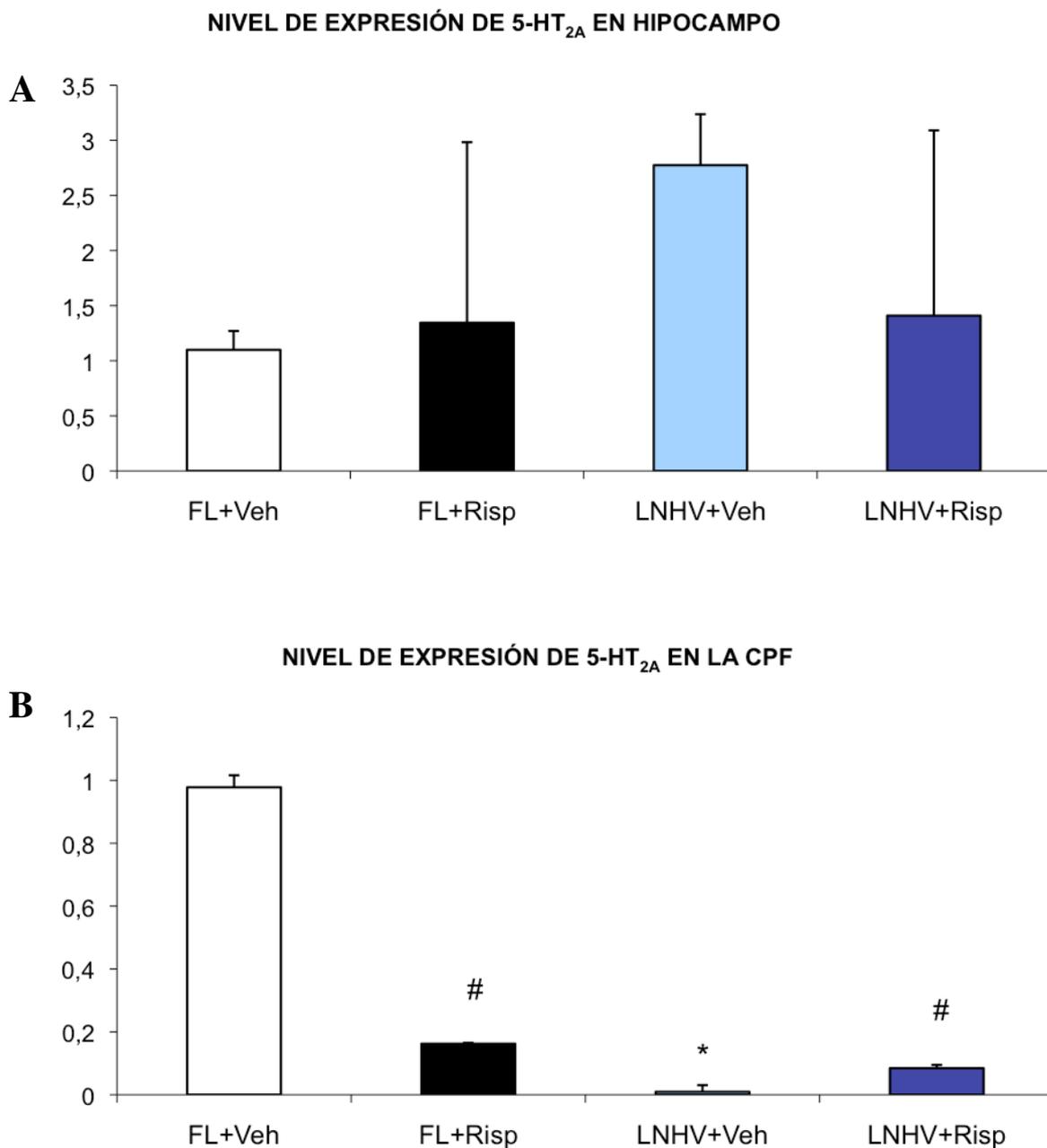


Figura 29: Nivel de expresión del receptor serotoninérgico 5-HT_{2A} en el hipocampo (A) y en la corteza prefrontal (B). *(p<0,05) indica la diferencia significativa entre los animales falsos lesionados y lesionados sin tratamiento (FL+Veh vs LNHV+Veh), y # (p<0,05) la diferencia entre animales sin / con tratamiento.

4. Resultados del estudio bioquímico

4.1. Niveles plasmáticos de risperidona

Las mediciones por HPLC de los niveles de RISP y su metabolito, 9-OH-RISP, en las muestras de plasma de los animales indicaron respectivamente concentraciones medias de 4,17 ($\pm 1,53$) y de 17,27 ($\pm 5,19$) ng/mg, con una concentración total (RISP + 9-OH-RISP) de 21,43 ($\pm 6,73$) ng/mg. Estas mediciones se hicieron en 7 animales elegidos aleatoriamente entre los animales lesionados y falsos lesionados, tratados con RISP.

4.2. Efecto sobre la actividad lipolítica

4.2.1. Efecto de risperidona sobre el peso de los animales

Los datos que se registraron durante el estudio conductual, permitieron disponer de una información sobre la evolución de los pesos de los grupos experimentales a lo largo del periodo del estudio. Los pesos se midieron en tres ocasiones, P56, P70 y P84, correspondientes a los días postnatales de los animales en que se hicieron las medidas del RAS y de la IEP. El análisis de estos datos indicó que los animales sin tratamiento, falsos lesionados y lesionados, no mostraron ninguna diferencia significativa en ninguno de los tres periodos de mediciones ($206,60 \pm 1,89$; $258,25 \pm 2,36$ y $336,81 \pm 2,08$ VS. $199,91 \pm 2,63$; $262,17 \pm$

3,56 y $341,33 \pm 5,04$, respectivamente en los animales sin tratamiento, falsos lesionados vs. lesionados a los DP56, 70 y 84).

Las comparaciones de los pesos de estos grupos animales sin tratamiento con sus correspondientes grupos tratados con RISP, indicaron que los animales tratados, falsos lesionados y lesionados, tienen pesos significativamente mayores en P56 y P70 (respectivamente, $p= 0,01$; $0,01$; $0,01$ y $0,01$) en los animales FL+Veh vs. FL+RISP y LNHV+Veh vs. LNHV+RISP), mientras que en P80, la diferencia no son significativas).

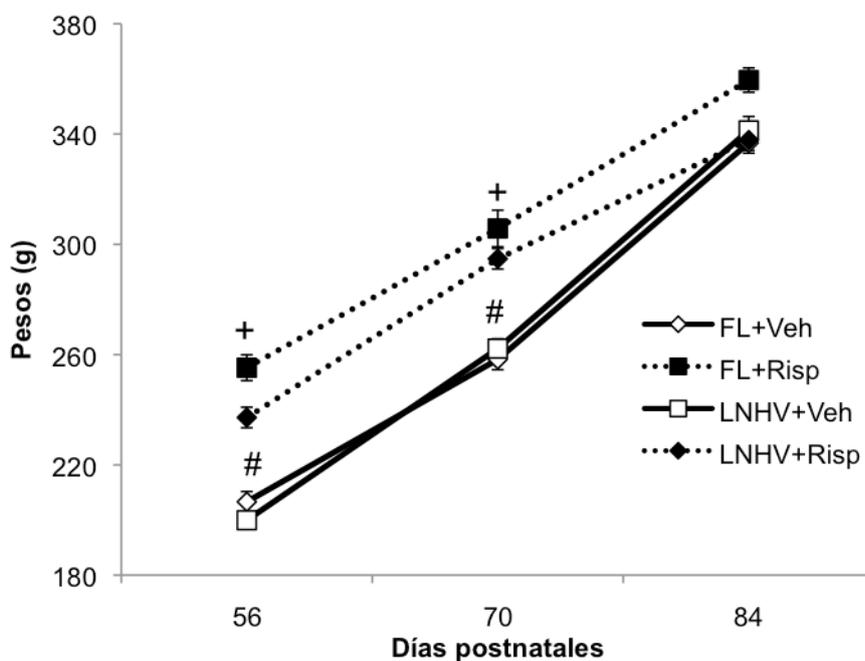


Figura 30. Curva ponderal de los grupos experimentales a lo largo del experimento. Se determina el peso de los animales en los días postnatales 56, 70 y 84.

4.2.2. Efectos de la risperidona sobre la adiposidad

Pesamos los paquetes de grasa perirrenal y epididimaria, y los expresamos como porcentaje del peso graso en relación al peso corporal total. Estas medidas se realizaron después de 65 días con (2,1% índice resultante) o sin tratamiento con risperidona (1,5% índice resultante). Únicamente, determinamos la adiposidad en ratas falsas lesionadas, para poner de manifiesto el efecto del antipsicótico sin la interferencia de los posibles efectos provocados por la lesión. Aunque se evidencia un aumento en la adiposidad en las ratas tratadas con risperidona, éste no es significativo.

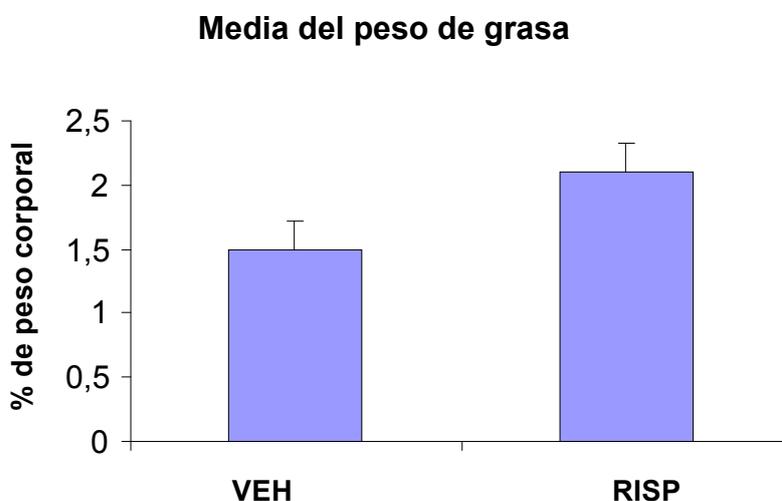
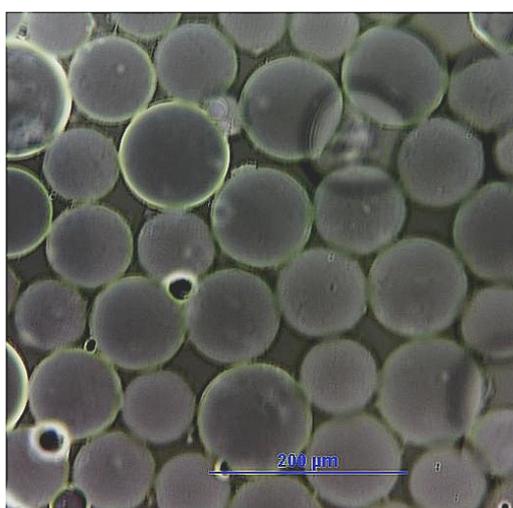


Figura 31. Media del peso de los paquetes grasos perirrenal y epididimario, expresado como % de peso corporal total en ratas falsas lesionadas, tratadas o sin tratar con RISP (2 mg/kg/día).

4.2.3. Efecto de la administración crónica de Risperidona sobre el tamaño de los adipocitos, en ratas falsas lesionadas.

Los resultados obtenidos en cuanto al área, diámetro y perímetro de los adipocitos aislados procedentes de animales falsos lesionados (Fig.30), nos muestran un ligero incremento en el tamaño de en los animales tratados con risperidona.



| | AREA | PERÍMETRO | DIAMETRO | n°adipocitos |
|---------------------|-------------------|----------------|----------------|--------------|
| a. Controles | 6176,01 ± 1674,24 | 289,32 ± 36,25 | 87,95 ± 11,54 | 800 |
| a. Tratados | 7178,71 ± 1576,78 | 314,42 ± 38,49 | 100,13 ± 11,58 | 800 |

Figura 32. : Observación en fresco (imagen invertida) y morfometría de adipocitos aislados procedentes de animales falsos lesionados tratados o no con risperidona (2 mg/kg/día) durante 65 días.

4.2.4. Efecto de distintos fármacos sobre la actividad lipolítica, en ratas con/sin tratamiento crónico con Risperidona.

Para el estudio metabólico en este trabajo, hemos seleccionado los grupos experimentales, de falsas lesionadas y lesionadas, a las que se administró por vía oral RISP (2 mg/kg/día).

Las ratas lesionadas muestran una lipólisis basal significativamente inferior a las ratas falsas lesionadas (0,21 vs. 0,77 μ moles de glicerol).

Sobre la lipólisis basal de ratas falsas lesionadas y lesionadas, que han sido tratadas con RISP, el efecto de los 3 antipsicóticos ensayados (haloperidol –HAL–; risperidona- RISP: opipramoi –OPI-) 0es el siguiente (Fig. 31): los μ moles de glicerol liberados en presencia de la HAL, RISP y OPI en las ratas FL s son respectivamente de 0,62; 0,62 y 0.63; y en las ratas lesionadas de 0,29; 0,27 y 0,29. Ninguno de los antipsicóticos produce modificaciones significativas de la lipólisis basal en las ratas tratadas con RISP.

En el grupo de ratas falsas lesionadas (Fig. 30), ni HAL (1,85) ni RISP (2,29), modifican significativamente la lipólisis estimulada por forskolina (2,10), frente a una disminución de la lipólisis estimulada por isoprenalina (2,57) por parte del HAL (1,87), que no se produce con la RISP (2,51).

En las ratas lesionadas (Fig. 31), HAL (1,63) y RISP (1.95), disminuyen significativamente la lipólisis estimulada por forskolina (2,38), y la lipólisis estimulada por isoprenalina (2,63) [HAL (1,94), RISP (2,21)].

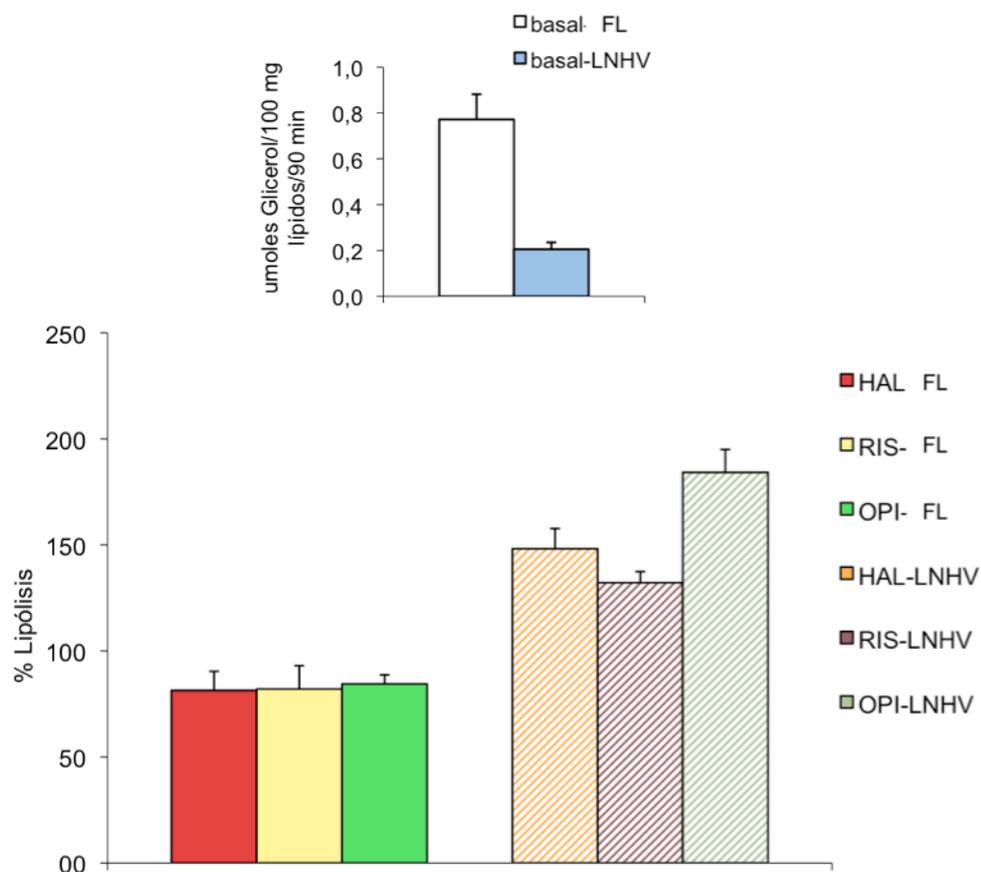


Figura 33. Efecto sobre la lipólisis basal de la administración aguda de diferentes compuestos: Haloperidol (Hal 0,1mM), Risperidona (Ris 0,01mM), Opipramol (Opi 0,1mM) en ratas FL y LNHV a las que se les ha administrado RISP vía oral durante 65 días). Los resultados se expresan como porcentaje de la lipólisis basal en FL y LNHV, considerando la lipólisis basal = 100%. (*) $p < 0,05$.

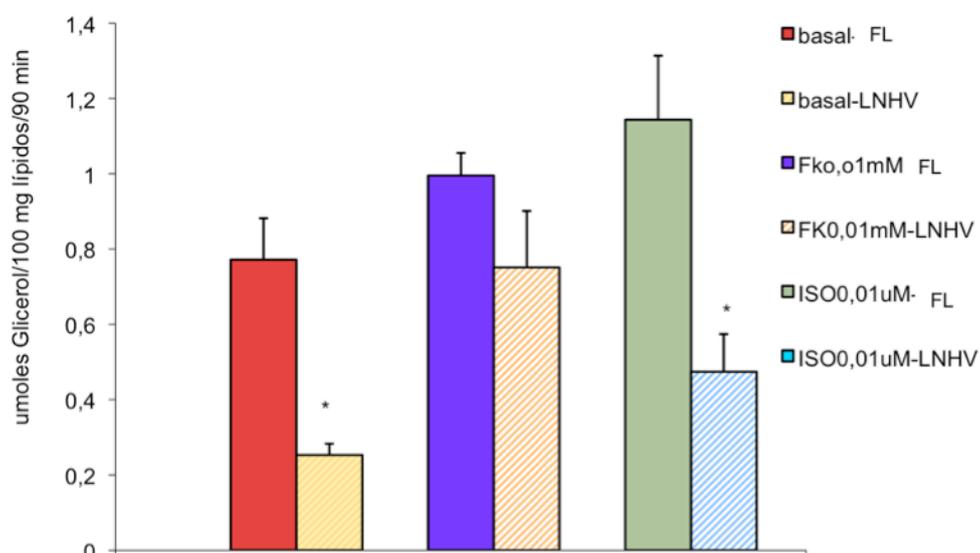


Figura 34. Efecto sobre la lipólisis basal de 2 estimulantes lipolíticos: Forskolina (FK 0,01mM) e Isoprenalina (ISO 0,01 uM) en ratas FL y LNHV, a las que se les ha administrado Risperidona vía oral durante 65 días. Los resultados se expresan como μ moles de glicerol liberados por 100 mg de lípidos durante 90 minutos (*) $p < 0,05$

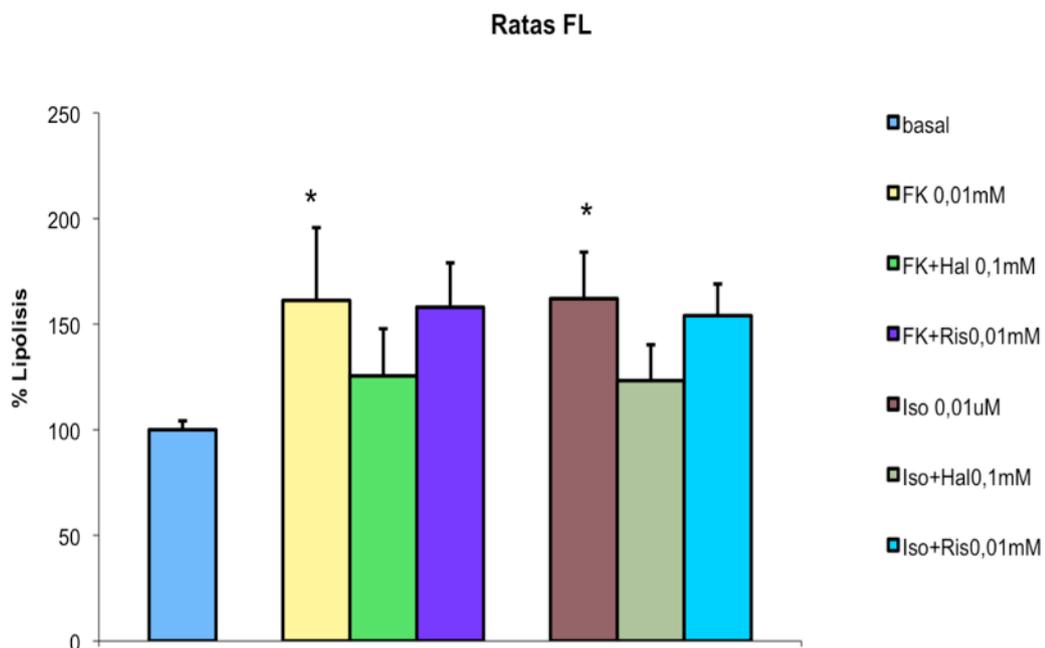


Figura 35. Efecto de Haloperidol (Hal 0,1 mM) y Risperidona (Ris 0,01mM) sobre la lipólisis estimulada por Forskolina (FK 0,01mM) e Isoprenalina (Iso 0,01uM), considerando la lipólisis basal = 100%. Los animales son ratas falsas lesionadas (FL) que han recibido RISP vía oral durante 65 días. (*) $p < 0,05$.

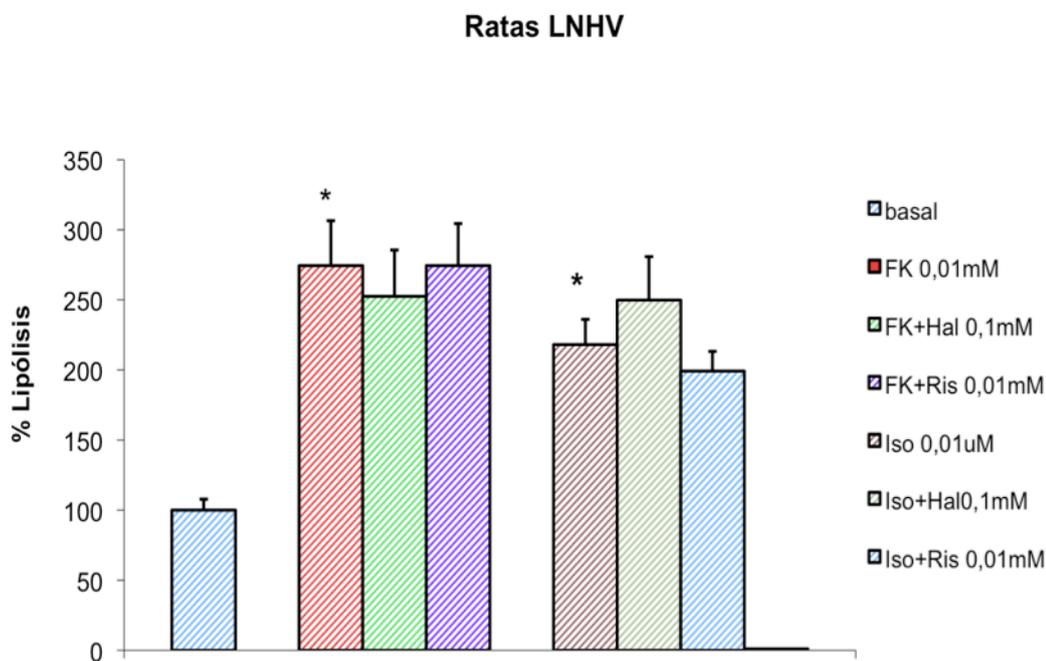


Figura 36. Efecto de Haloperidol (Hal 0,1 mM) y Risperidona (Ris 0,01mM), sobre la lipólisis estimulada por Forskolina (FK 0,01mM) e Isoprenalina (Iso 0,01uM), considerando la lipólisis basal = 100%. Los animales son ratas lesionadas (LNHV) que han recibido RISP vía oral durante 65 días. (*) $p < 0,05$.

V – DISCUSIÓN

Hemos realizado lesiones en el hipocampo ventral en ratas neonatas para obtener un modelo animal de esquizofrenia experimental (EE), administrando a parte de estos animales un neuroléptico atípico, risperidona, 65 días. Hemos evaluado los cambios conductuales a lo largo del experimento, comprobando que las ratas operadas tienen hiperactividad locomotora y exploratoria, menor capacidad de aprendizaje, menor IEP y muestran un mayor nerviosismo; estos dos últimos aspectos revierten con el tratamiento con risperidona.

Al sacrificar a los animales, comprobamos que nuestro modelo de EE presenta un descenso en los receptores dopaminérgicos D₂ tanto en corteza prefrontal como en hipocampo, y un descenso de los serotoninérgicos 5-HT_{2A} en la corteza prefrontal, que mejoran con la administración de risperidona. En el hipocampo, también se encuentran disminuidos los niveles de receptores dopaminérgicos, mejorando también con el tratamiento farmacológico. Finalmente, nuestro modelo presenta alteraciones metabólicas, con un incremento en la lipólisis basal.

1. Consideraciones metodológicas

1.1. Elección del animal de experimentación

En este estudio elegimos como animal de experimentación ratas de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*), ya que hemos realizado estudios previos en nuestro laboratorio sobre la administración crónica de RISP en ratas sanas, y disponemos de una amplia base de datos sobre IEP en

esta misma cepa (Castellano y cols., 2009). Además, la cepa Wistar es uno de los animales más utilizados en otros laboratorios para estudios de la IEP (Koch, 1996; Lehmann y cols., 1999) y otros estudios conductuales (Weiss y Feldon, 2001; Dalley y cols., 2004;). Por otra parte, nuestro grupo de Neurobiología de la Audición cuenta con una gran experiencia en el estudio neuroanatómico del cerebro de la rata, desarrollado en esta especie (Merchán y cols., 1988; Saldaña y Merchán, 1992; López y cols., 1999; Malmierca, 2003;). Otras ventajas, como el bajo coste y la gran facilidad de manejo, hacen que la rata albina sea el animal experimental idóneo para este estudio.

En este estudio, se utilizaron únicamente ratas machos, ya que las hembras presentan variaciones conductuales dependientes del ciclo hormonal. Se sabe que las hembras muestran una mayor actividad motora durante el período de celo, lo que podría alterar nuestros resultados conductuales (Santacana, 1978; Black y cols., 1998; Silva-Gomez y cols., 2003). Además, se ha comprobado que las distintas fases del ciclo hormonal alteran la IEP (Swerdlow y cols., 1993).

1.2. Elección del periodo lesional

El desarrollo cerebral de los mamíferos está caracterizado por diferentes procesos, que incluyen la proliferación y diferenciación celular, asociados a fenómenos que participan en la elaboración de las redes neuronales, y que favorecen el crecimiento neuronal y la formación de las

sinapsis. Al contrario del ser humano, en el que estos procesos tienen lugar desde el estado fetal y siguen después del nacimiento, el desarrollo del cerebro de la rata empieza lentamente antes del nacimiento, y las principales etapas ocurren durante las primeras semanas postnatales. De forma esquemática, existen dos etapas principales en el desarrollo posnatal de la CPF de la rata. La primera empieza desde el nacimiento hasta el DP 18; y está dominada por fenómenos de intensa diferenciación neuronal y la morfogénesis, y por la progresiva formación de las capas corticales (Van Eden y Uylings, 1985). Por otra parte, este período se caracteriza por cambios profundos de la conectividad, incluyendo procesos de sinaptogénesis, de crecimiento axonal y de la estabilización de las conexiones sinápticas (Nieto Sampedro y cols., 1985). Es durante la primera semana postnatal, cuando se termina la organización topográfica de las proyecciones dopaminérgicas mesocorticales sobre las diferentes capas de la CPF (Kalsbeek y cols., 1988), y es cuando las fibras tálamocorticales establecen contactos sinápticos con las neuronas piramidales de la CPF (Van Eden, 1986). Al DP18, se considera que las características citoarquitectónicas globales de la CPF están adquiridas. La segunda fase del desarrollo de la CPF (DP 18 - 90) se caracteriza

principalmente por una extensión volumétrica de la estructura asociada con los procesos de estabilización sináptica. Estos datos sugieren que las alteraciones tempranas del desarrollo de la CPF, especialmente durante la primera semana postnatal, podrían tener repercusiones mayores sobre la organización celular de la CPF, sobre el establecimiento de las conexiones sinápticas intracortical y sobre la topografía de las proyecciones aferentes y eferentes a la CPF. Se considera por analogía ontogénica, que la primera semana de vida postnatal de la rata corresponde al segundo semestre de la gestación en el hombre (Bayer y cols., 1980), considerado como un período crítico en el desarrollo, caracterizado por una elevada vulnerabilidad ante los cambios que pueden conducir a la aparición futura de la esquizofrenia.

1.3. La elección de los falsos lesionados en lugar de los controles

En un estudio reciente de nuestro laboratorio (Gomes-Moscoso y cols, 2009), se ha mostrado que no hay diferencia entre los grupos de animales que reciben agua normal con una solución del vehículo, por esa razón, en este estudio, los grupos que han recibido el vehículo son utilizados como controles.

1.4. La elección de la dosis y la vía de administración de la risperidona

Uno de los elementos novedosos de este estudio es la forma y vía de administración del fármaco, que nos permite eliminar las desventajas que suponen otras formas de administración, especialmente cuando se trata de administraciones prolongadas, y de estudios conductuales. Utilizamos la vía oral para la administración del tratamiento, y en concreto el agua de bebida, habiéndose demostrado ampliamente que es una forma segura de administración del fármaco, y que proporciona niveles plasmáticos del mismo adecuados y mantenidos (Tamminga y cols., 1990; Kaneda y cols., 1992; Roberts y cols., 1995, 2002; Kelley y cols., 1997; Gao y cols., 1997, 2005; Roberts 2001; Roberts y Lapidus 2003; Sakai y cols., 2001a, b; Kelley y Roberts 2004 ;). El fármaco se mantiene estable en el agua durante un periodo mínimo de 96 horas, a temperatura ambiente.

Datos recientes de nuestro laboratorio (Moscoso y cols, 2009), demuestran que no hay diferencias entre los grupos de animales que reciben agua corriente sólo o con una solución del vehículo, por lo que, en este estudio, los grupos que han recibido el vehículo son utilizados como controles. Hemos trabajado con una dosis de RISP, que fué elegida basándonos en la literatura (Hertel y cols., 1996, 1998; Ichikawa y cols., 1998; Ichikawa y Meltzer, 2000; Terry y cols. 2005, 2007; Zhang y cols., 2007). y en nuestros propios resultados (Castellano y cols., 2009;

Moscoso y cols., 2009;). Los estudios con RISP en animales abarcan dosis muy diversas, desde 0,1 a 2 mg/kg. Aunque, es difícil extrapolar dosis del humano al animal, se asimila que dosis de 6 a 8 mg/día en humanos, efectivas en la mayoría de los pacientes para el tratamiento de los síntomas psicóticos sin inducción de síntomas extrapiramidales (Marder y Meibach, 1994), pueden ser equivalentes a dosis alrededor de 2 mg/día en animales (Broderik y cols., 2003). Asimismo, la dosis utilizada por nosotros, fue elegida para conseguir, *in vivo*, niveles de ocupación del receptor D2 en un rango del 65-80% (Barth y cols. 2006; Kapur y cols., 2003) comparables a los terapéuticamente relevantes.

2. El estudio conductual

La inhibición por estímulo previo

Nuestros resultados no mostraron ningún efecto significativo inducido por la lesión hipocampal en la IEP, aunque los valores encontrados eran menores que los usados como controles. Tampoco el antipsicótico administrado modificó significativamente los valores de la IEP, aunque tendió a aumentar ligeramente estos valores, tanto en los animales lesionados (LNHV) como en los falsos lesionados. Estas respuestas se obtuvieron en los tres periodos de medición de la IEP. Aunque la comparación longitudinal de los valores de la IEP a lo largo de estos tres periodos, tampoco mostró diferencias significativas, estos

valores mostraron una tendencia a aumentar en la décima semana de edad de los animales (después de 35 días de tratamiento con la RISP), y a volver a disminuir 2 semanas después, en la duodécima semana, tras 50 días de tratamiento.

Estos resultados, concuerdan con los obtenidos previamente en nuestro laboratorio (datos no publicados) que mostraron que los valores de la IEP aumentan drásticamente a las 12 semanas de edad de las ratas y vuelven a caer después con el avance en la edad. Razón por la cual, se eligió esta edad para valorar la IEP de los animales de nuestro estudio, y de esa forma evaluar el efecto de la RISP sobre la LNHV en las ratas en un periodo crítico de evolución de los valores de la IEP. Queda por dilucidar si se trata de un efecto de la edad o de la RISP.

Los resultados del efecto de la RISP, al mostrar una tendencia a aumentar los valores de la IEP de los animales falsos lesionados, son también consistentes con resultados recientes de nuestro laboratorio (Castellano y cols., 2009). Estos resultados indicaron que la administración crónica de la RISP tendió a aumentar la IEP de las ratas sanas, aunque la dosis utilizada en este trabajo era baja (1mg/kg/día x 70 días), en comparación con la que hemos utilizado en nuestro estudio. Resultados similares fueron obtenidos en otros estudios previos que demostraron también un aumento de la IEP por la RISP en ratas sanas (Varty y cols., 1999; Depoortere y cols., 1997; Keith y cols., 1991), aunque

otros no observaron ninguna modificación de los niveles basales de la IEP por este fármaco (Terry y cols., 2005).

Por otra parte, en relación con los animales lesionados (LNHV), estudios previos indicaron que estas ratas en la edad adulta muestran déficits en la IEP, similares a los observados en los pacientes esquizofrénicos (Braff y cols., 1978; 1992; Bolino y cols., 1994; Perry y Braff 1994; Lipska y cols., 1995b; Swerdlow y cols., 1995; Kumari y cols., 2000; Parwani y cols., 2000; Le Pen y cols., 2000; Le Pen y Moreau, 2002; ; ; Rueter y cols., 2004).

La lesión del hipocampo ventral afectaría el desarrollo de la corteza prefrontal y de otras estructuras subcorticales que participan en la modulación de la IEP, lo que comprometería su función reguladora (Saunders y cols., 1998).

No hemos encontrado ninguna modificación de la respuesta de sobresalto, lo que está de acuerdo con estudios previos de Lipska y cols. (1995) en ratas LNHV, que no mostraron ninguna modificación del RAS en estos animales.

En nuestro estudio únicamente encontramos un leve deterioro de la IEP en ratas lesionadas (alrededor del día 21), aunque no es significativo y no se correlaciona con los distintos prepulsos utilizados, como señalan otros autores (Daenen y cols., 2003)

En la literatura se describen la ausencia de modificaciones en la IEP de los animales lesionados, especialmente cuando las lesiones

hipocampales se realizan en ratas adultas (Swerdlow y cols., 1995). Sin embargo, las lesiones combinadas de CPF medial e hipocampo en adultos, sí alteran el comportamiento por afectación del sistema dopaminérgico mesolímbico (Lipska et al., 1994).

Le Pen y cols., mostraron que los déficits de la IEP inducidos por la lesión neonatal en hipocampo son total o parcialmente revertidos por los antipsicóticos atípicos como la RISIP, la clozapina, o la olanzapina. Rueter y colaboradores, indicaron que la administración crónica de RISIP (0,1 mg/kg/día x 23 días) y clozapina (2,5 mg/kg/día x 23 días) atenúa significativamente los déficits de la IEP que resultan de la lesión de la rata (Rueter y cols., 2004). Otros estudios con dosis agudas de RISIP (0,1-1 mg/kg) y clozapina (12-20 mg/kg) redujeron también los déficits de la IEP (Le Pen y Moreau, 2002). Datos similares fueron hallados en otros estudios con otros modelos animales de esquizofrenia

En relación a los efectos de los antipsicóticos típicos, los resultados son contradictorios, ya que algunos investigadores encuentran que el haloperidol antagoniza estos déficits (Geyer y cols., 1993; Varty and Higgins 1995; Bakshi y cols., 1998; Bakshi y Geyer 1999, Ellenbroek y cols., 1998), frente a otros autores (Le Pen y cols., 2002), que no pueden demostrar cambios por haloperidol en la IEP inducida por la lesión.

Estos estudios están de acuerdo con los datos clínicos obtenidos en pacientes esquizofrénicos. De hecho, diversos estudios mostraron una

alteración sensoriomotora en los pacientes esquizofrénicos (Perry y Braff, 1994; Kumari y cols., 2000; Parwani y cols., 2000; Braff y cols., 2001; 1992; 1978), que respondió mejor a los antipsicóticos atípicos (Kumari y cols., 1999; Kumari y Sharma, 2002; Leumann y cols., 2002; Oranje y cols., 2002; Molina y cols., 2003; Molina y cols., 2005; ;), que a los antipsicóticos típicos (Braff y cols., 1978; Braff y Geyer, 1990; Bolino y cols., 1992; Braff y cols., 1992; Grillon y cols., 1992).

Todos estos datos apoyan la idea de que los antipsicóticos atípicos, y no los típicos, son capaces, en cierta medida, de invertir los déficits de la IEP observados en la ratas LNHV, lo que sugiere que estos déficits pueden estar particularmente relacionados con alguna de las propiedades fundamentales vinculadas con los antipsicóticos atípicos. Es posible que para revertir los déficits de la IEP, los antipsicóticos atípicos interaccionen en la región neuronal afectada por la lesión a través de receptores 5HT-2A, $\alpha 2$ o H1, distintos a los dopaminérgicos, antagonizados principalmente por haloperidol.

Los antipsicóticos atípicos, denominados a veces antagonistas serotonín-dopaminérgicos por su acción anti 5HT_{2A}/D₂, ejercen su acción antipsicótica a través de la modulación de la acción D2, mediante un efecto compensador sobre otros sistemas (serotoninérgico, glutamatérgico y $\alpha 1$ -adrenérgico), que va encaminada a bloquear la transmisión dopaminérgica en las áreas límbicas e incrementarla en las corticales.

En este sentido, otros estudios han mostrado que las alteraciones de la IEP inducidas por las infusiones intraventriculares del NMDA, antagonista del receptor glutamatérgico, en el hipocampo y el subiculum, son antagonizadas por la administración sistémica de la clozapina pero no por la de haloperidol (Wan y cols., 1998; Zhang y cols., 1999).

Otros estudios mostraron que la clozapina, la olanzapina o la RISP, al contrario del haloperidol, atenuaron en ratas el déficit de la IEP inducida por la PCP, otro antagonista glutamatérgico (Keith y cols. 1991; Bakshi y cols. 1994; Bakshi y Geyer 1995; Varty y Higgins 1995; Swerdlow y cols. 1996; Yamada y cols. 1999). Yamada y cols. demostraron que la capacidad de estos fármacos para revertir la alteración de la IEP inducida por la PCP esta correlacionada con su afinidad por los receptores 5HT-2A y no por los receptores D2 (Yamada y cols., 1999), de acuerdo con la hipótesis que estipula que la serotonina (a través de los receptores 5HT-2A) y el Glutamato podrían interactuar en la modulación de la IEP (Varty y cols., 1999). Estos datos sugieren que el déficit de la IEP inducido por la lesión podría resultar de una alteración del funcionamiento del sistema glutamatérgico que podría ser antagonizado potentemente por los antipsicóticos atípicos. Esta hipótesis cuenta también con el apoyo de varios resultados obtenidos en las ratas LNHV. De hecho, un hipo-funcionamiento del sistema glutamatérgico ha sido observado en el hipocampo y la CPF de las ratas LNHV (Schroeder y cols. 1999). Por otra parte, se ha demostrado que las ratas LNHV son

hipersensibles a los antagonistas del receptor GLU, como el caso del MK-801 (Lillrank y cols., 1996; Al-Amin y cols., 2000, 2001) y la PCP (Hori y cols., 2000; Kato y cols., 2000).

Desde un punto de vista anatómico, los déficits de la IEP en las ratas adultas lesionadas en el HV, no se han correlacionado con alteraciones morfológicas hipocampales (Swerdlow y cols., 1995 y Swerdlow y cols., 2000), lo que sugiere que la LNHV puede afectar sustratos anatómicos de la IEP distintos del hipocampo, como la CPFM o el NAcc. Estas dos estructuras están involucradas en los circuitos de la inhibición prepulso (Swerdlow y cols., 2001), y ambas reciben proyecciones directas de GLU a partir del HV (Brog y cols., 1993, Fink 1993, Groenewegen y cols., 1987 y Jay y cols., 1996).

Campo abierto

Nuestros resultados mostraron una mayor actividad horizontal total de los animales LNHV, en comparación con los falsos lesionados. Esta hiperactividad de los animales LNHV, sin embargo no se revierte por tratamiento con la RISP, y al contrario de lo esperado, mostró una tendencia al aumento. La actividad de los animales falsos lesionados tampoco respondió al tratamiento con la RISP, aunque se observó una tendencia a la reducción, al contrario de lo que se obtuvo en los animales LNHV. Los resultados de las actividades horizontales externas e internas,

las dos variantes de la actividad horizontal total, indicaron que los animales, tanto LNHV como falsos lesionados, sin y con tratamiento, mostraron actividades externas mayores en comparación con las actividades internas. Además, siempre en relación con estas dos actividades, se observó que la actividad externa de los animales LNHV ha sido significativamente mayor que la de los animales falsos lesionados, y la misma tendencia se obtuvo en la actividad interna, aunque las diferencias en este caso no han sido significativas. El tratamiento con la RISP tampoco afectó de manera significativa estas dos actividades,. Nuestros resultados mostraron una tendencia de los animales LNHV a tener una mayor actividad vertical (*rearing*), que la de los animales falsos lesionados. El tratamiento con RISP aumentó significativamente esta actividad en los animales LNHV, y la misma tendencia se observó en los falsos lesionados, aunque sin diferencias significativas. Por otra parte, los resultados de las actividades de aseo y movimientos orofaciales (*grooming*), mostraron que los animales LNHV tenían un número de groomings significativamente menor que el de los animales falsos lesionados. Esta actividad aumentó significativamente por el tratamiento con RISP en los animales LNHV, mientras que este mismo tratamiento no mostró ningún efecto en los animales falsos lesionados.

De acuerdo con nuestros resultados de la actividad horizontal total, estudios previos mostraron también una hiperactividad locomotora y exploratoria de los animales LNHV, en la fase de post-pubertad, en

comparación con los animales controles (Lipska y cols., 1993; 1994; Lipska y Weinberger, 1994; Wan y cols., 1996; Sams-Dodd y cols., 1997; Black y cols., 1998; Le Pen y cols., 2000; Silva-Gomez y cols., 2003; Wood y cols., 2003; Alquicer y cols., 2004; Flores y cols., 2005, Richtand y cols., 2006 y Endo y cols., 2007, Berg y cols., 2008; Beninger y cols., 2009). Aunque la mayoría de estos estudios se llevaron a cabo con la cepa Sprague-Dawley, un estudio similar con la cepa Wistar, la misma cepa que se utilizó en nuestro estudio, mostró también que las ratas LNHV desarrollaron una hiperactividad postpuberal, en comparación con los animales controles (Daenen y cols., 2002).

Nuestros resultados de las actividades horizontales internas y externas, también coinciden con los resultados de otros estudios previos que mostraron la consistencia del comportamiento de tigmotaxia de los animales en la prueba del CA (Santacana, 1978; Russell, 1979; Crawley, 1985; Calatayud y Belzung, 2001; Crusio, 2001; Boissy y cols., 1995; Blois-Heulin y Belzung, 1995; Ramos y cols., 2003; Prut y Belzung, 2003). De hecho, los animales confrontados a una situación de estrés en un ambiente desconocido, iluminado y rodeado de paredes, tienden a permanecer en la periferia del campo (zonas externas del aparato), el cuerpo casi siempre en contacto con las paredes, evitando la zona de eversión (zonas internas del aparato). Por esa razón, y de manera indirecta, se considera que el tiempo pasado, o el número de cuadros visitados, en la zona central del aparato es indicativo del nivel de

ansiedad del animal (Hall y cols., 1998; Ramos y cols., 1998; Korte y cols., 2001; Eilam y cols., 2003; Prut y Belzung, 2003; Ramos y cols., 2003; Stanford, 2003), y así los niveles elevados de ansiedad producen una disminución en el cociente n° cuadrados cruzados en el centro / n° cuadrados cruzados en la periferia. Con esta prueba se valora la reacción del animal frente a un episodio estresante, resultando que un tratamiento con efecto ansiolítico disminuiría la inhibición del comportamiento exploratorio provocado por el estrés.

El estudio de Sams-Dodd y cols. indicó que los animales LNHV muestran una mayor respuesta al estrés, en comparación con los animales controles (Sams-Dodd y cols., 1997). Este equipo observó también una reducción del tiempo pasado en la zona central del aparato, lo que indica un nivel alto de ansiedad de estos animales, similar a la tendencia que hemos obtenido en nuestro estudio. En contraste con esta observación, Rueter y cols., además de mostrar también un hiperactividad de los animales LNHV, observaron un aumento consecuente en el tiempo que las ratas LNHV visitaban el centro del aparato, lo que indica que estas ratas están menos ansiosas y/o son más impulsivas (Rueter y cols., 2004). Estos autores no descartaron la posibilidad de atribuir esta conducta a los déficits de la memoria espacial que experimentan las ratas LNHV, visitando por más tiempo las zonas de aversión, por no recordar que las habían explorado antes (Rueter y cols., 2004). Sin embargo, otros estudios contradicen esta explicación, mostrando en ratas con disfunción

cognitiva que no hay cambios en el tiempo pasado en estas zonas (Rowe y cols., 1998; Chambers y cols., 1996).

Es importante indicar también, que el cambio que se observó en nuestro estudio en la actividad locomotora y exploratoria en la fase post-puberal (DP 86) de la vida de los animales LNHV, es similar a la aparición en la edad adulta temprana de cambios comportamentales, hecho análogo a la emergencia tardía de los primeros síntomas positivos en los pacientes esquizofrénicos (Wan y cols., 1996; Dodd y cols., 1997; Lispska y Weinberger, 1998, 2000).

Por otra parte, con respecto al efecto del tratamiento con RISP sobre la hiperactividad de los animales LNHV, es importante indicar que el efecto de este fármaco se estudió en pocas ocasiones en este modelo, y los estudios que existen se diferencian entre ellos en numerosas variables, como es el caso de la dosis y la duración del tratamiento elegidas, los periodos de vida de los animales en que se hicieron las pruebas con respecto a la madurez sexual, etc. Según nuestros datos, es la primera vez en que se estudia en este modelo el efecto de la administración crónica de una dosis de 2 mg/kg/día durante 65 días, entre el DP 35 y 100. Rueter y cols.(fecha) mostraron que la administración crónica de RISP (0,1 mg/kg) y clozapina (2,5 mg/kg) durante 21 días, a partir del DP 56, revertieron la hiperactividad locomotora inducida por la lesión; aunque, observaron también que estos dos antipsicóticos atípicos aumentaron la actividad locomotora de los animales controles (Rueter y

cols. 2004). En este mismo estudio, también se observó que la RISP redujo el tiempo de exploración de las zonas centrales del aparato por las ratas LNHV. Nuestros resultados son similares a los obtenidos en este estudio, en la medida en que la RISP tendió a aumentar la actividad locomotora y exploratoria, y reducir la actividad interna de nuestros animales LNHV. El estudio de Richtand y cols mostró también que la administración de RISP (45 y 85 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$) durante 21 días a partir del DP 35, normalizó la respuesta locomotora anormal elevada inducida por las anfetaminas en ratas LNHV (Richtand y cols. 2006). Sin embargo, en este mismo estudio, estas dosis de RISP eran menos capaces de proteger contra la elevada actividad locomotora provocada por la novedad en las ratas LNHV.

Por otra parte, con respecto al efecto de la RISP en los animales falsos lesionados, varios estudios previos mostraron que este fármaco redujo la actividad locomotora y exploratoria de estas ratas, de acuerdo con la tendencia que obtuvimos en nuestro estudio. Karl y cols. mostraron que la administración crónica de RISP (2,13 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$) y haloperidol (0,4 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$) durante 28 días a partir del DP 67 a ratas sanas de la cepa Sprague Dawley, reducía la actividad locomotora y exploratoria, alteraba la memoria de trabajo y aumentaba el nivel de ansiedad de los animales tratados, en comparación con los animales controles (Karl y cols., 2006). Este estudio indicó también que las ratas tratadas con RISP y haloperidol visitaban más las zonas centrales del aparato del CA, lo que sugiere que

estos dos antipsicóticos, permitieron reducir los niveles de ansiedad de estos animales.

Terry y cols., (2007) estudiaron en ratas de la cepa Wistar el efecto de la administración crónica en el agua de RISIP, la misma vía de administración que se eligió en nuestro estudio, a una dosis de 2,5 mg/kg/día, durante un periodo de 15 a 180 días. Este grupo midió la actividad locomotora de estos animales en el CA en dos ocasiones (después de 8-14 y 31-38 días de tratamiento) y no encontraron ninguna diferencia significativa en la actividad locomotora horizontal y vertical o en los movimientos estereotípicos (como es el caso del grooming), así como en las conductas indicativas de miedo/ansiedad (tiempo pasado en la zona periférica frente a la zona central del aparato). Un estudio reciente de nuestro laboratorio tampoco mostró un efecto significativo de la administración oral crónica de la RISIP (1 mg/kg/día durante 140 días) sobre la actividad locomotora y exploratoria espontánea de las ratas sanas de la cepa Wistar, aunque los animales tratados tendieron a mostrar una mayor actividad (Castellano y cols., 2009). Al contrario de los estudios anteriores, Drago y cols., mostraron que la administración crónica y aguda de la RISIP a la dosis de 1 mg/kg/día aumentó la actividad exploratoria y el rearing, y redujo el grooming en las ratas sanas (Drago y cols., 1996)

Con respecto a la conducta del grooming, varios estudios, de acuerdo con nuestros resultados, mostraron una reducción postpubertal

de esta conducta en los animales LNHV, en comparación con los animales controles (Silva-Gomez y cols., 2003; Flores y cols., 2005). En cuanto al efecto de la RISP sobre las respuestas de grooming de los animales LNHV, no hemos encontrado estudios similares en estos animales. Un estudio reciente de nuestro laboratorio con ratas sanas, (Castellano y cols. 2009), mostró que la RISP (1mg/kg/día durante 140 días) aumentó significativamente las respuestas de grooming de las ratas sanas, al contrario de lo que se observó en los animales falsos lesionados de nuestro estudio, mostrando niveles de grooming significativamente reducidos por el tratamiento con la RISP. Un estudio similar mostró también, en ratas sanas, que la administración crónica y aguda de la RISP (1 mg/kg/día) reducía el grooming (Drago y cols. 1996). A la luz de estos datos, la diferencia entre el efecto obtenido en nuestro estudio, y los obtenidos en otros estudios, podría ser debida a la dosis de la RISP, ya que nosotros utilizamos una dosis mayor.

Los efectos de la RISP pueden ser atribuidos a su efecto ansiolítico como ha sido mostrado por varios estudios (Hillert y cols., 1992; Aguilar y cols., 1997; Marder y cols., 1997; Nowakowska y cols., 1999; Ravindran y cols., 2007). De este modo, los antipsicóticos que poseen esta actividad ansiolítica tienden a reducir el tiempo que la rata permanece en las proximidades de las paredes en la prueba del CA, y a aumentar la actividad exploratoria en el centro del aparato (Treit y Fundytus, 1988).

Otros estudios atribuyeron también un efecto sedativo a la RISP, manifestado principalmente por supresión de la actividad locomotora. A diferencia de los humanos, los roedores pueden experimentar una fase de atención y movilidad reducida, que disminuye su capacidad de control / escape del entorno estresante (Rueter y cols., 2004). Prut y Velzung, afirman que en los experimentos realizados con roedores en la prueba del CA, los observadores no determinan los efectos de los tratamientos sobre la exploración que realiza el animal, sino más bien su reacción frente a un episodio estresante. Por tanto, los tratamientos ansiolíticos no incrementan por si mismos el nivel de exploración en el test del CA, sino que disminuyen la inhibición del comportamiento de exploración inducida por el estrés (Prut y Velzung, 2003).

Los efectos antipsicóticos de la RISP resultan de una combinación entre un antagonismo con una afinidad muy elevada por los receptores 5-HT_{2A}, y una ocupación parcial de los receptores D₂, (Bymaster y cols., 1996; Strange, 2001) ya que no es necesaria una elevada ocupación de los receptores dopaminérgicos D₂ para lograr el efecto antipsicótico de la RISP (Leysen y cols., 1993; Schotte y cols., 1996). Presenta una afinidad algo más baja por los receptores serotoninérgicos 5HT_{2C}, (Leysen y cols., 1993; Bymaster y cols., 1996; Kongsamut y cols., 1996; Schotte 1996; Richelson y Souder, 2000), y además, se une con alta afinidad con los receptores adrenérgicos tanto alfa-1 como alfa-2, y con una afinidad moderada a los receptores de histamina H₁ (Bymaster y cols., 1996).

Basándose sobre estos datos, varias hipótesis fueron emitidas para explicar el mecanismo de la eficacia de la RISP para la prevención de las alteraciones comportamentales en los animales LNHV

Evitación activa

Los resultados de la evitación activa son los resultados más destacables de nuestro estudio conductual. Las respuestas de evitación de los animales LNHV demostraron ser significativamente menores en comparación con los animales falsos lesionados, mostrando de esta forma una menor capacidad de evitar estímulos adversos condicionados. La RISP no afectó de manera significativa las respuestas de ambos grupos, sin embargo se observó que este fármaco tendió a aumentar la respuesta de los animales lesionados, y a reducir la de los animales falsos lesionados.

Los cruces realizados durante los IEE mostraron un perfil de respuesta similar al que se obtuvo en las respuestas de evitación, mostrando los animales LNHV un número de cruces IEE menor, en comparación con los animales falsos lesionados. La RISP, como en el caso de las respuestas de evitación, no tuvo efecto significativo sobre estas cifras, sin embargo, tendió a aumentar el número de cruces IEE de los animales LNHV, y reducir el de los animales falsos lesionados.

Los animales LNHV mostraron también niveles de *freezing* significativamente mayores, en comparación con los animales falsos lesionados. La RISP, en este caso, sólo tendió a reducir las respuestas de

freezing de los animales lesionados, siendo las diferencias significativas en la quinta y la decima sesión de la prueba. En cuanto a los animales falsos lesionados, este fármaco tendió a aumentar las respuestas de *freezing*, sobre todo a partir de la sexta sesión de la prueba.

En relación a los números de defecaciones, los animales LNHV mostraron cifras casi invariables a lo largo de todas las sesiones de la prueba, mientras que los animales falsos lesionados, presentaron valores decrecientes. La comparación de ambos grupos, indica que los animales falsos lesionados tendieron a mostrar menor número de defecaciones que los animales LNHV, siendo las diferencias significativas en la décima sesión de la prueba. El tratamiento con la RISP, no tuvo efecto significativo sobre el número de defecaciones de ambos grupos, y tampoco se observaron tendencias concluyentes en ambos grupos.

Estos resultados en conjunto muestran que la lesión indujo una disminución drástica de los procesos de aprendizaje condicionado y de las respuestas motoras incondicionadas de los animales. Las respuestas de *freezing*, consiguientes a las situaciones de estrés y miedo, por el contrario, aumentaron por la lesión y las defecaciones, relativamente altas no se modificaron durante todas las sesiones de la prueba, mientras que disminuyeron de forma continua en los animales falsos lesionados.

Los déficits cognitivos de los animales LNHV, son coherentes con los números mayores de *freezing*, indicativos de niveles mayores de ansiedad en estos animales, en comparación con los falsos lesionados.

Estas respuestas de freezing describen fases de atención y movilidad reducida, que disminuye la capacidad de control/escape del animal, ante el entorno estresante, respuesta que se encuentra acentuada en los animales LNHV, y que explica su nivel alto de ansiedad, en comparación con los animales falsos lesionados. La disminución de las defecaciones, es sinónimo de menor ansiedad y más comodidad del animal en la situación en que se encuentra. En nuestro estudio, el hecho de que los animales LNHV mantengan un número de defecaciones relativamente alto y casi invariable, a lo largo de todas las sesiones de la prueba, mientras que este número decrece en los animales falsos lesionados, indica que los animales LNHV de nuestro estudio han mantenido niveles relativamente altos de ansiedad durante toda la prueba, al contrario de los animales falsos lesionados.

También es importante indicar que la disminución obtenida en los números de cruces IEE de los animales LNHV, una medida indirecta de la actividad motora de los animales, guarda una estrecha relación con el nivel alto del freezing de los animales LNHV. Un número alto de freezing implica más inmovilidad del animal y menos cruces libres e incondicionados entre los compartimientos del aparato, y viceversa. Por esa razón estimamos que la disminución observada en esta prueba de la actividad locomotora de estos animales, no es contradictorio paradójica, a la hiperactividad locomotora obtenida en la prueba del campo abierto.

De acuerdo con todos estos resultados, afirmamos que las ratas LNHV desarrollan déficits cognitivos similares a los observados en la esquizofrenia (Lipska, 2004; Lipska y Weinberger, 2000). Ya se han descrito en este modelo una gran variedad de déficits de aprendizaje (Lipska, 2004). Angst y cols. (2007), indicaron también que las ratas LNHV, en comparación con los controles, requerían más sesiones y más tiempo, para aprender a asociar estímulo con la recompensa, de acuerdo con las conclusiones de Chambers y cols. (2005), y también con nuestros resultados.

Según nuestros datos, el estudio de Le Pen y cols., es el único en el que se sometieron a las ratas LNHV a la prueba de la evitación activa. Este estudio indicó que la LNHV indujo la emergencia, en la edad de post-pubertad, de déficits de larga duración en la regulación sensoriomotora y la capacidad de adquisición y retención de la información en los test de aprendizaje espacial y de evitación activa y pasiva. Estas ratas fueron capaces de adquirir la evitación activa y pasiva, pero, en comparación con los animales control, mostraron un déficit en la retención de la evitación pasiva y adquirieron la conducta de evitación activa con menor rapidez. Por lo tanto, siempre según Le Pen y cols., este modelo parece mostrar un grado interesante de validez, posiblemente, en la simulación de algunas deficiencias cognitivas y sensoriomotoras observado frecuentemente en los pacientes esquizofrénicos (Le Pen y cols., 2000).

Marcquis y cols., (2006) encontraron también un déficit cognitivo de las ratas LNHV. Este grupo sometió a estas ratas a los test del laberinto T y del aprendizaje de discriminación condicional, antes y después de la maduración cerebral completa de los animales, entre el DP26 - 35 y 47 - 85 .En este estudio, se observó que los animales LNHV presentaron déficits de aprendizaje en ambas pruebas y en los dos estadíos de maduración cerebral de los animales, presentando un deterioro en su rendimiento y una alta tasa de errores perseverantes. Estos autores atribuyen estos déficits a una disfunción post-lesional de la CPF que persiste desde la edad juvenil hasta la edad adulta de estos animales.

Estudios similares mostraron también déficits en la memoria de trabajo, el reconocimiento espacial, y la exactitud de la elección, en los test del laberinto radial y el laberinto acuático de Morris, en las fases de pre y post-pubertad de los animales LNHV (Chambers y cols., 1996; Le Pen y cols., 2000; Silva-Gomez y cols., 2003). Estos déficits se atribuyen a una posible disfunción de la CPFM. Sin embargo, las dos pruebas utilizadas son conocidas por ser altamente dependientes del hipocampo dorsal (Moser y cols., 1993; Bannerman y cols., 2002; 2003). Según Silva-Gomez y cols., (2003), parece como si la integridad del hipocampo dorsal en estas ratas LNHV estuviera comprometida, por una lesión parcial, no intencionada de esta zona, causando una disrupción en su desarrollo. En este sentido, varios estudios, señalaron la dificultad de diferenciar las

funciones de la CPFM y del hipocampo dorsal por sus papeles complementarios en la ejecución de las tareas cognitivas estándar (Van Haaren y cols., 1988; Brito y Brito 1990; Sanchez-Santed y cols., 1997; Hock y Bunsey, 1998; Moser y Moser, 1998; Dunnet y cols., 1999; Bannerman y cols., 2002; Lalonde, 2002; Le Marec y cols., 2002).

Por otra parte, no existen estudios sobre el efecto de la RISP sobre la cognición, y los procesos de aprendizaje/memoria de los animales LNHV, y solo existen estudios similares con ratas sanas y en humanos. De hecho, Bubenikova-Valesova y cols., estudiaron el efecto de antipsicóticos típicos y atípicos sobre los déficits cognitivos inducidos por MK-801, antagonista del NMDA, y observaron que sólo la RISP (0,1 o 1,0 mg/kg), al contrario de la ritanserina (antagonista de los receptores 5-HT_{2A/2C}; 2,5 mg/kg) y el haloperidol produjo un deterioro cognitivo de las ratas sanas (Bubenikova-Valesova y cols., 2008). Estudios previos mostraron también resultados similares, demostrando que los antipsicóticos, a algunas dosis, deterioran el aprendizaje espacial en las ratas sanas (Skarsfeldt, 1996; Ahlander y cols., 1999; Light y Braff, 1999; Lipska y Weinberger, 2000; Rosengarten y Quartemain, 2002; Gemperle y cols., 2003; Abdul-Monim y Reynolds, 2007). Sin embargo, en otro estudio en que se administró la RISP a una dosis de 0,1 mg/kg, se observó que este fármaco mejora el proceso de consolidación en el laberinto radial (Addy y Levin, 2002). Un estudio reciente de nuestro laboratorio, sobre el efecto de la administración crónica de la RISP (1mg/kg/día) en ratas

sanas, no mostró ningún efecto significativo de la RISP sobre los procesos del aprendizaje y memoria en la prueba de la evitación activa (Castellano y cols., 2009).

Otros estudios, al contrario mostraron que la RISP mejora el potencial cognitivo en humanos y animales. En particular, se describió una eficacia superior en la mejora de los trastornos de la memoria espacial asociados con la esquizofrenia en comparación con otros antipsicóticos atípicos, como clozapina y olanzapina (Meltzer y McGurk, 1999; Bilder y cols., 2002; Harvey y cols., 2003; McGurk y cols., 2005). La RISP también mejoró la memoria en modelos animales de deterioro de la memoria espacial; es el caso, por ejemplo, de la recuperación de algunos déficits de la memoria de trabajo espacial en el laberinto radial (Wolff y Leandro, 2003) y la reversión de los efectos deletéreos sobre la memoria, del antagonista del NMDA, MK-801, en el test de la memoria de trabajo espacial (Schroeder y cols., 2000).

Por otra parte, estudios en humanos mostraron que la RISP es más eficaz que la clozapina en la mejora de la memoria espacial de trabajo (McGurk y cols., 2005) y también mejora la memoria de trabajo en la modalidad verbal y atencional, en los pacientes esquizofrénicos (Green y cols., 1997). Otros estudios clínicos sugieren que las funciones cognitivas (p.e., la memoria de trabajo verbal) puede ser mejorada por moderadas dosis de la RISP probablemente por su propiedades antagonistas de los receptores 5-HT_{2A} (Green y cols., 1997; Wolff y

Leander, 2003). Podemos concluir que el efecto positivo de la RISP sobre la memoria de trabajo es objeto de controversia en la literatura y parece ser dependiente de la prueba y del diseño de cada estudio (Nowakowska y cols., 1999; Ruotsalainen y cols., 1997).

La RISP interactúa con numerosas dianas que han sido implicadas en los procesos de la memoria, como es el caso de los receptores de la DA, la 5-HT, la NA y la Hys (Richelson y Souder, 2000), situados en regiones como el hipocampo y la CPF, necesarias para la memoria de trabajo espacial (Sánchez-Santed y cols., 1997; y Bunsey Hock, 1998; Bardgett y cols. 2006). Al interactuar con estos receptores en estas regiones cerebrales, la RISP puede originar cambios celulares responsables de su efecto positivo sobre la memoria. Las mediciones de estas áreas mostraron que la RISP no altera el tamaño de la lesión del hipocampo, sin embargo, sigue siendo posible que la RISP altere la densidad neuronal, la estructura dendrítica, o la neurogénesis adulta del hipocampo de una manera favorable a los procesos mnésicos. En la CPF, la administración aguda de la RISP, así como de clozapina y olanzapina, provoca la liberación de acetilcolina (Ichikawa y cols., 2002) y facilita las respuestas excitatorias post-sinápticas (Ninan y cols., 2003). La RISP también provoca la liberación de 5-HT en la CPF (Cartmell y cols., 2001). Estos efectos, junto con las respuestas de excitación sináptica, pueden modular positivamente la función de memoria de trabajo en la CPF. Esta idea es indirectamente apoyada por trabajos clínicos que demuestran que

la RISP aumenta la actividad metabólica prefrontal en los pacientes esquizofrénicos cuando se dedican a una tarea de memoria de trabajo (Honey y cols., 1999).

También, se sabe que los antipsicóticos atípicos tienen una acción antagonista significativa en los receptores 5HT₂, y se ha sugerido que la interacción con estos receptores puede ser particularmente importante para la función cognitiva, y para la atenuación de los efectos del bloqueo de los receptores D₂. Una posibilidad es que el deterioro de las funciones ejecutivas motoras, y los síntomas negativos asociados con la esquizofrenia sean la consecuencia de la modulación excesiva por el receptor 5HT₂ de las funciones del lóbulo frontal (Kasper y Resinger, 2002). Hay pruebas que sugieren que algunos antipsicóticos atípicos pueden tener un efecto neuroprotector. Un estudio reciente con neurolépticos en pacientes en el primer episodio de esquizofrenia, informó de un aumento en el volumen de los ganglios basales y en el volumen de materia gris en los pacientes tratados con risperidona (Gencer y cols., 2008).

3. El estudio morfológico

El grosor cortical

El análisis que se llevó a cabo en este estudio, para la determinación de las posibles modificaciones en el grosor de la CPFM, no reveló diferencias significativas en ninguno de los niveles rostro-caudales

estudiados, ni en los animales LNHV ni en los falsos lesionados, con o sin tratamiento. Sin embargo, aunque estas diferencias no son significativas, se observó una tendencia de los animales LNHV a mostrar un grosor cortical ligeramente mayor al de los animales falsos lesionados. También, en el caso de los animales tratados con la RISP, se observó que la RISP tendía a reducir el grosor de la CPFM de los animales LNHV, mientras que se observaba una tendencia contraria en los animales falsos lesionados, mostrando que la RISP tendió a aumentar el grosor de la CPFM, en comparación con los animales falsos lesionados.

Un trabajo reciente de nuestro laboratorio que se llevo a cabo con ratas sanas, tampoco mostró diferencias en el grosor de la CPFM, en niveles rostro-caudales similares a los elegidos en nuestro estudio, de las ratas sanas tratadas con RISP (1 mg/kh/día), en comparación con las ratas controles (Castellano y cols., 2009).

Estudios clínicos previos, mostraron que la administración de la RISP aumentó el volumen de la materia gris cortical, pero sólo en los pacientes esquizofrénicos que previamente han mostrado un déficit en esta región cerebral (Molina y cols., 2005; Pratt y cols., 2008). Estos hallazgos dejan pensar que el cambio de volumen de la materia gris cortical inducido por la RISP es dependiente de algún tipo de déficit basal en esa zona (Castellano y cols., 2009).

Otros estudios longitudinales *in vivo* en humanos mostraron que los antipsicóticos típicos, producen un incremento significativo del

volumen de los ganglios basales (Chakos y cols., 1994; Keshavan y cols., 1994) y la reducción del volumen de la materia gris en varias subregiones corticales (Dazzan y cols., 2005; Lieberman y cols., 2005). Cambios del volumen de la materia gris en regiones corticales específicas (p.e., el planum polare del giro temporal superior, corteza cingulada anterior y la ínsula) han sido correlacionados con el tratamiento crónico con antipsicóticos típicos (Crespo-Facorro y cols., 2004; McCormick y cols., 2005 y Pressler y cols., 2005).

Otros cambios morfológicos han sido atribuidos a los antipsicóticos atípicos, como es el caso del alargamiento del tálamo (Dazzan y cols., 2005) y el aumento del volumen de la materia gris cortical (Garver y cols., 2005). En el estudio de Bartzokis y cols. se demostró que la RISP puede tener un efecto diferencial sobre la mielinización cerebral, dando lugar a un mayor volumen de la materia blanca (Bartzokis y cols. (2007). Sin embargo, todavía existen discrepancias considerables entre los resultados relativos a los efectos de los antipsicóticos en la morfología cerebral. Esta falta de consenso puede tener diferentes orígenes, como es el caso de las diferencias entre las formas y vías de administración del antipsicótico, de las dosis, y –de las limitaciones metodológicas (diseño experimental, las herramientas utilizadas, tamaño de muestra, etc) (Scherk y Falkai, 2006).

El recuento celular

Teniendo en cuenta que no se observaron modificaciones en el grosor cortical, tampoco debíamos esperar cambios en el número de células.

El recuento celular de la zona central de la región prelímbica de la CPFM realizado en preparaciones inmunoteñidas con GFAP, PV y CBP y c-Fos, no muestra diferencias entre el número de células observadas en los animales LNHV y falsos lesionados. El tratamiento con la RISP tiende a incrementar el número de células contadas tanto en los animales LNHV como en falsos lesionados, aunque la diferencia no resulta estadísticamente significativa en ninguno de estos grupos.

Estos resultados, presentan un cierto paralelismo con los obtenidos en el grosor cortical,.

GFAP

Para el recuento celular hemos elegido varios marcadores que puedan proporcionar una información detallada sobre cualquier modificación producida en la CPF por la LNHV y por la administración de RISP. Así, con el empleo de anti-GFAP se estudió la población astrocitaria, y teniendo en cuenta las hipótesis recientes sobre la implicación glial en la etiopatogenia de la esquizofrenia, es interesante conocer si existe alguna variación cuantitativa, al menos, en la población de los astrocitos. Sin embargo, no se detectaron alteraciones numéricas en esta población ni por la LNHV, ni por el tratamiento con la RISP.

Estudios clínicos mostraron que la GFAP, el marcador de la activación astrogliar, está significativamente reducida en los sujetos con esquizofrenia (Rajkowska y cols., 2002; Toro y cols., 2006), y otros trastornos psiquiátricos como la depresión mayor (Fatemi y cols., 2004; Webster y cols., 2001); y el trastorno bipolar (Toro y cols., 2006; Webster y cols., 2005). Se ha visto también que la GFAP está reducida en la corteza cingulada anterior y la CPF de los pacientes con esquizofrenia y con trastorno bipolar (Toro y cols., 2006). Estos últimos investigadores, además propusieron que el aumento de GFAP en la corteza prefrontal dorsolateral de sujetos con esquizofrenia estaba correlacionada con la duración de tratamiento con fármacos antipsicóticos (Toro y cols., 2006).

En este sentido, otros estudios *postmortem* en humanos sobre el papel de los astrocitos en la esquizofrenia, mostraron una alteración en la densidad en la mayoría de las regiones cerebrales implicada en la fisiopatología de la esquizofrenia, como es el caso de la CPF, la corteza cingulada anterior y la corteza motriz. (Stark y cols., 2004; Cotter y cols., 2002; Cotter y cols., 2001; Benes y cols., 1986).

El estudio de Selemon y cols. (1999) mostró que la administración crónica de 6 antipsicóticos típicos y atípicos, incluso la RISP, aumentó la densidad glial en la CPF de los primates, al contrario de la densidad neuronal. Resultados similares fueron obtenidos en los pacientes mayores con esquizofrenia, en que se observó una gliosis marcada después de una administración a largo plazo de la RISP (Arnold y cols., 1996).

Esta proliferación glial producida por estos antipsicóticos podría ser inducida por estímulo D2, ya que observaron en los mismos animales, un aumento de los niveles corticales del ARNm D2. Resultados similares, mostraron también un aumento de los niveles de D2 en la CPF y la corteza temporal (Lindow y Goldman, 1997; Lindow y cols., 1997). Otra hipótesis se basa en el hecho de que los astrocitos poseen receptores y sitios de recaptación de los neurotransmisores glutamatérgicos (Pellerin y Magistretti, 1996; Rothstein y cols., 1994), y es posible que la transmisión glutamatérgica en la CPF tenga un impacto mayor sobre la morfología y el número de las células gliales. Al contrario de estos datos, otro estudio mostró que la clozapina, un antipsicótico atípico con propiedades similares a las de la RISP, redujo la expresión cortical de la GFAP en la CPF de ratas sanas (Fatemi y cols., 2008). Sin embargo, otros investigadores no obtuvieron cambios significativos en la expresión de la GFAP en la CPF de ratas tratadas con la haloperidol (Steffek y cols., 2008; Dean y cols., 2006). Todos estos datos están de acuerdo que la densidad cortical de los astrocitos, o la expresión de las moléculas astrocíticas como la GFAP pueden ser moduladas con los antipsicóticos.

CaBP y PV

El uso de la CBP y la PV se justificó teniendo en cuenta que estos marcadores son indicadores del estado de los mecanismos de regulación de la entrada y el uso del calcio en la célula y, sobre todo, que ambas

sustancias pueden ser utilizadas como marcadores de subpoblaciones específicas de las interneuronas GABAérgicas corticales, que pueden ser afectadas en la esquizofrenia (Benes y Berretta, 2001).

Nuestros resultados no mostraron cambios en los números de neuronas inmunoreactivas a ambos marcadores entre los grupos animales estudiados, tanto tratados como sin tratamiento. De esta manera, parece que la lesión y el tratamiento con la RISP no parecen producir cambios cuantitativos en las neuronas GABAérgicas de la CPFM.

Estudios previos, al contrario de nuestros resultados, indicaron que los animales LNHV presentaron una disminución de la transmisión GABAérgica cortical, que podría contribuir a la hiperexcitación de la CPF y a la elevada actividad metabólica observadas en estos animales (Tseng y cols., 2007; Tseng y cols., 2006; Goto y O'Donnell, 2004; O'Donnell y cols., 2002). Es posible que la inactivación temprana del hipocampo altere la maduración postnatal de las interneuronas inhibitorias en la CPF, y por consecuencia, generar una respuesta prefrontal mesocortical exagerada (Tseng y cols., 2006; O'Donnell y cols., 2002), que podrían reflejar una alteración del desarrollo de la modulación GABAérgicas prefrontal por la DA (Tseng y cols., 2008). Estos cambios pueden resultar de una reducción de la inhibición local en la interacción GABA-D2, y de una potenciación anormal de las respuestas D1 y NMDA, que normalmente maduran durante la adolescencia (Tseng y O'Donnell, 2007; Tseng y cols., 2007; Tseng y O'Donnell, 2005). Así de este modo, los mecanismos

subyacentes a la mediación de la hipofrontalidad en la esquizofrenia pueden estar asociados con una reducción de la función GABAérgica cortical concomitante con una alteración de la modulación de DA mesocortical de la transmisión glutamatérgica prefrontal (Tseng y cols., 2008).

En consecuencia, la característica del estado prefrontal hiperactivo y hipofuncional observado en las ratas LNHV (Tseng y cols., 2006; Goto y O'Donnell, 2002), podría reflejar una alteración post-natal de la regulación por la DA de la función GABAérgica prefrontal, que madura, como lo hemos indicado antes, en la adolescencia (Tseng y O'Donnell, 2007). Aunque esta hipótesis aún no se ha examinado, estos cambios podrían, en parte, ser la base del déficit cognitivo de los animales NVHL mediante una coordinación inadecuada entre las neuronas piramidales y las interneuronas GABAérgicas, que a su vez, podría alterar la selectividad espacial de las respuestas neuronales prefrontal a las proyecciones excitatorias entrantes.

En este mismo sentido, también se mostró que la expresión del ARNm de la GAD-67 disminuyó en la PFC y la corteza prelimbica pero no en el cuerpo estriado, el núcleo accumbens, sustancia negra, o la ATV de ratas LNHV adultas (Lipska y cols., 2003a , 2003b). Se ha sugerido que la disminución del ARNm GAD-67 en los animales NVHL puede ser causada por una estimulación reducida del receptor NMDA vía las proyecciones glutamatérgico originarias del hipocampo ventral o una reducción de la

actividad de las proyecciones dopaminérgicas del ATV (Lipska y cols., 2003a). En un nivel más proximal, la disfunción GABAérgica en la esquizofrenia puede ser causada por la hipermetilación de las citosinas en la región del promotor de la GAD-67 (Costa y cols., 2003), un mecanismo epigenético de silenciamiento génico (Szyf y Detich, 2001).

Estudios clínicos, mostraron un aumento de los receptores GABAérgicos en la CPF de los pacientes esquizofrénicos (Benes y cols., 1996; Hanada y cols., 1987). Este aumento de los receptores se interpretó como consecuencia de una regulación compensatoria al alza post-sináptica de los receptores, debido a la pérdida de las interneuronas GABAérgicas en esta región (Benes y cols., 1996; Lewis y cols., 2005). Otros estudios mostraron también una alteración de la transmisión GABAérgica en varias regiones cerebrales, como el hipocampo (Benes y cols., 1996; Reynolds y cols., 1990) y la CPF (Silva-Gomez y cols., 2003; Benes y cols., 1991). La densidad cortical (Beasley y cols., 2002) y la expresión del ARNm por neurona (Hashimoto y cols., 2003) de la PV que conteniendo el subtipo de las neuronas GABA resultaron ser reducidos en la CPF de los pacientes esquizofrénicos en comparación con los controles, con una disminución asociada en la densidad de neuronas que contienen la enzima de la síntesis del GABA, Glutámico ácido-decarboxilasa (GAD67) (Hashimoto y cols., 2003).

En cuanto al efecto de la RISP, no existen estudios en este modelo animal, sobre el efecto del fármaco sobre las interneuronas

GABAérgicas, lo que dificulta la tarea de comparar e interpretar nuestros resultados. En animales sanos, un estudio reciente de nuestro laboratorio, mostró también que los números de estas neuronas GABAérgicas de la CPFM no cambió entre los animales sanos tratados con la RISP (0,1 mg/kg/día) y los controles (Castellano y cols., 2009).

c-Fos

La expresión del c-Fos en el cerebro ha sido utilizada como marcador de activación neuronal (Herrera y Robertson, 1996). Varios estímulos fisiológicos o farmacológicos pueden inducir la expresión del c-Fos (Sagar y cols., 1988; Herrera y Robertson, 1996; Hughes y Dragunow, 1995), cuya activación requiere altos niveles de actividad sináptica (Sgambato y cols., 1997).

Un estudio reciente de Dai-Ying y cols mostró que la clozapina redujo significativamente la expresión de la proteína c-Fos inducida por MK-801, un antagonista de los receptores NMDA, posiblemente vía atenuación del aumento de la actividad sináptica cerebral inducida por MK-801 (Dai-Ying y cols., 2008). Estudios similares mostraron también que la clozapina y la olanzapina, fueron más eficaces que los antipsicóticos típicos, en el tratamiento de las disfunciones positivas, negativas y cognitivas de la esquizofrenia (Ashby y Wang, 1996; Sharma y Mockler, 1998), bloquean también los cambios neuropatológicos causados por MK-801 en la rata (Farber y cols., 1996).

De este modo, la expresión del c-Fos ha sido utilizada para estudiar las regiones cerebrales activadas por los antipsicóticos atípicos (Zuo y cols., 2009; Scherk y Falkai, 2006; Dazzan y cols., 2005). Incluso, es posible diferenciar entre los antipsicóticos típicos y atípicos refiriéndose a su patrón de expresión Fos (Feldon y cols., 2001), y este es uno de los campos más estudiados en la morfología experimental, aunque los resultados no han sido siempre concluyentes (Murphy y Semba, 1996).

Estos estudios muestran que la expresión del c-Fos, puede constituir una herramienta de interés para el estudio del efecto de los antipsicóticos en los modelos animales de esquizofrenia. Por esta razón, hemos utilizado este marcaje para detectar posibles déficits en la activación neuronal cortical que puede causar la lesión hipocampal a la edad adulta de los animales, y evaluar después la posible reversión de estos déficits por el tratamiento con la RISP. Sin embargo, nuestros resultados no mostraron cambios demostrables en la activación neuronal de los animales LNHV, y tampoco el tratamiento tuvo efecto significativo ni en los animales lesionados, ni en los falsos lesionados. Una posible explicación de estos últimos resultados puede tener relación con el mecanismo de tolerancia a la RISP a través de su antagonismo prolongado frente a los receptores D2 y 5HT, lo que impide cambios en la activación neuronal mediada por el gen c-Fos (Natesan y cols 2006; Robertson y Fibiger, 1992).

Un estudio reciente de nuestro laboratorio, tampoco logró obtener diferencias en la expresión c-Fos cortical de las ratas sanas tratados crónicamente con la RISP (1 mg/kh/día), en comparación con los animales controles (Castellano y cols., 2009). Otros estudios, sin embargo, mostraron que la administración aguda de la RISP y otros fármacos atípicos, induce un aumento en el número de neuronas Fos-inmunoreactivas en la PFCM y también en el NAcc, y en menor medida, en el núcleo estriado (Wang y cols., 2004; MacGibbon y cols., 1994), lo que podría mostrar una cierta eficacia de los antipsicóticos atípicos sobre los síntomas de la esquizofrenia (Oka y cols., 2004).

De manera general, estos datos, muestran la diferencia entre los estudios, en cuanto a la inducción o no del cFos por los antipsicóticos atípicos en ciertas regiones cerebrales, pero parece que esta activación es dependiente de los factores de administración del fármaco, como la duración y la dosis.

4. Efecto de la risperidona sobre la adiposidad

La asociación entre antipsicóticos atípicos y el aumento de peso y la aparición de complicaciones metabólicas que aumentan el riesgo cardiovascular y la mortalidad, ha sido ampliamente puesta de manifiesto, aunque mostrando diferencias en probabilidad y magnitud según el fármaco utilizado y según el paciente (Daumit y cols., 2008). La risperidona se ha clasificado como un antipsicótico atípico de riesgo

metabólico medio. El perfil receptorial de risperidona, como el del resto de antipsicóticos, condiciona las alteraciones metabólicas inducidas por el tratamiento (Richelson, 1999).

Hemos constatado en nuestros animales un aumento de la adiposidad inducida por el tratamiento crónico con risperidona, siendo éste uno de los mecanismos que puede alterar distintos procesos metabólicos. El aumento de peso parece guardar relación principalmente con la afinidad de Risperidona para bloquear los receptores H1 y en menor medida los receptores 5HT-2 (Kroeze y cols., 2003; Wirshing y cols., 1999; Zipursky y cols., 2005)).

En nuestro estudio, la curva ponderal de los animales tratados con risperidona ha mostrado aumentos de peso mayores que la de los animales no tratados.

RIS aumenta el peso corporal, especialmente a expensas de un incremento en la masa grasa. Hemos encontrado un aumento en el peso de los paquetes grasos perirrenales, y epididimarios, en las ratas tratadas con risperidona, que no se corresponde con un aumento en el número de adipocitos, por lo que puede considerarse como un incremento hiperplásico del tejido adiposo. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores (Baptista et al., 2004), aunque con distintas dosis y períodos de administración de la risperidona. En otros casos puede observarse aumento de adiposidad en ausencia de aumento de peso

inducido por antipsicóticos (Cooper et al., 2007), lo que sugeriría un efecto directo del fármaco sobre los adipositos (Minet-Ringuet et al., 2007).

Aunque clásicamente ha sido difícil observar un incremento de masa grasa inducido por antipsicóticos en las ratas macho (Baptista et al., 2002; Lin et al., 2006; Pouzet et al., 2003), otros estudios (Ota et al. 2002) si han podido describir incrementos dosis dependientes de la adiposidad en ratas de este sexo que recibían RISP, posiblemente debido a modificaciones en los protocolos de estudio.

En estudios realizados en ratas Wistar hembras que recibían risperidona (Baptista y cols., 1987) de forma subcrónica, sólo éstas presentaban ganancia de peso con las dosis probadas, lo cual no ocurría en el caso de los machos. Es posible que en este caso el tiempo de administración o la dosis haya sido insuficiente para provocar incremento ponderal en las ratas macho.

En otro estudio en que se administraban antipsicóticos a una cepa diferente (Sprague–Dawley), sí se producían cambios en el peso dependientes de la dosis también en ratas macho (Ota y cols., 2002).

No se sabe cuál es el mecanismo subyacente a esta diferencia dependiente del sexo, aunque se ha relacionado con procesos de interacción del antipsicótico con hormonas femeninas (Baptista et al., 1998).

En general los resultados publicados sobre los efectos metabólicos de risperidona y otros antipsicóticos varían ampliamente, lo que puede ser

debido a la multiplicidad de diseños experimentales (dosis, duración del tratamiento, vía de administración, especies y cepas, género, etc..).

Habitualmente, en el hombre, los antipsicóticos atípicos tienden a actuar de forma significativa sobre el tejido adiposo, y a modificar el perfil lipídico produciendo dislipidemia. Además, el exceso de peso, parece ser el principal responsable del mayor riesgo de hipertrigliceridemia y dislipemia, originados por el uso de estos fármacos.

No hemos realizado estudios en la rata, sobre una posible dislipidemia originada por el antipsicótico, dadas las amplias diferencias entre el perfil lipídico en plasma de los animales frente a los humanos (Baptista et al., 1998)

Pero, así como en pacientes esquizofrénicos tratados con olanzapina queda patente la relación incremento de peso con hipertrigliceridemia e hiperleptinemia (Melkersson y cols., 2004), en adipocitos de ratas sometidas a tratamiento crónico con olanzapina, se ha descrito disminución de la actividad lipolítica, con alteraciones en la expresión de la lipasa hormono-sensible (LSH), aunque sin alteraciones de leptina (Minet-Ringuet y cols., 2007).

Algunos datos sugieren que los efectos metabólicos de los antipsicóticos podrían explicarse en parte por los efectos directos de estas drogas sobre los adipocitos (Yang y cols., 2009), y que estas diferencias

en el metabolismo celular, podrían explicar los efectos diferenciales de los distintos fármacos en la dislipidemia y la obesidad. Los antipsicóticos serían capaces de provocar acumulación de lípidos intracelulares estimulando la lipogénesis, inhibiendo la lipólisis en respuesta a un agente adrenérgico y aumentando la capacidad de la insulina para inhibir la lipólisis (Vestri y cols., 2007, Minet-Ringuel y cols., 2007), con la consecuencia de un mayor tamaño en los adipocitos. Estos efectos explicarían parcialmente las tasas de obesidad, y las diferencias en el riesgo de complicaciones metabólicas asociadas al uso de los diferentes antipsicóticos (Newcomer, 2005). En nuestro estudio, el análisis morfológico de los adipocitos ha determinado cambios en el tamaño de las células adiposas, que muestran un incremento en el área de los adipocitos provenientes de ratas tratadas crónicamente con risperidona.

Curiosamente, la risperidona, un antipsicótico atípico de riesgo metabólico medio, es uno de los AP mas potentes para disminuir el transporte de glucosa estimulado por insulina en adipocitos primarios, a pesar de no alcanzar concentraciones elevadas en el tejido adiposo, y presentar un aclaramiento mas rápido que en otros tejidos (Aravagiri y cols., 1998). Este fármaco modifica en pacientes esquizofrénicos los niveles de triglicéridos y leptina, reduciendo los niveles de HDL (Murashita y cols., 2007).

Los receptores involucrados en las respuestas metabólicas de los antipsicóticos atípicos son fundamentalmente los adrenérgicos,

muscarínicos, histaminérgicos y dopamínicos. A nivel de la respuesta lipolítica, el proceso está regulado principalmente por receptores beta adrenérgicos acoplados a proteínas Gs, que estimulan la síntesis de AMPc al activar la adenilatociclasa, estimuladores de la lipólisis, y alfa-2 adrenérgicos inhibidores.

La administración crónica de risperidona parece modificar el comportamiento secretor de los adipocitos en menor medida que la lesión hipocampal responsable de nuestro modelo experimental.

La lipólisis basal disminuye significativamente en las ratas lesionadas frente a las falsas lesionadas, lo que podría relacionarse con una modificación metabólica en este modelo equiparable de alguna manera a los efectos metabólicos provocados por la propia esquizofrenia en los pacientes.

La lipólisis es estimulada significativamente, tanto por activadores de la adenil ciclasa como forskolina, como por el agonista beta isoprenalina, y esta respuesta no es modificada de forma significativa por la administración crónica de risperidona .

Los adipocitos mas grandes que hemos encontrado, podrían tener alterado el número de sus receptores adrenérgicos beta (aumentados), en comparación con los adipocitos de menor tamaño, procedentes de ratas control sin tratamiento antipsicótico, lo que podría conllevar una mayor capacidad lipolítica con un aumento de los ácidos grasos libres, extremo que hemos comprobado en ratas no sometidas a tratamiento antipsicótico

(datos no publicados). Esto podría interpretarse como un intento del propio tejido adiposo para facilitar su oxidación, con el objeto de disminuir su expansión exagerada y mantener el peso estable.

Hemos observado una mayor tasa de lipólisis basal en las ratas falsas lesionadas tratadas con risperidona frente a las no tratadas. Otros estudios con ratas controles no han podido encontrar modificaciones en la lipólisis basal tras la administración de risperidona (Vestri., 2007), aunque los resultados son difícilmente comparables por las diferencias en dosis y vías de administración.

Dentro de las ratas que han recibido risperidona durante 65 días, las lesionadas presentan una disminución significativa de la lipólisis basal frente a las falsas lesionadas. Esto podría significar que una alteración en el neurodesarrollo provoca profundas modificaciones en procesos fisiológicos, de forma paralela a las alteraciones metabólicas descritas en pacientes con esquizofrenia, y debidas a la propia enfermedad.

Y en paralelo observamos un efecto contrario de la administración aguda de los 3 antipsicóticos ensayados, que inhiben la lipólisis en las ratas falsas lesionadas, estimulándola en las lesionadas. En este caso los 3 antipsicóticos se comportan de forma similar.

Cuando usamos estimulantes lipolíticos como forskolina o isoprenalina, observamos que ambos evocan un aumento de la respuesta tanto en las ratas falsas lesionadas como en las lesionadas, siendo significativa la estimulación de la lipólisis en las lesionadas. Esta

diferencia puede responder a unos niveles basales muy reducidos en las ratas LNHV, que son fácilmente revertidos en presencia de un estímulo.

Cuando en las ratas falsas lesionadas intentamos modificar la respuesta lipolítica evocada por isoprenalina y forskolina, nos encontramos que sólo la administración aguda de haloperidol disminuye ligeramente la respuesta, la cual no se modifica en presencia de risperidona. Algo similar sucede en las ratas lesionadas, por lo que podemos inferir que los antipsicóticos no actúan en el proceso lipolítico a través de las vías puestas en marcha por isoprenalina o forskolina (beta-receptores, AMPc).

5. Expresión de receptores D₂ y 5-HT_{2A} en corteza e hipocampo

Los animales LNHV experimentaron un descenso drástico en los niveles de expresión cortical de los receptores D2 y 5-HT2A, mientras que en el hipocampo, sólo es significativo el descenso en la expresión de D2. Los niveles de expresión de 5-HT2A son muy variables en esta estructura, tendiendo a incrementar en relación a los falsos lesionados.

La expresión D2 disminuida en ratas lesionadas concuerda con el estado hiperdopaminérgico de este modelo animal de esquizofrenia, y sería secundario al neurodesarrollo alterado. Si se lesiona a la rata en la edad adulta, estos cambios en los receptores D2 no se producen

En ratas lesionadas, la expresión disminuida del mRNA D2 se ha descrito después de la pubertad (Al-Amin y cols., 2000).

La RISP incrementa también significativamente la expresión de los receptores D2 y 5-HT_{2A} en la corteza de los animales LNHVy la disminuye en los falsos lesionados. En el hipocampo, sin embargo, no se aprecia un efecto notable del fármaco en los animales LNHV sobre la expresión de D2 y 5-HT_{2A}; Sólo se encuentran cambios significativos en los falsos lesionados, donde disminuye significativamente la expresión del receptor D2 tras el tratamiento farmacológico.

Las vías serotoninérgicas y dopaminérgicas además de proyectar en áreas similares, presentan una amplia interacción funcional (Herve y cols., 1979; Vanderand Johnson, 1970; Broening y cols., 2005; Carey y cols.,, 2005; Alex y cols.,, 2005; Vollenweider y cols., 1999). Esto nos hace pensar que las alteraciones provocadas por la lesión deberían correlacionarse en la expresión receptorial de D2 y 5HT_{2A}.

Los receptores 5-HT_{2A} juegan un importante papel en la modulación de circuitos neuronales tanto en corteza cerebral como en hipocampo (Harvey, 2003). En la CPF, estos receptores se expresan postsinápticamente en células piramidales y otras neuronas (Xia y cols., 2003), y también se han implicado en la etiopatogenia de la esquizofrenia (Bleich y cols., 1988; Breier,1995; Roth y Meltzer, 1995; Abi-Dargham, 2007).

En humanos, los resultados son contradictorios, encontrándonos con estudios que observan un descenso en el ARNm del D2 en la CPF de los pacientes esquizofrenicos (Knable y cols., 2001), mientras que otro estudio mostró un incremento (Tallerico y cols., 2001).

La disfunción dopaminérgica en CPF se ha descrito como uno de los factores responsables de algunas manifestaciones comportamentales de la esquizofrenia (Weinberger 1987 and Willner 1997), y tendría su equivalente en las alteraciones descritas en las ratas LNHV.

Se sabe que el efecto terapéutico de la RISP está mediado por una combinación entre un antagonismo con una afinidad muy elevada por los receptores 5-HT_{2A}, y una ocupación parcial de los receptores D2 y que no es necesaria una elevada ocupación de los receptores dopaminérgicos D2 para el efecto antipsicótico de la RISP (Leysen y cols., 1993; Schotte y cols., 1996), lo que podría explicar nuestros resultados.

Podemos concluir que el modelo desarrollado, simula algunas deficiencias cognitivas y sensoriomotoras observado frecuentemente en los pacientes esquizofrénicos, y puede emplearse para validar diferentes tratamientos de neurolépticos. Al no existir diferencias morfológicas apreciables, hemos de ampliar el estudio de los cambios moleculares producidos para explicar la génesis de las alteraciones conductuales observadas.

VI – CONCLUSIONES

1. Hemos estandarizado en nuestro laboratorio el modelo de lesión neonatal del hipocampo ventral, uno de los modelos de esquizofrenia experimental más reconocido por la comunidad científica, que responde a los criterios de validez de los modelos animales de las enfermedades psiquiátricas.
2. Los animales lesionados no modifican la respuesta de sobresalto pero sí su inhibición por un estímulo previo en la edad adulta, que se ve disminuida.
3. Los animales lesionados muestran una mayor respuesta al estrés, mayor hiperactividad y una disminución drástica de los procesos de aprendizaje condicionado y de las respuestas motoras involuntarias.
4. La administración de la risperidona a una dosis de 2 mg/kg/día durante 65 días a partir del día 35 postnatal no produce cambios significativos en ninguno de los parámetros conductuales estudiados en los animales usados como controles.
5. La administración de risperidona a los animales lesionados incrementa la inhibición por estímulo previo y reduce su hiperactividad, aunque no mejora su mermada capacidad de aprendizaje.
6. Los animales lesionados mostraron un descenso en los receptores dopaminérgicos D₂ tanto en corteza prefrontal como en hipocampo, y un descenso de los serotoninérgicos 5-HT_{2A} en la corteza prefrontal, que revierten con la administración de risperidona.
7. Los animales lesionados presentan una significativa disminución de la lipólisis basal, que no se modifica por la administración crónica de risperidona.
8. La administración crónica de risperidona aumenta la tasa lipolítica en las ratas falsas lesionadas

VII – BIBLIOGRAFIA

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. *Behavioural Brain Research* 2007;169 (2): 263-73.

Abi-Dargham A. Alterations of serotonin transmission in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 2007;78:133-64. Review.

Addy N, Levin ED. Nicotine Interactions with Haloperidol, Clozapine and Risperidone and Working Memory Function in Rats. *Neuropsychopharmacology* 2002; 27(4):534-41.

Aguilar MA, Rodriguez-Arias M, Mari-Sanmillan MI, Minarro J. Effects of risperidone on conditioned avoidance responding in male mice. *Behav Pharmacol* 1997;8(8):669-676.

Ahlander M., Misane I., Schött P.A., Ögren S. O.A Behavioral Analysis of the Spatial Learning Deficit Induced by the NMDA Receptor Antagonist MK-801 (Dizocilpine) in the Rat. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21(3):414-26.

Ahnaou A, Nayak A, Heylen A, Ashton D, Drinkenburg WH. Sleep and EEG profile in neonatal hippocampal lesion model of schizophrenia. *Physiol Behav.* 2007; in *presse*.

Aichhorn W, Weiss U, Marksteiner J, Kemmler G, Walch T, Zernig G, Stelzig-Schoeler R, Stuppaeck C, Geretsegger C. Influence of age and gender on risperidone plasma concentrations. *J Psychopharmacol* 2005;19(4):395-401.

Akbarian S, Sucher NJ, Bradley D, Tafazzoli A, Trinh D, Hetrick WP, Potkin SG, Sandman CA, Bunney WE, Jr., Jones EG. Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. *J Neurosci* 1996;16(1):19-30.

Al-Amin HA, Shannon WC, Weinberger DR, Lipska BK. Delayed onset of enhanced MK-801-induced motor hyperactivity after neonatal lesions of the rat ventral hippocampus. *Biol Psychiatry* 2001;49:528-39.

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: 269-278.

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: 269-278.

Alex KD, Yavarian GJ, McFarlane HG, Pluto CP, Pehek EA. Modulation of dopamine release by striatal 5-HT_{2C} receptors. *Synapse* 2005;55(4):242-51.

Alquicer G, Silva-Gomez AB, Peralta F, Flores G. Neonatal ventral hippocampus lesion alters the dopamine content in the limbic regions in postpubertal rats. *Int J Devl Neuroscience.* 2004; 22 : 103-111.

Alquicer G, Silva-Gomez AB, Peralta F, Flores G. Neonatal ventral hippocampus lesion alters the dopamine content in the limbic regions in postpubertal rats. *Int J Devl Neuroscience.* 2004; 22 : 103-111.

Angelucci F, Aloe L, Iannitelli A, Gruber SH, Mathe AA. Effect of chronic olanzapine treatment on nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 2005;15(3):311-317.

Angst MJ, Macedo CE, Guiberteau T, Sandner G. Alteration of conditioned emotional response and conditioned taste aversion after neonatal ventral hippocampus lesions in rats. *Brain Res.* 2007; 1143: 183-192.

Angst MJ, Macedo CE, Guiberteau T, Sandner G. Alteration of conditioned emotional response and conditioned taste aversion after neonatal ventral hippocampus lesions in rats. *Brain Res.* 2007; 1143: 183-192.

Aparicio-Legarza MI, Cutts AJ, Davis B, Reynolds GP. Deficits of [³H]D-aspartate binding to glutamate uptake sites in striatal and accumbens tissue in patients with schizophrenia. *Neuroscience Letters* 1997; 232(1), 13-16.

Arguello PA, Gogos JA. Modeling madness in mice: one piece at a time. *Neuron* 2006;52:179-196.

Arnold SE, Franz BR, Trojanowski JQ, Moberg PJ, Gur RE. Glial fibrillary acidic protein-immunoreactive astrocytosis in elderly patients with schizophrenia and dementia. *Acta Neuropathol (Berl)* 1996;91: 269–277.

Ashby Jr CR, Wang RY. Pharmacological actions of the atypical antipsychotic

drug clozapine. *Synapse* 1996;24: 349–394. Review.

Bakshi VP, Geyer MA. Alpha-1-adrenergic receptors mediate sensorimotor gating deficits produced by intracerebraldizocilpine administration in rats. *Neuroscience* 1999;92(1):113-21.

Bakshi VP, Geyer MA. Antagonism of phencyclidine-induced deficits in prepulse inhibition by the putative atypical antipsychotic olanzapine. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;122(2):198-201.

Bakshi VP, Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA. Reversal of Isolation Rearing-Induced Deficits in Prepulse Inhibition by Seroquel and Olanzapine. *Biological Psychiatry* 1998;43(6):436-45.

Bakshi VP, Swerdlow NR, Geyer MA. Clozapine antagonizes phencyclidine-induced deficits in sensorimotor gating of the startle response. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271:787-94.

Bannerman DM, Deacon RMJ, Offen S, Friswell J, Grubb M, Rawlins JNP. Double Dissociation of Function Within the Hippocampus: Spatial Memory and Hyponeophagia. *Behavioral Neuroscience*. 2002;116(5):884-901.

Bannerman DM, Grubb M, Deacon RMJ, Yee BK, Feldon J, Rawlins JNP. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behavioural Brain Research* 2003;139(1-2):197-213.

Bardgett ME, Baum KT, O'Connell SM, Lee NM, Hon JC. Effects of risperidone on locomotor activity and spatial memory in rats with hippocampal damage. *Neuropharmacology* 2006;51(7-8):1156-62.

Barth VN, Chernet E, Martin LJ, Need AB, Rash KS, Morin M, Phebus LA. Comparison of rat dopamine D2 receptor occupancy for a series of antipsychotic drugs measured using radiolabeled or nonlabeled raclopride tracer. *Life Sciences* 2006;78(26):3007-12.

Bartzokis G, Lu PH, Nuechterlein KH, Gitlin M, Doi C, Edwards N, Lieu C, Altshuler LL, Mintz J. Differential effects of typical and atypical antipsychotics on brain myelination in schizophrenia. *Schizophr Res* 2007;93(1-3):13-22.

Baudrie V, Tulen JH, Blanc J, Elghozi JL. 1997. Autonomic components of the

cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. *J Auton Pharmacol* 17(5):303-309.

Baudrie V, Tulen JH, Blanc J, Elghozi JL. Autonomic components of the cardiovascular responses to an acoustic startle stimulus in rats. *J Auton Pharmacol* 1997;17(5):303-309.

Baudry M, Arst D, Oliver M, Lynch G. Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus. *Brain Res.* 1981; 227: 37-48.

Baudry M, Arst D, Oliver M, Lynch G. Development of glutamate binding sites and their regulation by calcium in rat hippocampus. *Brain Res.* 1981; 227: 37-48.

Bayer SA. development of the hippocampal region in the rat II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. *J Comp Neurol* 1980; 190: 87-114.

Beasley CL, Zhang ZJ, Patten I, Reynolds GP. Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium-binding proteins. *Biol Psychiatry* 2002;52:708-15.

Becker A, Grecksch G, Bernstein HG, Höllt V, Bogerts B. Social behaviour in rats lesioned with ibotenic acid in the hippocampus : quantitative and qualitative analysis. *Psychopharmacology.* 1999; 144: 333-338.

Becker A, Grecksch G, Bernstein HG, Höllt V, Bogerts B. Social behaviour in rats lesioned with ibotenic acid in the hippocampus : quantitative and qualitative analysis. *Psychopharmacology.* 1999; 144: 333-338.

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

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

Becker A, Grecksch G. Social memory is impaired in neonatally ibotenic acid lesioned rats. *Behav Brain Res.* 2000; 109: 137-140.

Becker A, Grecksch G. Social memory is impaired in neonatally ibotenic acid

lesioned rats. *Behav Brain Res.* 2000; 109: 137-140.

Benes FM, Berretta S. GABAergic Interneurons: Implications for Understanding Schizophrenia and Bipolar Disorder. *Neuropsychopharmacology* 2001;25(1):1-27.

Benes FM, Davidson J, Bird ED. Quantitative cytoarchitectural studies of the cerebral cortex of schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry* 1986;43:31-35.

Benes FM, McSparren J, Bird ED, SanGiovanni JP, Vincent SL. Deficits in small interneurons in prefrontal and cingulate cortices of schizophrenic and schizoaffective patients. *Arch Gen Psychiatry* 1991;48(11):996- 001.

Benes FM, Vincent SL, Marie A, Khan Y. Up-regulation of GABA_A receptor binding on neurons of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects. *Neuroscience* 1996;75(4):1021-31.

Beninger RJ, Tuerke KJ, Forsyth JK, Giles A, Xue L, Boegman RJ, Jhamandas K. Neonatal ventral hippocampal lesions in male and female rats: Effects on water maze, locomotor activity, plus-maze and prefrontal cortical GABA and glutamate release in adulthood. *Behavioural Brain Research* 2009;202(2):198-209.

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

Bernstein HG, Grecksch G, Becker A, Höllt V, Bogerts B. Cellular changes in rat brain areas associated with neonatal hippocampal damage. *Neuroreport.* 1999; 10: 2307-2311.

Bernstein HG, Grecksch G, Becker A, Höllt V, Bogerts B. Cellular changes in rat brain areas associated with neonatal hippocampal damage. *Neuroreport.* 1999; 10: 2307-2311.

Bertolino A, Roffman JL, Lipska BK, van Gelderen P, Olson A, Weinberger DR. Reduced NAcetylaspartate in prefrontal cortex of adults rats with neonatal hippocampal damage. *Cerebral Cortex.* 2002; 12: 983-990.

Bertolino A, Roffman JL, Lipska BK, van Gelderen P, Olson A, Weinberger DR.

Reduced NAcetylaspartate in prefrontal cortex of adults rats with neonatal hippocampal damage. *Cerebral Cortex*. 2002; 12: 983-990.

Bilder RM, Goldman RS, Volavka J, Czobor P, Hoptman M, Sheitman B, Lindenmayer JP, Citrome L, McEvoy J, Kunz M, Chakos M, Cooper TB, Horowitz TL, Lieberman JA. Neurocognitive effects of clozapine, olanzapine, risperidone, and haloperidol in patients with chronic schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry* 2002;159(6):1018-28.

Bilder RM, Wu H, Chakos MH, Bogerts B, Pollack S, Aronowitz J, Ashtari M, Degreef G, Kane JM, Lieberman JA. Cerebral morphometry and clozapine treatment in schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 1994;55 Suppl B:53-56.

Black MD, Lister S, Hitchcock JM, Van Giersbergen P, Sorensen SM. Neonatal hippocampal lesion model of schizophrenia in rats: sex differences and persistence of effects into maturity. *Drug Dev Res* 1998;43: 206-213.

Blanchard RJ, Brain PF, Blanchard DC, Parmigiani S (Eds), Ethoexperimental Approaches to the Study of Behavior. Kluwer Academic Publishing, Kluwer, Dordrecht, Boston, London, pp. 580–594.

Bleich A, Brown SL, Kahn R, van Praag HM. The role of serotonin in schizophrenia. *Schizophr Bull* 1988;14(2):297-315. Review.

Bleuler E. Dementia praecox or the group of schizophrenias. New York, NY: *International Universities Press*, 1950.

Blois-Heulin C, Belzung C. Effects of previous familiarization on novelty reactions in mice (*Mus musculus*). *Behavioural Processes* 1995;34(3):197-212.

Bloom FE. Advancing a neurodevelopmental origin for schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1993;50:224-227.

Blumenthal TD, Schicatano EJ, Chapman JG, Norris CM, Ergenzinger ER, Jr. Prepulse effects on magnitude estimation of startle-eliciting stimuli and startle responses. *Percept Psychophys* 1996;58(1):73-80.

Blumenthal TD, Schicatano EJ, Chapman JG, Norris CM, Ergenzinger ER, Jr. Prepulse effects on magnitude estimation of startle-eliciting stimuli and startle responses. *Percept Psychophys* 1996;58(1):73-80.

Bogerts B. Limbic and paralimbic pathology in schizophrenia: interaction with age- and stress-related factors. In: Schizophrenia: Scientific Progress (Schultz SC, Tamminga CA, eds), *Oxford University Press* 1989;216-226.

Boissy A, Bouissou MF. Assessment of individual differences in behavioural reactions of heifers exposed to various fear-eliciting situations. *Applied Animal Behaviour Science* 1995;46(1-2):17-31.

Bolino F, Di Michele V, Di Cicco L, Manna V, Daneluzzo E, Casacchia M. Sensorimotor gating and habituation evoked by electro-cutaneous stimulation in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1994;36(10):670-9.

Bolino F, Manna V, Di Cicco L, Di Michele V, Daneluzzo E, Rossi A, Casacchia M. Startle reflex habituation in functional psychoses: a controlled study. *Neurosci Lett* 1992;145(2):126-8.

Braff D, Stone C, Callaway E, Geyer M, Glick I, Bali L. Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology* 1978;15(4):339-43.

Braff DL, Geyer MA, Light GA, Sprock J, Perry W, Cadenhead KS, Swerdlow NR. Impact of prepulse characteristics on the detection of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. *Schizophr Res* 2001;49(1-2):171-8.

Braff DL, Geyer MA. Sensorimotor gating and schizophrenia: Human and animal model studies. *Arch Gen Psychiat* 1990;47:181-188.

Braff DL, Grillon C, Geyer MA. Gating and habituation of the startle reflex in schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 1992;49(3):206-15.

Breier A. Serotonin, schizophrenia and antipsychotic drug action. *Schizophr Res* 1995;14(3):187-202. Review.

Brito GN, Brito LS. Septohippocampal system and the prelimbic sector of frontal cortex: a neuropsychological battery analysis in the rat. *Behav Brain Res* 1990;36(1-2):127-146.

Brito GN, Brito LS. Septohippocampal system and the prelimbic sector of frontal cortex: a neuropsychological battery analysis in the rat. *Behav Brain Res*

1990;36(1-2):127-46.

Broderick PA, Rahni DN, Zhou Y. Acute and subacute effects of risperidone and cocaine on accumbens dopamine and serotonin release using in vivo microvoltammetry on line with open-field behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27(6):1037-54.

Broening HW, Morford LL, Vorhees CV. Interactions of dopamine D1 and D2 receptor antagonists with D-methamphetamine-induced hyperthermia and striatal dopamine and serotonin reductions. *Synapse* 2005;56(2):84-93.

Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS. The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol*. 1993;338(2):255-78.

Bronzino JD, Ustin-LaFrance RJ, Morgane PJ, Galler JR. Effects of prenatal protein malnutrition on kindling-induced alterations in dentate granule cell excitability. I. Synaptic transmission measures. *Exp Neurol* 1991;112(2):206-215.

Brown AS, Susser ES, Butler PD, Richardson AR, Kaufmann CA, Gorman JM. Neurobiological plausibility of prenatal nutritional deprivation as a risk factor for schizophrenia. *J Nerv Ment Dis* 1996;184(2):71-85.

Brown JS, Kalish HI, Farber IE. Conditioned fear as revealed by magnitude of startle response to an auditory stimulus. *J Exp Psychol* 1951;41(5):317-328.

Brown P. 1995. Physiology of startle phenomena. *Adv Neurol* 67:273-287.

Brown P. Physiology of startle phenomena. *Adv Neurol* 1995;67:273-287.

Bubenikova-Valesova V, Stuchlik A, Svoboda J, Bures J, Vales K. Risperidone and ritanserin but not haloperidol block effect of dizocilpine on the active allothetic place avoidance task. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(3):1061-6.

Buchsbaum MS, Yang S, Hazlett E, Siegel BV, Jr., Germans M, Haznedar M, O'Flaithbheartaigh S, Wei T, Silverman J, Siever LJ. Ventricular volume and asymmetry in schizotypal personality disorder and schizophrenia assessed with magnetic resonance imaging. *Schizophr Res* 1997;27(1):45-53.

Buckland G, Buckland J, Jamieson C, Ison JR. Inhibition of startle response to acoustic stimulation produced by visual prestimulation. *J Comp Physiol Psychol* 1969;67(4):493-496.

Bymaster FP, Calligaro DO, Falcone JF, Marsh RD, Moore NA, Tye NC, Seeman P, Wong DT. Radio receptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacology* 1996;14(2):87-96.

Calatayud F, Belzung C. Emotional reactivity in mice, a case of non genetic heredity? *PhysiolBehav* 2001;74(3):355-62.

Cannon M, Jones P, Gilvarry C, Rifkin L, McKenzie K, Foerster A, Murray RM. Premorbid social functioning in schizophrenia and bipolar disorder: similarities and differences. *Am J Psychiatry* 1997;154:1544-1550.

Carey RJ, DePalma G, Damianopoulos E, Shanahan A, Müller CP, Huston JP. Pharmacological inhibition of DA- and 5-HT activity blocks spontaneous and cocaine-activated behavior: reversal by chronic cocaine treatment. *Brain Res* 2005;1047(2):194-204.

Carlsson M, Carlsson A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *TrendsNeurosci* 1990;13(7):272-6.

Carlsson, A. The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1988;1:179- 186.

Cartmell J, Perry KW, Salhoff CR, Monn JA, Schoepp DD. Acute increases in monoamine release in the rat prefrontal cortex by the Glu2/3 agonist LY379268 are similar in profile to risperidone, not locally mediated, and can be elicited in the presence of uptake blockade. *Neuropharmacology* 2001;40(7):847-55.

Chakos MH, Lieberman JA, Alvir J, Bilder R, Ashtari M. Caudate nuclei volumes in schizophrenic patients treated with typical antipsychotics or clozapine. *Lancet* 1995;345(8947):456-457.

Chakos MH, Lieberman JA, Alvir J, Bilder R, Ashtari M. Caudate nuclei volumes in schizophrenic patients treated with typical antipsychotics or clozapine. *Lancet* 1995;345(8947):456-57.

Chakos MH, Lieberman JA, Bilder RM, Borenstein M, Lerner G, Bogerts B, Wu H, Kinon B, Ashtari M. Increase in caudate nuclei volumes of first-episode schizophrenic patients taking antipsychotic drugs. *Am J Psychiatry* 1994;151(10):1430-1436.

Chambers RA, Jones RM, Brown S, Taylor JR. Natural reward-related learning in rats with neonatal ventral hippocampal lesions and prior cocaine exposure. *Psychopharmacology*. 2005; 179: 470-478.

Chambers RA, Jones RM, Brown S, Taylor JR. Natural reward-related learning in rats with neonatal ventral hippocampal lesions and prior cocaine exposure. *Psychopharmacology*. 2005; 179: 470-478.

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

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

Chambers RA, Self DW. Motivational responses to natural and drug rewards in rats with neonatal ventral hippocampal lesions : an animal model of dual diagnosis schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2002; 27: 889-905.

Chambers RA, Self DW. Motivational responses to natural and drug rewards in rats with neonatal ventral hippocampal lesions : an animal model of dual diagnosis schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 2002; 27: 889-905.

Chambers RA, Taylor JR. Animal modeling dual diagnosis schizophrenia: sensitization to cocaine in rats with neonatal ventral hippocampal lesions. *Biol Psychiatry*. 2004; 56: 308-316.

Chambers RA, Taylor JR. Animal modeling dual diagnosis schizophrenia: sensitization to cocaine in rats with neonatal ventral hippocampal lesions. *Biol Psychiatry*. 2004; 56: 308-316.

Conroy SK, Rodd Z, Chambers A. Ethanol sensitization in a neurodevelopmental lesion model of schizophrenia in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006; 86: 386-

394.

Conroy SK, Rodd Z, Chambers A. Ethanol sensitization in a neurodevelopmental lesion model of schizophrenia in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2006; 86: 386-394.

Corbett R, Camacho F, Woods AT, Kerman LL, Fishkin RJ, Brooks K, Dunn RW. Antipsychotic agents antagonize non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonist-induced behaviors. *Psychopharmacology (Berl)* 1995.

Cosi C, Waget A, Rollet K, Tesori V, Newman-Tancredi A. Clozapine, ziprasidone and aripiprazole but not haloperidol protect against kainic acid-induced lesion of the striatum in mice, in vivo: role of 5-HT_{1A} receptor activation. *Brain Res* 2005;1043(1-2):32-41.

Costa E, Grayson DR, Mitchell CP, Tremolizzo L, Veldic M, Guidotti A. GABAergic cortical neuron chromatin as a putative target to treat schizophrenia vulnerability. *Crit Rev Neurobiol* 2003;15(2):121-42. Review.

Cotter D, Landau S, Beasley C, Stevenson R, Chana G, MacMillan L, Everall I. The density and spatial distribution of GABAergic neurons, labelled using calcium binding proteins, in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2002;51(5):377-86.

Cotter DR, Pariante CM, Everall IP. Glial cell abnormalities in major psychiatric disorders: the evidence and implications. *Brain Res Bull* 2001;55(5):585-95. Review.

Crawley JN. Clarification of the behavioral functions of peripheral and central cholecystokinin: two separate peptide pools. *Peptides* 1985;6(2):129-36. Review.

Crespo-Facorro B, Nopoulos PC, Chemerinski E, Kim JJ, Andreasen NC, Magnotta V. Temporal pole morphology and psychopathology in males with schizophrenia. *Psychiatry Res* 2004;132(2):107-15.

Crow TJ, Ball J, Bloom SR, Brown R, Bruton CJ, Colter N, Frith CD, Johnstone EC, Owens DG, Roberts GW. Schizophrenia as an anomaly of development of cerebral asymmetry. A postmortem study and a proposal concerning the genetic basis of the disease. *Arch Gen Psychiatry* 1989;46:1145-50.

Crusio WE. Genetic dissection of mouse exploratory behaviour. *Behav Brain Res* 2001;125(1-2):127-32. Review.

Daenen EW, Wolterink G, Gerrits MA, Van Ree JM. Amygdala or ventral hippocampal lesions at two early stages of life differentially affect open field behaviour later in life; an animal model of neurodevelopmental psychopathological disorders. *Behav Brain Res* 2002;131:67-78.

Davis M, Gendelman DS, Tischler MD, Gendelman PM. A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies. *J Neurosci* 1982;2(6):791-805.

Dazzan P, Morgan KD, Orr K, Hutchinson G, Chitnis X, Suckling J, Fearon P, McGuire PK, Mallett RM, Jones PB, Leff J, Murray RM. Different effects of typical and atypical antipsychotics on grey matter in first episode psychosis: the AESOP study. *Neuropsychopharmacology* 2005;30(4):765-74.

Dean B, Pavey G, Thomas D, Scarr E. Cortical serotonin₇, 1D and 1F receptors: effects of schizophrenia, suicide and antipsychotic drug treatment. *Schizophr Res* 2006;88(1-3):265-74.

Deicken RF, Zhou L, Schuff N, Fein G, Weiner MW. Hippocampal neuronal dysfunction in schizophrenia as measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *Biol Psychiatry* 1998;43(7):483-488

Depoortere R, Perrault G, Sanger DJ. Some, but not all, antipsychotic drugs potentiate a low level of prepulse inhibition shown by rats of the Wistar strain. *Behav Pharmacol* 1997;8(4):364-72.

Desmond P, Bridle N, Tierney P, Murrie V, Singh B, Copolov D. Hippocampal volume in first-episode psychoses and chronic schizophrenia: a high-resolution magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry* 1999;56(2):133-141.

Drago F, Contarino A, Marino R, Anzallo C, Valerio C, Rampello L, Raffaele R, Scapagnini U. Effects of acute or chronic administration of risperidone on motor and sexual behavior of male rats. *Pharmacol Res* 1997;35(1):17-25.

Dubertret C, Gorwood P, Ades J, Feingold J, Schwartz JC, Sokoloff P. Meta-analysis of DRD3 gene and schizophrenia: ethnic heterogeneity and significant association in Caucasians. *Am J Med Genet* 1998;81:318-322.

Dunnett SB, Nathwani F, Brasted PJ. Medial prefrontal and neostriatal lesions disrupt performance in an operant delayed alternation task in rats. *Behav Brain Res* 1999;106(1-2):13-28.

Eilam D, Dank M, Maurer R. Voles scale locomotion to the size of the open-field by adjusting the distance between stops: a possible link to path integration. *Behav Brain Res* 2003;141(1):73-81.

Ellenbroek BA, van den Kroonenberg PT, Cools AR. The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophr Res* 1998;30(3):251-60.

Ellison Z, van Os J, Murray R. Special feature: childhood personality characteristics of schizophrenia: manifestations of, or risk factors for, the disorder? *J Personal Disord* 1998;12:247-61.

Endo K, Hori T, Abe S, Asada T. Alterations in GABA_A receptor expression in neonatal ventral hippocampal lesioned rats: comparison of prepubertal and postpubertal periods. *Synapse* 2007; 61: 357-366.

Falkai P, Tepest R, Schulze TG, Muller DJ, Rietschel M, Maier W, Traber F, Block W, Schild HH, Steinmetz H, Gaebel W, Honer WG, Schneider-Axmann T, Wagner M. Etiopathogenetic mechanisms in long-term course of schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* 37 Suppl 2004;2:S136-140.

Farber NB, Foster J, Duhan NL, Olney JW. Olanzapine and fluperlapine mimic clozapine in preventing MK-801 neurotoxicity. *Schizophr Res* 1996;21(1):33-7.

Fatemi SH, Emamian ES, Kist D, Sidwell RW, Nakajima K, Akhter P, Shier A, Sheikh S, Bailey K. Defective corticogenesis and reduction in Reelin immunoreactivity in cortex and hippocampus of prenatally infected neonatal mice. *Mol Psychiatry* 1999;4(2):145-154.

Fatemi SH, Folsom TD, Reutiman TJ, Pandian T, Braun NN, Haug K. Chronic psychotropic drug treatment causes differential expression of connexin 43 and GFAP in frontal cortex of rats. *Schizophr Res* 2008;104(1-3):127-34.

Fatemi SH, Laurence JA, Araghi-Niknam M, Stary JM, Schulz SC, Lee S, Gottesman II. Glial fibrillary acidic protein is reduced in cerebellum of subjects

with major depression, but not schizophrenia. *Schizophr Res* 2004;69(2-3):317-23.

Featherstone RE, Rizos Z, Nobrega JN, Kapur S, Fletcher PJ. Gestational methylazoxymethanol acetate treatment impairs select cognitive functions: parallels to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 2007;32(2):483-492.

Fendt M, Li L, Yeomans JS. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;156(2-3):216-224.

Fendt M, Li L, Yeomans JS. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;156(2-3):216-224.

Fendt M, Li L, Yeomans JS. Brain stem circuits mediating prepulse inhibition of the startle reflex. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;156(2-3):216-224.

Filion DL, Dawson ME, Schell AM. The psychological significance of human startle eyeblink modification: a review. *Biol Psychol* 1998;47(1):1-43.

Flores G, Alquicer G, Silva-Gomez AB, Stewart J, Quirion R, Srivastava LK. Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in post-pubertal rats alter neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Neuroscience*. 2005c; 133: 463-470.

Flores G, Alquicer G, Silva-Gomez AB, Stewart J, Quirion R, Srivastava LK. Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in post-pubertal rats alter neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Neuroscience*. 2005c; 133: 463-470.

Flores G, Barbeau D, Quirion R, Srivastava LK. Decreased binding of dopamine D3 receptors in limbic subregions after neonatal bilateral lesion of rat hippocampus. *J Neurosci*. 1996; 16: 2020-2026.

Flores G, Barbeau D, Quirion R, Srivastava LK. Decreased binding of dopamine D3 receptors in limbic subregions after neonatal bilateral lesion of rat hippocampus. *J Neurosci*. 1996; 16: 2020-2026.

Flores G, Silva-Gómez AB, Barbeau D, Srivastava LK, Zamudio S, De La Cruz López F. Effect of excitotoxic lesions of the neonatal ventral hippocampus on the immobility response in rats. *Life Sci* 2005;76(20):2339-48.

Flores G, Silva-Gomez AB, Bardeau D, Srivastava LK, Zamudio S, Fidel De La Cruz L. Effect of excitotoxic lesions of the neonatal ventral hippocampus on the immobility response in rats. *Life Sci.* 2005a; 76: 2339-2348.

Flores G, Silva-Gomez AB, Bardeau D, Srivastava LK, Zamudio S, Fidel De La Cruz L. Effect of excitotoxic lesions of the neonatal ventral hippocampus on the immobility response in rats. *Life Sci.* 2005a; 76: 2339-2348.

Flores G, Silva-Gomez AB, Ibanez O, Quirion R, Srivastava LK. Comparative behavioural changes in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the neonatal ventral hippocampus and the prefrontal cortex. *Synapse.* 2005b; 147-153.

Flores G, Silva-Gomez AB, Ibanez O, Quirion R, Srivastava LK. Comparative behavioural changes in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the neonatal ventral hippocampus and the prefrontal cortex. *Synapse.* 2005b; 147-153.

Fritts ME, Asbury ET, Horton JE, Isaac WL. Medial prefrontal lesion deficits involving or sparing the prelimbic area in the rat. *Physiol Behav* 1998; 64(3):373-380.

Fuchs A, Martin JR, Bender R, Harting J. Avoidance acquisition in adult and senescent rats. *Gerontology* 1986;32(2):91-97.

Fumagalli F, Molteni R, Bedogni F, Gennarelli M, Perez J, Racagni G, Riva MA. Quetiapine regulates FGF-2 and BDNF expression in the hippocampus of animals treated with MK-801. *Neuroreport* 2004;15(13):2109-2112.

Gao LL, Jing BB, Hong QH, Su Zhang, Chang-qi H. Metabolites and the pharmacokinetics of kobophenol A from *Caragana sinica* in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 2005;101(1-3):324-329.

Gao XM, Hashimoto T, Cooper TB, Tamminga CA. The dose-response characteristics of rat oral dyskinesias with chronic haloperidol or clozapine administration. *J Neural Transm* 1997;104(1):97-104.

Garner B, Wood SJ, Pantelis C, van den BM. Early maternal deprivation reduces

prepulse inhibition and impairs spatial learning ability in adulthood: No further effect of post-pubertal chronic corticosterone treatment. *Behav Brain Res* 2007;176(2):323-332.

Garver DL, Holcomb JA, Christensen JD. Cerebral cortical gray expansion associated with two second-generation antipsychotics. *Biol Psychiatry* 2005;58(1):62-6.

Gemperle AY, McAllister KH, Olpe HR. Differential effects of iloperidone, clozapine, and haloperidol on working memory of rats in the delayed non-matching-to-position paradigm. *Psychopharmacology (Berl)* 2003;169(3-4):354-64.

Gerrits MA, Wolterink G, van Ree JM. Cerebral metabolic consequences in the adult brain alter neonatal excitotoxic lesions of the amygdala in rats. *Eur Neuropsychopharmacology*. 2005; 16: 358-365.

Gerrits MA, Wolterink G, van Ree JM. Cerebral metabolic consequences in the adult brain alter neonatal excitotoxic lesions of the amygdala in rats. *Eur Neuropsychopharmacology*. 2005; 16: 358-365.

Gewirtz JC, Davis M. Habituation of prepulse inhibition of the startle reflex using an auditory prepulse close to background noise. *Behav Neurosci* 1995;109(3):388-395.

Geyer MA, Braff DL. Startle habituation and sensorimotor gating in schizophrenia and related animal models. *Schizophr Bull* 1987;13(4):643-668.

Davis M. Pharmacological and anatomical analysis of fear conditioning. *NIDA Res Monogr* 1990;97:126-162.

Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;156(2-3):117-154.

Geyer MA, Wilkinson LS, Humby T, Robbins TW. Isolation rearing of rats produces a deficit in prepulse inhibition of acoustic startle similar to that in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1993;34: 361-372.

Goldman PS. Functional development of the prefrontal cortex in early life and the

problem of neuronal plasticity. *Exp Neurol* 1971;32:366-387.

Gomes-Moscoso A, Castellano Benítez OJ, López García, DE. Administración crónica de Risperidona a ratas sanas. Efectos conductuales y morfológicos. In Gomes-Moscoso (Ediciones Universidad de Salamanca). Salamanca; 2009. ISBN: 978-84-613-1259-7.

Goto Y, O'Donnell P. Delayed mesolimbic system alteration in a developmental animal model of schizophrenia. *J Neurosci* 2002; 22: 9070-9077.

Goto Y, O'Donnell P. Prefrontal lesion reverses abnormal meso accumbens response in an animal model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2004; 55: 172-176.

Graham FK. 1975. Presidential Address, The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology* 1974;12(3):238-248.

Graham FK. 1975. Presidential Address, The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology* 1974;12(3):238-248.

Graham FK. 1975. Presidential Address, The more or less startling effects of weak prestimulation. *Psychophysiology* 1974;12(3):238-248.

Graham FK. Distinguishing among orienting, defense, and startle reflexes. Kimmel HD, van Olst EH, Orlebeke JF (Eds) The orienting reflex in humans. Erlbaum, New York, 1979;137-167.

Graham FK. Distinguishing among orienting, defense, and startle reflexes. Kimmel HD, van Olst EH, Orlebeke JF (Eds) The orienting reflex in humans. Erlbaum, New York, 1979;137-167.

Grecksch G, Bernstein HG, Becker A, Höllt V, Bogerts B. Disruption of latent inhibition in rats with postnatal hippocampal lesions. *Neuropsychopharmacology* 1999;20(6):525-32.

Grecksh G, Bernstein HG, Becker A, Höllt V, Bogerts B. Disruption of latent inhibition in rats with postnatal hippocampal damage. *Neuropsychopharmacology*. 1999; 20: 525-532.

Grecksh G, Bernstein HG, Becker A, Höllt V, Bogerts B. Disruption of latent

inhibition in rats with postnatal hippocampal damage. *Neuropsychopharmacology*. 1999; 20: 525-532.

Green MF, Marshall BD Jr, Wirshing WC, Ames D, Marder SR, McGurk S, Kern RS, Mintz J. Does risperidone improve verbal working memory in treatment-resistant schizophrenia? *Am J Psychiatry* 1997;154(6):799-804.

Grillon C, Ameli R, Charney DS, Krystal J, Braff D. Startle gating deficits occur across prepulse intensities in schizophrenic patients. *Biol Psychiatry* 1992;32(10):939-43.

Grillon C, Sinha R, O'Malley SS. Effects of ethanol on the acoustic startle reflex in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 1994;114(1):167-171.

Groenewegen HJ, Vermeulen-Van der Zee E, te Kortschot A, Witter MP. Organization of the projections from the subiculum to the ventral striatum in the rat. A study using anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* 1987;23(1):103-20.

Gutiérrez B, Arranz MJ, Huezio-Diaz P, Dempster D, Matthiasson P, Travis M, Munro J, Osborne S, Kerwin RW. Novel mutations in 5-HT3A and 5-HT3B receptor genes not associated with clozapine response. *Schizophr Res* 2002;58(1):93-7.

Halim ND, McClintock BW, Weinberger DR, Kleinman JE, Lipska BK. Presynaptic proteins in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia and rats with abnormal prefrontal development. *Mol Psychiatry*. 2003; 8: 797-810.

Halim ND, McClintock BW, Weinberger DR, Kleinman JE, Lipska BK. Presynaptic proteins in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia and rats with abnormal prefrontal development. *Mol Psychiatry*. 2003; 8: 797-810.

Halim ND, Weickert CS, McClintock BW, Weinberger DR, Lipska BK. Effects of chronic haloperidol and clozapine treatment on neurogenesis in the adult rat hippocampus. *Neuropsychopharmacology* 2004;29(6):1063-1069.

Hall C.S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*. 1934; 18(3):385-403

Hall FS, Huang S, Fong GW, Pert A, Linnoila M. Effects of isolation-rearing on locomotion, anxiety and responses to ethanol in Fawn Hooded and Wistar rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1998;139(3):203-209.

Hammond GR, McAdam DW, Ison JR. Effects of prestimulation on the electromyographic response associated with the acoustic startle reaction in rats. *Physiol Behav* 1972; 8(3):535-537.

Hanada S, Mita T, Nishino N, Tanaka C. [³H]muscimol binding sites increased in autopsied brains of chronic schizophrenics. *Life Sci* 1987;40(3):259-66.

Hantraye P. Modeling dopamine system dysfunction in experimental animals. *Nucl Med Biol* 1998;25(8):721-728.

Hantraye P. Modeling dopamine system dysfunction in experimental animals. *Nucl Med Biol* 1998;25(8):721-728.

Harvey JA. Role of the serotonin 5-HT(2A) receptor in learning. *Learn Mem* 2003;10(5):355-62. Review.

Harvey PD, Artioli i Fortuny L, Vester-Blockland E, De Smedt G. Cross-national cognitive assessment in schizophrenia clinical trials: a feasibility study. *Schizophr Res* 2003;59(2-3):243-51.

Hashimoto T, Volk DW, Eggan SM, Mirnics K, Pierri JN, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA. Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J Neurosci* 2003;23:6315-26.

Hazlett EA, Buchsbaum MS, Haznedar MM, Singer MB, Germans MK, Schnur DB, Jimenez EA, Buchsbaum BR, Troyer BT. Prefrontal cortex glucose metabolism and startle eyeblink modification abnormalities in unmedicated schizophrenia patients. *Psychophysiology* 1998;35(2):186-198.

Healy DJ, L. Ritter M, Meador-Woodruff JH. Regulation of NR1 NMDA receptor splice variant expression in rat hippocampus. *Biological Psychiatry* 2000;47(8),Suppl1:S147.

Heckers S, Konradi C. Hippocampal neurons in schizophrenia. *J Neural Transm.* 2002; 109: 891-905.

Herrera DG, Robertson HA. Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 1996;50(2-3):83-107. Review.

Hertel P, Lindblom N, Nomikos GG, Svensson TH. Modulation of central serotonergic neurotransmission by risperidone: underlying mechanism(s) and significance of action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1998;22(5):815-34.

Hertel P, Nomikos GG, Schilström B, Arborelius L, Svensson TH. Risperidone dose-dependently increases extracellular concentrations of serotonin in the rat frontal cortex: role of alpha 2-adrenoceptor antagonism. *Neuropsychopharmacology* 1997;17(1):44-55.

Hervé D, Simon H, Blanc G, Lisoprawski A, Le Moal M, Glowinski J, Tassin JP. Increased utilization of dopamine in the nucleus accumbens but not in the cerebral cortex after dorsal raphe lesion in the rat. *Neurosci Lett* 1979;15(2-3):127-33.

Hillert A, Maier W, Wetzel H, Benkert O. Risperidone in the treatment of disorders with a combined psychotic and depressive syndrome--a functional approach. *Pharmacopsychiatry* 1992;25(5):213-217.

Hirsch S R, Das I, Khan N S, de Bellerocche J. Plasma polyamine changes and possible effects on hypofunctional NMDA receptor found in schizophrenic brain. *Biological Psychiatry* 1997, 42(1),Suppl1:266-67.

Ho BC, Andreasen NC, Nopoulos P, Fuller R, Arndt S, Cadoret RJ. Secondary prevention of schizophrenia: utility of standardized scholastic tests in early identification. *Ann Clin Psychiatry*. 2005;17(1):11-8.

Hock BJ Jr, Bunsey MD. Differential effects of dorsal and ventral hippocampal lesions. *J Neurosci* 1998;18(17):7027-32.

Hoffman HS, Ison JR. Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychol Rev* 1980;87(2):175-189.

Honey GD, Bullmore ET, Soni W, Varatheesan M, Williams SC, Sharma T. Differences in frontal cortical activation by a working memory task after

substitution of risperidone for typical antipsychotic drugs in patients with schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(23):13432-7.

Hori T, Subramaniam S, Srivastava LK, Quirion R. Behavioral and neurochemical alterations following repeated phencyclidine administration in rats with neonatal ventral hippocampal lesions. *Neuropharmacology* 2000;39(12):2478-91.

Hoy RR. Startle, categorical response, and attention in acoustic behavior of insects. *Annu Rev Neurosci* 1989;12:355-375.

Hughes P, Dragunow M. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 1995;47(1):133-78. Review.

Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, Fowler WL, O'Laughlin IA, Meltzer HY. 5-HT(2A) and D(2) receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT(1A) receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. *J Neurochem* 2001;76(5):1521-1531.

Ichikawa J, Kuroki T, Dai J, Meltzer HY. Effect of antipsychotic drugs on extracellular serotonin levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 1998;351(2):163-71.

Ichikawa J, Li Z, Dai J, Meltzer HY. Atypical antipsychotic drugs, quetiapine, iloperidone, and melperone, preferentially increase dopamine and acetylcholine release in rat medial prefrontal cortex: role of 5-HT_{1A} receptor agonism. *Brain Res* 2002;956(2):349-57.

Ichikawa J, Meltzer HY. The effect of serotonin_{1A} receptor agonism on antipsychotic drug-induced dopamine release in rat striatum and nucleus accumbens. *Brain Research* 2000;858(2): 252-63.

Ison JR, Hammond GR, Krauter EE. Effects of experience on stimulus-produced reflex inhibition in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 1973;83(2):324-336.

Ison JR, Hammond GR. Modification of the startle reflex in the rat by changes in the auditory and visual environments. *J Comp Physiol Psychol* 1971;75(3):435-452.

Jakob H, Beckmann H. Prenatal developmental disturbances in the límbico

allocortex in schizophrenics. *J Neural Transm* 1986;65(3-4):303-326.

Jaskiw GE, Karoum FK, Weinberger DR. Persistent elevations in dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens after mild subchronic stress in rats with ibotenic acid lesions of the medial prefrontal cortex. *Brain Res* 1990;534(1-2):321-3.

Johnstone EC, Owens DG, Bydder GM, Colter N, Crow TJ, Frith CD. The spectrum of structural brain changes in schizophrenia: age of onset as a predictor of cognitive and clinical impairments and their cerebral correlates. *Psychol Med* 1989;19(1):91-103.

Kalsbeek A, Voorn P, Buijs RM, Pool CW, Uylings HBM. Development of the dopaminergic innervation in the prefrontal cortex of the rat. *J Comp Neurol* 1988; 269: 58-72.

Kaneda H, Shirakawa O, Dale J, Goodman L, Bachus SE, Tamminga CA. Co-administration of progabide inhibits haloperidol-induced oral dyskinesias in rats. *Eur J Pharmacol* 1992 Feb 25;212(1):43-9.

Kaplan HI, Sadock BL, Grebb JA (1994) Synopsis of Psychiatry.

Kapur S, VanderSpek SC, Brownlee BA, Nobrega JN. Antipsychotic dosing in preclinical models is often unrepresentative of the clinical condition: a suggested solution based on in vivo occupancy. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305(2):625-31.

Karl T, Duffy L, O'brien E, Matsumoto I, Dedova I. Behavioural effects of chronic haloperidol and risperidone treatment in rats. *Behav Brain Res* 2006;171(2):286-94.

Kasper S, Resinger E. Cognitive effects and antipsychotic treatment. *Psychoneuroendocrinology* 2003;28 Suppl1:27-38. Review.

Kasper S, Resinger E. Cognitive effects and antipsychotic treatment. *Psychoneuroendocrinology*. 2003;28 Suppl 1:27-38. Review.

Kato K, Shishido T, Ono M, Shishido K, Kobayashi M, Niwa S. Glycine reduces novelty- and methamphetamine-induced locomotor activity in neonatal ventral hippocampal damaged rats. *Neuropsychopharmacology*. 2001; 24: 330-332.

Kato K, Shishido T, Ono M, Shishido K, Kobayashi M, Niwa S. Glycine reduces novelty- and methamphetamine-induced locomotor activity in neonatal ventral hippocampal damaged rats. *Neuropsychopharmacology*. 2001; 24: 330-332.

Kato K, Shishido T, Ono M, Shishido K, Kobayashi M, Niwa S. Glycine reduces novelty- and methamphetamine-induced locomotor activity in neonatal ventral hippocampal damaged rats. *Neuropsychopharmacology*. 2001; 24: 330-332.

Kato K, Shishido T, Ono M, Shishido K, Kobayashi M, Niwa S. Glycine reduces novelty- and methamphetamine-induced locomotor activity in neonatal ventral hippocampal damaged rats. *Neuropsychopharmacology*. 2001; 24: 330-332.

Kato K, Shishido T, Ono M, Shishido K, Kobayashi M, Suzuki H, Nabeshima T, Furukawa H, Niwa S. Effects of phencyclidine on behavior and extracellular levels of dopamine and its metabolites in neonatal ventral hippocampal damaged rats. *Psychopharmacology*. 2000; 150: 163-169.

Kato K, Shishido T, Ono M, Shishido K, Kobayashi M, Suzuki H, Nabeshima T, Furukawa H, Niwa S. Effects of phencyclidine on behavior and extracellular levels of dopamine and its metabolites in neonatal ventral hippocampal damaged rats. *Psychopharmacology*. 2000; 150: 163-169.

Kato K, Shishido T, Ono M, Shishido K, Kobayashi M, Suzuki H, Nabeshima T, Furukawa H, Niwa S. Effects of phencyclidine on behavior and extracellular levels of dopamine and its metabolites in neonatal ventral hippocampal damaged rats. *Psychopharmacology*. 2000; 150: 163-169.

Kato K, Shishido T, Ono M, Shishido K, Kobayashi M, Suzuki H, Nabeshima T, Furukawa H, Niwa S. Effects of phencyclidine on behavior and extracellular levels of dopamine and its metabolites in neonatal ventral hippocampal damaged rats. *Psychopharmacology*. 2000; 150: 163-169.

Keith VA, Mansbach RS, Geyer MA. Failure of haloperidol to block the effects of phencyclidine and dizocilpine on prepulse inhibition of startle. *Biol Psychiatry* 1991;30:557-66.

Kelley BM, Groseclose CH, Middaugh LD. Prenatal cocaine exposure increases the reinforcing strength of oral ethanol in C57 mice. *Neurotoxicol Teratol* 1997;19(5):391-8.

Kelley JJ, Roberts RC. Effects of haloperidol on cholinergic striatal interneurons: relationship to oral dyskinesias. *J Neural Transm* 2004;111(8):1075-91.

Keshavan MS, Bagwell WW, Haas GL, Sweeney JA, Schooler NR, Pettegrew JW. Changes in caudate volume with neuroleptic treatment. *Lancet* 1994;344(8934):1434.

Khaing ZZ, Weickert CS, Weinberger DR, Lipska BK. Differential DNA damage in response to the neonatal and adult excitotoxic hippocampal lesion in rats. *Eur J Neurosci*. 2000; 12: 4424-4433.

Khaing ZZ, Weickert CS, Weinberger DR, Lipska BK. Differential DNA damage in response to the neonatal and adult excitotoxic hippocampal lesion in rats. *Eur J Neurosci*. 2000; 12: 4424-4433.

Knable MB, Torrey EF, Webster MJ, Bartko JJ. Multivariate analysis of prefrontal cortical data from the Stanley Foundation Neuropathology Consortium. *Brain Res Bull* 2001;55(5):651-9.

Koch M, Schnitzler HU. The acoustic startle response in rats circuits mediating evocation, inhibition and potentiation. *Behav Brain Res* 1997;89(1-2):35-49.

Koch M. The neurobiology of startle. *Prog Neurobiol* 1999;59(2):107-128.

Koenig JI, Elmer GI, Shepard PD, Lee PR, Mayo C, Joy B, Hercher E, Brady DL. Prenatal exposure to a repeated variable stress paradigm elicits behavioral and neuroendocrinological changes in the adult offspring: potential relevance to schizophrenia. *Behav Brain Res* 2005;156(2):251-261.

Köhler C, Schwarcz R. Comparison of ibotenate and kainate neurotoxicity in the rat brain: an histological study. *Neuroscience*. **1983**; 8: 819-835.

Kolachana BS, Saunders RC, Weinberger DR. Augmentation of prefrontal cortical monoaminergic activity inhibits dopamine release in the caudate nucleus: an in vivo neurochemical assessment in the rhesus monkey. *Neuroscience* 1995;69(3):859-68

Kolb B, Nonneman AJ. Sparing of function in rats with early prefrontal cortex

lesions. *Brain Res.* 1978;151(1):135-48.

Kolb B, Whishaw IQ. Earlier is not always better: behavioral dysfunction and abnormal cerebral morphogenesis following neonatal cortical lesions in the rat. *Behav Brain Res* 1985;17:25-43.

Kolb B. Recovery from early cortical damage in rats. I. Differential behavioral and anatomical effects of frontal lesions at different ages of neural maturation. *Behav Brain Res* 1987;25:205-220.

Kongsamut S, Roehr JE, Cai J, Hartman HB, Weissensee P, Kerman LL, Tang L, Sandrasagra A. Iloperidone binding to human and rat dopamine and 5-HT receptors. *Eur J Pharmacol* 1996;317(2-3):417-23.

Konradi C, Heckers S. Antipsychotic drugs and neuroplasticity: insights into the treatment and neurobiology of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2001;50(10):729-742.

Kovelman JA, Scheibel AB. A neurohistological correlate of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1984;19(12):1601-1621.

Kumari V, Sharma T. Effects of typical and atypical antipsychotics on prepulse inhibition in schizophrenia: a critical evaluation of current evidence and directions for future research. *Psychopharmacology (Berl)* 2002;162(2):97–101.

Kumari V, Soni W, Mathew VM, Sharma T. Prepulse inhibition of the startle response in men with schizophrenia: effects of age of onset of illness, symptoms, and medication. *Arch Gen Psychiatry* 2000; 57(6):609-14.

Kumari V, Soni W, Mathew VM, Sharma T. Prepulse inhibition of the startle response in men with schizophrenia: effects of age of onset of illness, symptoms, and medication. *Arch Gen Psychiatry* 2000;57(6):609-614.

Kumari V, Soni W, Sharma T (1999). Normalization of information processing deficits in schizophrenia with clozapine. *Am J Psychiatry* 156: 1046–1051.

Kumari V, Soni W, Sharma T. Prepulse inhibition of the startle response in risperidone-treated patients: comparison with typical antipsychotics. *Schizophr Res* 2002;55(1-2):139-146.

Kumra S, Jacobsen L, Smith A, Lee P, Nelson J, Hamburger S. Childhood-onset schizophrenia. Progressive ventricular change during adolescence. *Arch Gen Psychiatry* 1997;54(10):897-903.

Lalonde R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002;26(1):91-104. Review.

Landis C, Hunt WA. 1939. The startle pattern. *New York: Farrar, Straus & Giroux*.

Landis C, Hunt WA. The startle pattern. *New York: Farrar, Straus & Giroux*. 1939.

Lawrie SM, Abukmeil SS. Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *Br J Psychiatry* 1998;172:110-120.

Le Marec N, Ethier K, Rompré PP, Godbout R. Involvement of the medial prefrontal cortex in two alternation tasks using different environments. *Brain Cogn* 2002;48(2-3):432-6.

Le Moal M, Simon H. Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles. *Physiol Rev* 1991;71(1):155-234. Review.

Le Pen G, Gaudet L, Mortas P, Mory R, Moreau JL. Deficits in reward sensitivity in a neurodevelopmental rat model of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 2002; 161:434-41.

Le Pen G, Gaudet L, Mortas P, Mory R, Moreau JL. Deficits in reward sensitivity in a neurodevelopmental rat model of schizophrenia. *Psychopharmacology*. 2002b; 161: 434-441.

Le Pen G, Gaudet L, Mortas P, Mory R, Moreau JL. Deficits in reward sensitivity in a neurodevelopmental rat model of schizophrenia. *Psychopharmacology*. 2002b; 161: 434-441.

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: 257-268.

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: 257-268.

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: 257-268.

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: 257-268.

Le Pen G, Grottick AJ, Higgins GA, Moreau JL. Phencyclidine exacerbates attentional deficits in a neurodevelopmental rat model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 2003a; 28: 1799-1809.

Le Pen G, Grottick AJ, Higgins GA, Moreau JL. Phencyclidine exacerbates attentional deficits in a neurodevelopmental rat model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 2003a; 28: 1799-1809.

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.* 2003b; 54: 1162-1170.

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.* 2003b; 54: 1162-1170.

Le Pen G, Moreau JL. Disruption of prepulse inhibition of startle reflex in a neurodevelopmental model of schizophrenia: reversal by clozapine, olanzapine and risperidone but not by haloperidol. *Neuropsychopharmacology* 2002;27(1):1-11.

Le Pen G, Moreau JL. Disruption of prepulse inhibition of startle reflex in a neurodevelopmental model of schizophrenia : reversal by clozapine, olanzapine

and riseridone and not by haloperidol. *Neuropsychopharmacology*. 2002a; 27 : 1-11.

Le Pen G, Moreau JL. Disruption of prepulse inhibition of startle reflex in a neurodevelopmental model of schizophrenia : reversal by clozapine, olanzapine and riseridone and not by haloperidol. *Neuropsychopharmacology*. 2002a; 27 : 1-11.

Leumann L, Feldon J, Vollenweider FX, Ludewig K. Effects of typical and atypical antipsychotics on prepulse inhibition and latent inhibition in chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2002;52(7):729–39.

Leumann L, Sterchi D, Vollenweider F, Ludewig K, Fruh H. A neural network approach to the acoustic startle reflex and prepulse inhibition. *Brain Res Bull* 2001;56(2):101-110.

Leumann L, Sterchi D, Vollenweider F, Ludewig K, Fruh H. A neural network approach to the acoustic startle reflex and prepulse inhibition. *Brain Res Bull* 2001;56(2):101-110.

Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(4):312–24.

Lewis SW. Congenital risk factors for schizophrenia. *Psychol Med* 1989;19:5-13.

Leysen JE, Janssen PM, Schotte A, Luyten WH, Megens AA. Interaction of antipsychotic drugs with neurotransmitter receptor sites in vitro and in vivo in relation to pharmacological and clinical effects: role of 5HT2 receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 1993;112,Suppl1:S40-54.

Leysen JE, Janssen PM, Schotte A, Luyten WH, Megens AA. Interaction of antipsychotic drugs with neurotransmitter receptor sites in vitro and in vivo in relation to pharmacological and clinical effects: role of 5HT2 receptors. *Psychopharmacology (Berl)* 1993;112(1 Suppl):S40-54.

Li L, Priebe RP, Yeomans JS. Prepulse inhibition of acoustic or trigeminal startle of rats by unilateral electrical stimulation of the inferior colliculus. *Behav Neurosci* 1998;112(5):1187-1198.

Lieberman JA, Tollefson GD, Charles C, Zipursky R, Sharma T, Kahn RS, Keefe

RS, Green AI, Gur RE, McEvoy J, Perkins D, Hamer RM, Gu H, Tohen M. Antipsychotic drug effects on brain morphology in first-episode psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 2005;62(4):361-370.

Light GA, Braff DL. Stability of mismatch negativity deficits and their relationship to functional impairments in chronic schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2005;162(9):1741-3.

Lillrank SM, Lipska BK, Bachus SE, Wood GK, Weinberger DR. Amphetamine-induced c-fos mRNA expression is altered in rats with neonatal ventral hippocampal damage. *Synapse* 1996; 23: 292-301.

Lipska BK, Al-Amin HA, Weinberger DR. Excitotoxic lesions of the rat medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 1998; 19: 451-464.

Lipska BK, Al-Amin HA, Weinberger DR. Excitotoxic lesions of the rat medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 1998; 19: 451-464.

Lipska BK, Al-Amin HA, Weinberger DR. Excitotoxic lesions of the rat medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 1998; 19: 451-464.

Lipska BK, Al-Amin HA, Weinberger DR. Excitotoxic lesions of the rat medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology*. 1998; 19: 451-464.

Lipska BK, Aultman JM, Verma A, Weinberger DR, Moghaddam B. Neonatal damage of the ventral hippocampus impairs working memory in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 2002; 27: 47-54.

Lipska BK, Aultman JM, Verma A, Weinberger DR, Moghaddam B. Neonatal damage of the ventral hippocampus impairs working memory in the rat. *Neuropsychopharmacology*. 2002; 27: 47-54.

Lipska BK, Jaskiw GE, Weinberger DR. Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1993; 9(1):67-75.

Lipska BK, Jaskiw GE, Weinberger DR. Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia.

Neuropsychopharmacology 1993b;9:67-75.

Lipska BK, Jaskiw GE, Weinberger DR. Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1993a; 9: 67-75.

Lipska BK, Jaskiw GE, Weinberger DR. Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1993a; 9: 67-75.

Lipska BK, Lerman DN, Khaing ZZ, Weickert CS, Weinberger DR. Gene expression in dopamine and GABA systems in an animal model of schizophrenia: effects of antipsychotic drugs. *Eur J Neurosci* 2003a; 18: 391-402.

Lipska BK, Lerman DN, Khaing ZZ, Weinberger DR. The neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia: effects on dopamine and GABA mRNA markers in the rat striatum. *Eur J Neurosci* 2003b; 18: 3097-3104.

Lipska BK, Swerdlow NR, Geyer MA, Jaskiw GE, Braff DL, Weinberger DR. Neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats causes post-pubertal changes in prepulse inhibition of startle and its disruption by apomorphine. *Psychopharmacology* 1995b; 122: 35-43.

Lipska BK, Swerdlow NR, Jaskiw GE, Geyer MA, Braff DL, Weinberger DR. Neonatal hippocampal damage disrupts sensorimotor gating in postpubertal rats. *Biological Psychiatry* 1994; 35(9):631.

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

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

Lipska BK, Weinberger DR. Genetic variation in vulnerability to the behavioral effects of neonatal hippocampal damage in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

1995c; 92: 8906-8910.

Lipska BK, Weinberger DR. Genetic variation in vulnerability to the behavioral effects of neonatal hippocampal damage in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995c; 92: 8906-8910.

Lipska BK, Weinberger DR. Gonadectomy does not prevent novelty or drug-induced motor hyperresponsiveness in rats with neonatal hippocampal damage. *Brain Res Dev Brain Res*. 1994a; 78: 253-258.

Lipska BK, Weinberger DR. Gonadectomy does not prevent novelty or drug-induced motor hyperresponsiveness in rats with neonatal hippocampal damage. *Brain Res Dev Brain Res*. 1994a; 78: 253-258.

Lipska BK, Weinberger DR. Prefrontal cortical and hippocampal modulation of dopamine-mediated effects. *Adv Pharmacol* 1998;42:806-9.

Lipska BK, Weinberger DR. Subchronic treatment with haloperidol and clozapine in rats with neonatal excitotoxic hippocampal damage. *Neuropsychopharmacology* 1994; 10:199-205.

Lipska BK, Weinberger DR. Subchronic treatment with haloperidol and clozapine in rats with neonatal excitotoxic hippocampal damage. *Neuropsychopharmacology*. 1994b; 10: 199-205.

Lipska BK, Weinberger DR. Subchronic treatment with haloperidol and clozapine in rats with neonatal excitotoxic hippocampal damage. *Neuropsychopharmacology*. 1994b; 10: 199-205.

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

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

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

Lipska BK. Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci* 2004; 29: 282-286.

Louilot A, Le Moal M, Simon H. Opposite influences of dopaminergic pathways to the prefrontal cortex or the septum on the dopaminergic transmission in the nucleus accumbens. An in vivo voltammetric study. *Neuroscience*. 1989;29(1):45-56.

MacGibbon GA, Lawlor PA, Bravo R, Dragunow M. Clozapine and haloperidol produce a differential pattern of immediate early gene expression in rat caudate-putamen, nucleus accumbens, lateral septum and islands of Calleja. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;23(1-2):21-32.

Maier M, Ron MA, Barker GJ, Tofts PS. Proton magnetic resonance spectroscopy: an in vivo method of estimating hippocampal neuronal depletion in schizophrenia. *Psychol Med* 1995;25(6):1201-1209.

Marder SR, Davis JM, Chouinard G. The effects of risperidone on the five dimensions of schizophrenia derived by factor analysis: combined results of the North American trials. *J Clin Psychiatry*. 1997 Dec;58(12):538-46. Erratum in: *J Clin Psychiatry* 1998;59(4):200.

Marder SR, Meibach RC. Risperidone in the treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1994;151(6):825-35.

Marquis JP, Goulet S, Dore F. Neonatal lesions of the ventral hippocampus in rats lead to prefrontal cognitive deficits at two maturational stages. *Neuroscience*. 2006; 140: 759-767.

Marquis JP, Goulet S, Dore F. Neonatal lesions of the ventral hippocampus in rats lead to prefrontal cognitive deficits at two maturational stages. *Neuroscience*. 2006; 140: 759-767.

Martinez ZA, Oostwegel J, Geyer MA, Ellison GD, Swerdlow NR. "Early" and "late" effects of sustained haloperidol on apomorphine- and phencyclidine-induced sensorimotor gating deficits. *Neuropsychopharmacology* 2000; 23(5):517-527.

McCormick L, Decker L, Nopoulos P, HoBC, Andreasen N. Effects of atypical and typical neuroleptics on anterior cingulate volume in schizophrenia. *Schizophr Res* 2005;80(1):73-84.

McEwen B. Roles of Vasopressin and Oxytocin in Memory Processing. *Part II* 2004;51-52. *Academic press*.

McGurk SR, Carter C, Goldman R, Green MF, Marder SR, Xie H, Schooler NR, Kane JM. The effects of clozapine and risperidone on spatial working memory in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2005;162(5):1013-6.

McKinney WT Jr, Bunney WE Jr. Animal model of depression. I. Review of evidence: implications for research. *Arch Gen Psychiatry* 1969;21: 240-248.

Meador-Woodruff JH, Healy DJ. Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Res Brain Res Rev* 2000;31(2-3):288-94. Review.

Mednick SA, Cannon TD, Barr CE, Lyons MJ. Fetal Neural Development and Adult Schizophrenia. *Cambridge University Press* 1991.

Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pKi values. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251: 238-246.

Meltzer HY, McGurk SR. The effects of clozapine, risperidone, and olanzapine on cognitive function in schizophrenia. *Schizophr Bull* 1999;25(2):233-55. Review.

Millan MJ. N-Methyl-D-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: novel insights and clinical perspectives. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;179(1):30-53.

Miller DD, Andreasen NC, O'Leary DS, Rezai K, Watkins GL, Ponto LL, Hichwa RD. Effect of antipsychotics on regional cerebral blood flow measured with positron emission tomography. *Neuropsychopharmacology* 1997;17(4):230-40.

Miller LA and Surlykke A. How some insects detect and avoid being eaten by bats: Tactics and countertactics of prey and predator. *BioScience* 2001;51: 571-582.

Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry* 2005;10:79-104.

Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA

receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 1999;20;98(4):427-436.

Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 1999;98(4):427-436.

Molina V, Gispert JD, Reig S, Sanz J, Pascau J, Santos A, Desco M, Palomo T. Cerebral metabolic changes induced by clozapine in schizophrenia and related to clinical improvement. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;178(1):17-26.

Molina V, Gispert JD, Reig S, Sanz J, Pascau J, Santos A, Palomo T, Desco M. Cerebral metabolism and risperidone treatment in schizophrenia. *Schizophr Res* 2003;60(1):1-7.

Moore H, Jentsch JD, Ghajarnia M, Geyer MA, Grace AA. A neurobehavioral systems analysis of adult rats exposed to methylazoxymethanol acetate on E17: implications for the neuropathology of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2006;60(3):253-264.

Moser MB, Moser EI. Functional differentiation in the hippocampus. *Hippocampus* 1998;8(6):608-19. Review.

Mouri A, Noda Y, Enomoto T, Nabeshima T. Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. *Neurochem Int* 2007;51(2-4):173-84. Epub 2007 Jun 27. Review.

Murphy CA, Feldon J. Interactions between environmental stimulation and antipsychotic drug effects on forebrain c-fos activation. *Neuroscience* 2001;104(3):717-30.

Murray RM, Lewis SW Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder?. *Br Med J* 1987;295:681-682.

Natesan S, Reckless GE, Nobrega JN, Fletcher PJ, Kapur S. Dissociation between in vivo occupancy and functional antagonism of dopamine D2 receptors: comparing aripiprazole to other antipsychotics in animal models. *Neuropsychopharmacology* 2006;31(9):1854-63.

Newton SS, Duman RS. Neurogenic actions of atypical antipsychotic drugs and therapeutic implications. *CNS Drugs* 2007;21(9):715-725.

Nieto-Sampedro M, Needels DL, Cotman CW. A simple, objective method to measure the activity of factors that promote neuronal survival. *J Neurosci Methods* 1985; 15: 37-48.

Ninan I, Jardemark KE, Wang RY. Olanzapine and clozapine but not haloperidol reverse subchronic phencyclidine-induced functional hyperactivity of N-methyl-D-aspartate receptors in pyramidal cells of the rat medial prefrontal cortex. *Neuropharmacology* 2003;44(4):462-72.

Nowakowska E, Chodera A, Kus K, Rybakowski J. Some behavioural effects of risperidone in rats: comparison with haloperidol. *Eur Neuropsychopharmacol* 1999; 9(5):421-26.

O'Donnell P, Lewis BL, Weinberger DR and Lipska B.K., Neonatal hippocampal damage alters electrophysiological properties of prefrontal cortical neurons in adult rats, *Cereb Cortex* 2002; 12:975-82.

Oka T, Hamamura T, Lee Y, Miyata S, Habara T, Endo S, et al. Atypical properties of several classes of antipsychotic drugs on the basis of differential induction of Fos-like immunoreactivity in the rat brain. *Life Sci* 2004;76(2): 225–37.

Olin SC, Mednick SA. Risk factors of psychosis: identifying vulnerable populations premorbidly. *Schizophr Bull* 1996;22:223-40.

Olin SC, Mednick SA. Risk factors of psychosis: identifying vulnerable

Oranje B, Van Oel CJ, Gispen-De Wied CC, Verbaten MN, Kahn RS. Effects of typical and atypical antipsychotics on the prepulse inhibition of the startle reflex in patients with schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 2002;22(4): 359–65.

Pani L, Pira L, Marchese G. Antipsychotic efficacy: relationship to optimal D2-receptor occupancy. *Eur Psychiatry*. 2007;22(5):267-75. Review.

Parwani A, Duncan EJ, Bartlett E, Madonick SH, Efferen TR, Rajan R, Sanfilippo M, Chappell PB, Chakravorty S, Gonzenbach S, Ko GN, Rotrosen JP. Impaired prepulse inhibition of acoustic startle in schizophrenia. *Biol Psychiatry*

2000;47(7):662-9.

Pellerin L, Magistretti PJ. Excitatory amino acids stimulate aerobic glycolysis in astrocytes via an activation of the Na⁺/K⁺ ATPase. *Dev Neurosci* 1996;18(5-6):336-42.

Perry W, Braff DL. Information-processing deficits and thought disorder in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1994;151(3):363-7.

Pickney LA. Inhibition of the startle in the rat by prior tactile stimulation. *Anim Learn Behav* 1976;4:467-472.

populations premorbidly. *Schizophr Bull* 1996;22:223-240.

Powell SB, Geyer MA, Preece MA, Pitcher LK, Reynolds GP, Swerdlow NR. Dopamine depletion of the nucleus accumbens reverses isolation-induced deficits in prepulse inhibition in rats. *Neuroscience* 2003;119(1):233-240.

Pratt JA, Winchester C, Egerton A, Cochran SM, Morris BJ. Modelling prefrontal cortex deficits in schizophrenia: implications for treatment. *Br J Pharmacol* 2008;153(1):465-70.

Pressler M, Nopoulos P, Ho BC, Andreasen NC. Insular cortex abnormalities in schizophrenia: relationship to symptoms and typical neuroleptic exposure. *Biol Psychiatry* 2005;57(4):394-8.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003;463(1-3):3-33.

Psatta DM. Mutual relations of dorsal and ventral hippocampus with the hypothalamus. I. Hippocampo-hypothalamic projections. *Rev Roum Med* 1974;12(6):441-451.

Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Makkos Z, Meltzer H, Overholser J, Stockmeier C. Layer-specific reductions in GFAP-reactive astroglia in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr Res* 2002; 57(2-3):127-38.

Rajkowska G, Selemon LD, Goldman-Rakic PS. Neuronal and glial somal size in the prefrontal cortex: a postmortem morphometric study of schizophrenia and Huntington disease. *Arch Gen Psychiatry* 1998;55:215-24.

Ramos A, Kangerski AL, Basso PF, Da Silva Santos JE, Assreuy J, Vendruscolo LF, Takahashi RN Evaluation of Lewis and SHR rat strain as a genetic model for the study of anxiety and pain. *Behav Brain Res* 2002;129:113–123.

Ramos A, Mellerin Y, Mormède P, Chaouloff F. A genetic and multifactorial analysis of anxiety-related behaviours in Lewis and SHR intercrosses. *Behav Brain Res* 1998;96(1-2):195-205.

Rapoport JL, Addington AM, Frangou S, Psych MR. The neurodevelopmental model of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2005;10:434-449.

Rapoport JL, Giedd J, Sporn AL, Greenstein DK, Gogtay N, Jeffries NO, Lenane M, Gochman P, Clasen LS, Blumenthal J, Giedd JN, Rapoport JL. Progressive brain volumen loss during adolescence in childhood-onset schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2003;160(12):2181-189.

Ravindran AV, Bradbury C, McKay M, da Silva TL. Novel uses for risperidone: focus on depressive, anxiety and behavioral disorders. *Expert Opin Pharmacother* 2007;8(11):1693-1710.

Rebec GV, Christensen JR, Guerra C, Bardo MT. Regional and temporal differences in real-time dopamine efflux in the nucleus accumbens during free-choice novelty. *Brain Res* 1997a;776:61–67.

Rebec GV, Grabner CP, Johnson M, Pierce RC, Bardo MT. Transient increases in catecholaminergic activity in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens shell during novelty. *Neuroscience* 1997b;76:707–714.

Rebec GV. Dopamine, glutamate, and behavioral correlates of striatal neuronal activity. *Adv Pharmacol* 1998;42:737-40.

Rehn AE, Van Den BM, Copolov D, Briscoe T, Lambert G, Rees S. An animal model of chronic placental insufficiency: relevance to neurodevelopmental disorders including schizophrenia. *Neuroscience* 2004;129(2):381-391.

Remington G, Kapur S. Atypical antipsychotics: are some more atypical than others? *Psychopharmacology* 2000;148:3-15.

Remington G, Kapur S. Atypical antipsychotics: are some more atypical than

others? *Psychopharmacology* 2000;148:3-15.

Remington G, Kapur S. D2 and 5-HT2 receptor effects of antipsychotics: bridging basic and clinical findings using PET. *J Clin Psychiatry* 1999; 60: 15-19.

Reynolds GP, Czudek C, Andrews HB. Deficit and hemispheric asymmetry of GABA uptake sites in the hippocampus in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1990;27(9):1038-44.

Richelson E, Souder T. Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors focus on newer generation compounds. *Life Sci* 2000;68(1):29-39.

Richtand NM, Taylor B, Welge JA, Ahlbrand R, Ostrander MM, Burr J, Hayes S, Coolen LM, Pritchard LM, Logue A, Herman JP, McNamara RK. Risperidone treatment prevents elevated locomotor activity following neonatal hippocampal lesions. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 31: 77-89.

Richtand NM, Taylor B, Welge JA, Ahlbrand R, Ostrander MM, Burr J, Hayes S, Coolen LM, Pritchard LM, Logue A, Herman JP, McNamara RK. Risperidone treatment prevents elevated locomotor activity following neonatal hippocampal lesions. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 31: 77-89.

Rimer M, Barrett DW, Maldonado MA, Vock VM, Gonzalez-Lima F. Neuregulin-1 immunoglobulin-like domain mutant mice: clozapine sensitivity and impaired latent inhibition. *Neuroreport* 2005;16(3):271-275.

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

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

Roberts GW, Colter N, Lofthouse R, Johnstone EC, Crow TJ. Is there gliosis in schizophrenia? Investigation of the temporal lobe. *Biol Psychiatry* 1987;22(12):1459-68.

Roberts RC, Force M, Kung L. Dopaminergic synapses in the matrix of the ventrolateral striatum after chronic haloperidol treatment. *Synapse* 2002; 45: 78–85.

Roberts RC, Gaither LA, Gao X-M, Kashyap SM, Tamminga CA. Ultrastructural correlates of haloperidol-induced oral dyskinesias in rat striatum. *Synapse* 1995; 20:234–243

Roberts RC, Lapidus B. Ultrastructural correlates of haloperidol-induced oral dyskinesias in rats: a study of unlabeled and enkephalin-labeled striatal terminals. *J Neural Transm* 2003;110(9):961-75.

Roberts RC. Effect of chronic olanzapine treatment on striatal synaptic organization. *Synapse* 2001;39: 8–15.

Robertson GS, Fibiger HC. Neuroleptics increase c-fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine. *Neuroscience* 1992;46(2):315–28.

Rosengarten H, Quartermain D. The effect of chronic treatment with typical and atypical antipsychotics on working memory and jaw movements in three- and eighteen-month-old rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002;26(6):1047–54.

Roth BL and Meltzer HY. The role of serotonin in schizophrenia. In: Bloom FE and Kupfer D. (Eds.), *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. Raven Press, Ltd., New York, NY, 1995; 1215–1227.

Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncel RW. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 1994;13(3):713-25.

Rowe WB, Spreekmeester E, Meaney MJ, Quirion R, Rochford J. Reactivity to novelty in cognitively-impaired and cognitively-unimpaired aged rats and young rats. *Neuroscience* 1998;83(3):669-80.

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. 2004; 176: 312- 319.

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*. 2004; 176: 312- 319.

Ruotsalainen S, Sirviö J, Jäkälä P, Puumala T, MacDonald E, Riekkinen P Sr. Differential effects of three 5-HT receptor antagonists on the performance of rats in attentional and working memory tasks. *Eur Neuropsychopharmacol* 1997;7(2):99-108.

Russell PA Fear-evoking stimuli. In: Fear in animals and man (W Sluckin, ed). *New York: Van Nostrand Reinhold*, 1979;86-124

Sagar SM, Sharp FR, Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 1988;240(4857):1328-31.

Sakai K, Gao XM, Hashimoto T, Tamminga CA. Traditional and new antipsychotic drugs differentially alter neurotransmission markers in basal ganglia-thalamocortical neural pathways. *Synapse* 2001a;39:152–160.

Sakai K, Gao XM, Tamminga CA. Scopolamine fails to diminish chronic haloperidol-induced purposeless chewing in rats. *Psychopharmacology* 2001b; 153:191–195.

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*. 1997; 132: 303-310.

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*. 1997; 132: 303-310.

Sams-Dodd F. A test of the predictive validity of animal models of schizophrenia based on phencyclidine and D-amphetamine. *Neuropsychopharmacology* 1998;18(4):293-304.

Sánchez-Santed F, de Bruin JP, Heinsbroek RP, Verwer RW. Spatial delayed alternation of rats in a T-maze: effects of neurotoxic lesions of the medial

prefrontal cortex and of T-maze rotations. *Behav Brain Res* 1997;84(1-2):73-9.

Santacana MP. El condicionamiento de ratas en laberintos: Técnicas básicas. *Revista de Psicología General y Aplicada, Madrid* 1978;33(154):899-913.

Sapolsky RM, Uno H, Rebert CS, Finch CE. Hippocampal damage associated with prolonged glucocorticoid exposure in primates. *J Neurosci* 1990;10(9):2897-2902.

Schell AM, Wynn JK, Dawson ME, Sinaii N, Niebala CB. Automatic and controlled attentional processes in startle eyeblink modification: effects of habituation of the prepulse. *Psychophysiology* 2000;37(4):409-417.

Schell AM, Wynn JK, Dawson ME, Sinaii N, Niebala CB. Automatic and controlled attentional processes in startle eyeblink modification: effects of habituation of the prepulse. *Psychophysiology* 2000;37(4):409-417.

Scherk H, Falkai P. Effects of antipsychotics on brain structure. *Curr Opin Psychiatry* 2006; 19(2):145-150.

Schotte A, Janssen PF, Gommeren W, Luyten WH, Van Gompel P, Lesage AS, De Loore K, Leysen JE. Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: in vitro and in vivo receptor binding. *Psychopharmacology (Berl)* 1996;124(1-2):57-73.

Schroeder H, Grecksch, G, Becker A, Bogert, B, Hoellt V. Alterations of the dopaminergic and glutamatergic neurotransmission in adult rats with postnatal ibotenic acid hippocampal lesion. *Psychopharmacology (Berl)* 1999;145, 61-66.

Schroeder U, Schroeder H, Schwegler H, Sabel BA. Neuroleptics ameliorate phencyclidine-induced impairments of short-term memory. *Br J Pharmacol* 2000;130(1):33-40.

Selemon LD, Lidow MS, Goldman-Rakic PS. Increased volume and glial density in primate prefrontal cortex associated with chronic antipsychotic drug exposure. *Biol Psychiatry* 1999;46(2):161-72.

Sgambato V, Abo V, Rogard M, Besson MJ, Deniau JM. Effect of electrical stimulation of the cerebral cortex on the expression of the Fos protein in the basal ganglia. *Neuroscience* 1997;81(1):93-112.

Sharma T, Mockler D. The cognitive efficacy of atypical antipsychotics in schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol*. 1998;18(2) (Suppl 1):12S-9S. Review.

Silva-Gomez AB, Bermudez M, Quirion R, Srivastava LK, Picazo O, Flores G. Comparative behavioural changes between male and female postpubertal rats following neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Brain Res*. 2003a; 973: 285-292.

Silva-Gomez AB, Bermudez M, Quirion R, Srivastava LK, Picazo O, Flores G. Comparative behavioural changes between male and female postpubertal rats following neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Brain Res*. 2003a; 973: 285-292.

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;30;973(2):285-92.

Simposium terapéutico. 2007. (<http://www.simposiumterapeutico.pt>).

Skarsfeldt T. Differential effect of antipsychotics on place navigation of rats in the Morris water maze. A comparative study between novel and reference antipsychotics. *Psychopharmacology (Berl)* 1996;124(1-2):126-33.

Snoeck E, Van Peer A, Sack M, Horton M, Mannens G, Woestenborghs R, Meibach R, Heykants J. Influence of age, renal and liver impairment on the pharmacokinetics of risperidone in man. *Psychopharmacology (Berl)* 1995;122(3):223-229.

Southard EE. On the topographical distribution of cortex lesions and anomalies in dementia praecox, with some account of their functional significance. *American Journal of Insanity* 1915;71:603-71.

Stanford SC. The Open Field Test: reinventing the wheel. *J Psychopharmacol* 2007;21(2):134-135.

Stark JL, Lyons JA, Cross AH. Interferon-gamma produced by encephalitogenic cells induces suppressors of cytokine signaling in primary murine astrocytes. *J Neuroimmunol* 2004;151(1-2):195-200.

Steffek AE, McCullumsmith RE, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Cortical expression of glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase is decreased in schizophrenia. *Schizophr Res* 2008;103(1-3):71-82.

Steiner HX, McBean GJ, Köhler C, Roberts PJ, Schwarcz R. Ibotenate-induced neuronal degeneration in immature rat brain. *Brain Res* 1984; 307: 117-124.

Steward O. Topographic organization of the projections from the entorhinal area to the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol* 1976;167(3):285-314.

Stockmeier CA, DiCarlo JJ, Zhang Y, Thompson P, Meltzer HY. Characterization of typical and atypical antipsychotic drugs based on in vivo occupancy of serotonin₂ and dopamine₂ receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;266(3):1374-1384.

Strange PG. Antipsychotic drugs: importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. *Pharmacol Rev* 2001 Mar;53(1):119-33.

Swerdlow NR, Auerbach P, Monroe SM, Hartston H, Geyer MA, Braff DL. Men are more inhibited than women by weak prepulses. *Biol Psychiatry* 1993; 34(4):253-60.

Swerdlow NR, Bakshi V, Geyer MA. Seroquel restores sensorimotor gating in phencyclidine-treated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;279(3):1290-1299.

Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA. Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think we know, and what we hope to know soon. *Behav Pharmacol* 2000;11(3-4):185-204.

Swerdlow NR, Caine SB, Geyer MA. Regionally selective effects of intracerebral dopamine infusion on sensorimotor gating of the startle reflex in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1992;108(1-2):189-195.

Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology (Berl)* 2001;156(2-3):194-215.

Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges.

Psychopharmacology (Berl) 2001;156(2-3):194-215.

Swerdlow NR, Geyer MA. Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophr Bull* 1998;24(2):285-301.

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

Swerdlow NR, Paulsen J, Braff DL, Butters N, Geyer MA, Swenson MR. Impaired prepulse inhibition of acoustic and tactile startle response in patients with Huntington's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1995;58(2):192-200.

Szyf M, Detich N. Regulation of the DNA methylation machinery and its role in cellular transformation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;69:47-79. Review.

Takahashi LK, Kalin NH. 1989. Role of corticotropin-releasing factor in mediating the expression of defensive behavior.

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;87(2):160-5.

Tamminga CA, Dale JM, Goodman L, Kaneda H, Kaneda N (1990): Neuroleptic-induced vacuous chewing movements as an animal model of tardive dyskinesia: A study in three rat strains. *Psychopharmacology* 1990;102:474-78

Tamminga CA, Holcomb HH Phenotype of schizophrenia: a review and formulation. *Mol. Psychiatry* 2005; 10:27–39.

Terry AV Jr, Gearhart DA, Warner SE, Zhang G, Bartlett MG, Middlemore ML, Beck WD Jr, Mahadik SP, Waller JL. Oral haloperidol or risperidone treatment in rats: temporal effects on nerve growth factor receptors, cholinergic neurons, and memory performance. *Neuroscience* 2007;146(3):1316-32.

Terry Jr AV, Gearhart DA, Mahadik SP, Warsi S, Davis LW, Waller JL. Chronic exposure to typical or atypical antipsychotics in rodents: temporal effects on central $\alpha 7$ nicotinic Acetylcholine receptors. *Neuroscience* 2005;136:519–29.

Terry Jr AV, Gearhart DA, Mahadik SP, Warsi S, Waller JL. Chronic treatment with first or second generation antipsychotics in rodents: effects on high affinity nicotinic and muscarinic acetylcholine receptors in the brain. *Neuroscience* 2006;140(4):1277–87.

Thorndike E. Some Experiments on Animal Intelligence. *Science* 1898; 7(181):818-824.

Tomasiewicz H, Ono K, Yee D, Thompson C, Golidis C, Rutishauser U, Magnuson T. Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (NCAM-180) produces distinct defects in the central nervous system. *Neuron* 1993;11(6):1163-1174.

Tomelleri L, Jogia J, Perlini C, Bellani M, Ferro A, Rambaldelli G, Tansella M, Frangou S, Brambilla P; Neuroimaging Network of the ECNP networks initiative. Brain structural changes associated with chronicity and antipsychotic treatment in schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol* 2009;19(12):835-40.

Toro CT, Deakin JF. Adult neurogenesis and schizophrenia: a window on abnormal early brain development? *Schizophr Res* 2007;90(1-3):1-14.

Toro CT, Hallak JE, Dunham JS, Deakin JF. Glial fibrillary acidic protein and glutamine synthetase in subregions of prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorder. *Neurosci Lett* 2006;404(3):276-81.

Treit D, Fundytus M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;31(4):959-62.

Tsai y Cols., 2002.

Tseng KY, Amin F, Lewis BL, O'Donnell P. Altered prefrontal cortical metabolic response to mesocortical activation in adult animals with a neonatal ventral hippocampal lesion. *Biol Psychiatry* 2006;60(6):585-90.

Tseng KY, Lewis BL, Hashimoto T, Sesack SR, Kloc M, Lewis DA, O'Donnell P. A neonatal ventral hippocampal lesion causes functional deficits in adult prefrontal cortical interneurons. *J Neurosci* 2008;28(48):12691-9.

Tseng KY, O'Donnell P. D2 dopamine receptors recruit a GABA component for their attenuation of excitatory synaptic transmission in the adult rat prefrontal

cortex. *Synapse* 2007;61(10):843-50.

Tseng KY, O'Donnell P. Post-pubertal emergence of prefrontal cortical up states induced by D1-NMDA co-activation. *Cereb Cortex* 2005;15(1):49-57.

Tseng KY, Snyder-Keller A, O'Donnell P. Dopaminergic modulation of striatal plateau depolarizations in corticostriatal organotypic cocultures. *Psychopharmacology (Berl)* 2007;191(3):627-40.

Tzschentke TM. Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system. *Prog Neurobiol* 2001;63(3):241-320. Review.

Valls-Solé J. Acoustic and somatosensory prepulse modulation of the blink reflex and the reaction. *Brainstem Reflexes and Functions. Eds. Litofinter, S.A. Madrid, 1998;119-131.*

Van Eden CG, Uylings HB. Cytoarchitectonic development of the prefrontal cortex in the rat. *J Comp Neurol* 1985; 241: 253-267.

Van Eden CG. Development of connections between the mediodorsal nucleus of the thalamus and the prefrontal cortex in the rat. *J Comp Neurol* 1986; 244: 349-359.

Van Haaren F, van Zijderveld G, van Hest A, de Bruin JP, van Eden CG, van de Poll NE. Acquisition of conditional associations and operant delayed spatial response alternation: effects of lesions in the medial prefrontal cortex. *Behav Neurosci* 1988;102(4):481-8.

Van Praag H, Alberch J, Perez-Navarro E, Wu H, Qu PM, Black IB, Dreyfus CF. Unilateral neonatal hippocampal lesion alters septal innervation and trophism of the entorhinal cortex. *Exp Neurol* 1996;141:130-140.

Varty GB, Bakshi VP, Geyer MA. M100907, a serotonin 5-HT_{2A} receptor antagonist and putative antipsychotic, blocks dizocilpine-induced prepulse inhibition deficits in Sprague-Dawley and Wistar rats. *Neuropsychopharmacology* 1999;20(4):311-21.

Varty GB, Higgins GA. Reversal of dizocilpine-induced disruption of prepulse inhibition of an acoustic startle response by the 5-HT₂ receptor antagonist ketanserin. *Eur J Pharmacol* 1995;287(2):201-5.

Velakoulis D, Pantelis C, McGorry PD, Dudgeon P, Brewer W, Cook M,

Verwer RW, Meijer RJ, Van Uum HF, Witter MP. Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex. *Hippocampus* 1997;7(4):397-402.

Vollenweider FX, Vontobel P, Hell D, Leenders KL. 5-HT modulation of dopamine release in basal ganglia in psilocybin-induced psychosis in man--a PET study with [¹¹C]raclopride. *Neuropsychopharmacology* 1999 May;20(5):424-33.

Waddington JL. Sight and insight: regional cerebral metabolic activity in schizophrenia visualised by positron emission tomography, and competing neurodevelopmental perspective. *Br J Psychiatry* 1990;156:615-619.

Walker E, Lewine RJ. Prediction of adult-onset schizophrenia from childhood home movies of the patients. *Am J Psychiatry* 1990;147:1052-56.

Walsh RN, Cummins RA. The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 1976;83(3):482-504.

Wan RQ, Giovanni A, Kafka SH, Corbett R. Neonatal hippocampal lesions induced hyperresponsiveness to amphetamine: behavioral and in vivo microdialysis studies. *Behav Brain Res.* 1996; 78: 211-223.

Wan RQ, Giovanni A, Kafka SH, Corbett R. Neonatal hippocampal lesions induced hyperresponsiveness to amphetamine: behavioral and in vivo microdialysis studies. *Behav Brain Res.* 1996; 78: 211-223.

Wan RQ, Hartman H, Corbett R. Alteration of dopamine metabolites in CSF and behavioral impairments induced by neonatal hippocampal lesions. *Physiol Behav.* 1998; 65: 429-436.

Wan RQ, Hartman H, Corbett R. Alteration of dopamine metabolites in CSF and behavioral impairments induced by neonatal hippocampal lesions. *Physiol Behav.* 1998; 65: 429-436.

Wang HD, Dunnavant FD, Jarman T, Deutch AY. Effects of antipsychotic drugs on neurogenesis in the forebrain of the adult rat. *Neuropsychopharmacology* 2004;29(7):1230-1238.

Webster MJ, Knable MB, Johnston-Wilson N, Nagata K, Inagaki M, Yolken RH. Immunohistochemical localization of phosphorylated glial fibrillary acidic protein in the prefrontal cortex and hippocampus from patients with schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Brain Behav Immun* 2001;15(4):388-400.

Webster MJ, O'Grady J, Kleinman JE, Weickert CS. Glial fibrillary acidic protein mRNA levels in the cingulate cortex of individuals with depression, bipolar disorder and schizophrenia. *Neuroscience* 2005;133(2):453-61.

Weinberger DR. Schizophrenia as a neurodevelopmental disorder. In: Schizophrenia (Hirsch S.R., Weinberger DR, eds), *Cambridge: Blackwell Science Ltd* 1995;293-323.

Weinberger DR, Lipska BK. Cortical maldevelopment, anti-psychotic drugs, and schizophrenia: a search for common ground. *Schizophr Res* 1995;16:87-110.

Weinberger DR, Zigun JR, Bartley AJ, Jones DW, Torrey EF. Anatomical abnormalities in the brains of monozygotic twins discordant and concordant for schizophrenia. *Clin Neuropharmacol* 1992;15 Suppl 1 Pt A:122A-123A.

Weinberger DR. Anteromedial temporal-prefrontal connectivity: A functional neuroanatomical system implicated in schizophrenia. In: Carroll BJ BJ, ed. *Psychopathology and the Brain*. New York: Raven Press, 1991:25-39.

Weinberger DR. Cognitive dysfunction in schizophrenia - Neuropathological origins and prospects for treatment. *Biological Psychiatry* 1997;42(1),Suppl 1:131S.

Weinberger DR. Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1987;44(7):660-9.

Weinberger DR. The pathogenesis of schizophrenia: a neurodevelopmental theory. In: *The Neurology of Schizophrenia* (Nasrallah HA, Weinberger DR, eds), *Amsterdam: Elsevier* 1986;397-406.

Whitworth AB, Honeder M, Kremser C, Kemmler G, Felber S, Hausmann A, Wanko C, Wechdorn H, Aichner F, Stuppaeck CH, Fleischhacker WW. Hippocampal volume reduction in male schizophrenic patients. *Schizophr Res* 1998;31(2-3):73-81.

Willner P. The dopamine hypothesis of schizophrenia: current status, future prospects. *Int Clin Psychopharmacol* 1997;12(6):297-308. Review.

Wolff MC, Leander JD. Comparison of the effects of antipsychotics on a delayed radial maze task in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 2003;168(4):410-6.

Wong AH, Lipska BK, Likhodi O, Boffa E, Weinberger DR, Kennedy JL, Van Tol HH. Cortical gene expression in the neonatal ventral-hippocampal lesion rat model. *Schizophrenia Res.* 2005; 77: 261-267.

Wong AH, Lipska BK, Likhodi O, Boffa E, Weinberger DR, Kennedy JL, Van Tol HH. Cortical gene expression in the neonatal ventral-hippocampal lesion rat model. *Schizophrenia Res.* 2005; 77: 261-267.

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: 17-25.

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: 17-25.

Wood GK, Quirion R, Srivastava LK. Early environment contributes to developmental disruption of MPFC after neonatal ventral hippocampal lesions in rats. *Synapse* 2003;50: 223-232.

Wood SJ, Velakoulis D, Smith DJ, Bond D, Stuart GW, McGorry PD, Brewer WJ, Bridle N, Eritiaia J, Desmond P, Singh B, Copolov D, Pantelis C. A longitudinal study of hippocampal volume in first episode psychosis and chronic schizophrenia. *Schizophr Res* 2001;52(1-2):37-46.

Wu MF, Krueger J, Ison JR, Gerrard RL. Startle reflex inhibition in the rat: its persistence after extended repetition of the inhibitory stimulus. *J Exp Psychol Anim Behav Process* 1984;10(2):221-228.

Xia Z, Hufeisen SJ, Gray JA, Roth BL. The PDZ-binding domain is essential for the dendritic targeting of 5-HT_{2A} serotonin receptors in cortical pyramidal neurons in vitro. *Neuroscience* 2003;122(4):907-20.

Yamada S, Harano M, Annoh N, Nakamura K, Tanaka M. Involvement of

serotonin 2A receptors in phencyclidine-induced disruption of prepulse inhibition of the acoustic startle in rats. *Biol Psychiatry* 1999, 46(6):832-838.

Yeomans JS, Frankland PW. The acoustic startle reflex: neurons and connections. *Brain Res Brain Res Rev* 1995;21(3):301-314.

Zhang K, Tarazi FI, Kula NS, Baldessarini RJ, Neumeyer JL. Selective alkylation of dopamine D2 and D4 receptors in rat brain by N-(p-isothiocyanatophenethyl)siperone. *Neurosci Lett* 1999;274(3):155-8.

Zhang M, Ballard ME, Kohlhaas KL, Browman KE, Jongen-Rêlo AL, van Unger LV, Fox GB, Gross G, Decker MW, Dresher KU, Rueter LE. Effect of dopamine D3 antagonists on PPI in DBA/2J mice or PPI deficits induced by neonatal ventral hippocampal lesions in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 31: 1382-1392.

Zhang M, Ballard ME, Kohlhaas KL, Browman KE, Jongen-Rêlo AL, van Unger LV, Fox GB, Gross G, Decker MW, Dresher KU, Rueter LE. Effect of dopamine D3 antagonists on PPI in DBA/2J mice or PPI deficits induced by neonatal ventral hippocampal lesions in rats. *Neuropsychopharmacology*. 2006; 31: 1382-1392.

Zuo DY, Cao Y, Zhang L, Wang HF, Wu YL. Effects of acute and chronic administration of MK-801 on c-Fos protein expression in mice brain regions implicated in schizophrenia with or without clozapine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2009;33(2):290-5.

VIII – ANEXOS

ANEXO I

Los criterios internacionales de diagnóstico de Esquizofrenia, acorde al DSM-IV TR y el CIE-10, son los siguientes:

A. *Síntomas característicos*: dos (o más) de los siguientes síntomas durante al menos 6 meses, exhibiendo al menos 1 mes síntomas activos (menos tiempo si se recibe el tratamiento apropiado):

1. Ideas delirantes,
2. alucinaciones,
3. lenguaje desorganizado,
4. comportamiento desorganizado o catatónico (frecuente descarrilamiento o incoherencia),
5. síntomas negativos (aplanamiento afectivo, alogia o abulia)

El criterio A puede ser suficiente *per se* para el diagnóstico cuando las ideas delirantes son extrañas, o las alucinaciones consisten en voces que hacen un comentario reiterado sobre los actos y pensamientos del paciente, o son dos o más voces que dialogan entre ellas.

B. *Disfunción social/ocupacional*: Una o más áreas del funcionamiento como el trabajo, relaciones interpersonales o el cuidado de uno mismo están indudablemente deterioradas en comparación con lo que sucedía antes del inicio de los síntomas activos. Si la enfermedad empieza en la infancia o adolescencia, existe un fracaso en los niveles interpersonales, académicos u ocupacionales.

C. *Duración*: Síntomas de la enfermedad durante al menos 6 meses con al menos 1 mes de síntomas activos (menos tiempo si se recibe tratamiento apropiado). Puede incluir los periodos prodrómicos y con sintomatología residual, en los cuales la evidencia del trastorno se da únicamente mediante síntomas negativos o dos o más de los síntomas enumerados en el criterio A, pero de forma atenuada (por ejemplo, pensamientos raros, percepciones inusuales).

D. *Exclusión de trastorno esquizoafectivo o trastornos del humor*: Se ha de hacer el diagnóstico diferencial con el trastorno de personalidad esquizoafectivo y también con trastornos del humor mediante los siguientes criterios (1) el paciente no ha tenido ningún episodio de depresión mayor, manía, o episodios mixtos durante la fase activa de la enfermedad o (2), si el paciente ha tenido algún de estos episodios durante la fase activa de la enfermedad, éstos han sido de corta duración, en comparación con la duración total del periodo activo y residual.

E. *Exclusión de abuso de sustancias u otra condición médica*: El trastorno no es debido a los efectos fisiológicos directos de una sustancia (abuso de drogas, medicación), ni debido a patología médica subyacente.

F. *Relacionado con un trastorno psiquiátrico del desarrollo*: Si existe historia documentada de autismo u otro trastorno del desarrollo, el diagnóstico adicional de esquizofrenia se hace solamente si ocurren delirios y alucinaciones durante al menos un mes (o menos, si son debidamente tratadas).

Ningún síntoma es patognomónico de esquizofrenia. El diagnóstico se hace mediante una constelación de signos y síntomas asociados a un deterioro del funcionamiento social y ocupacional.

Clasificación de la evolución longitudinal (sólo se puede aplicar después de haber transcurrido por lo menos 1 año a partir del inicio de los síntomas de la fase activa):

- Episódica con Síntomas Residuales Interepisódicos (los episodios se definen por la reaparición de síntomas psicóticos destacados); *Especificar también si*: Con síntomas negativos predominantes.
- Episódica sin Síntomas Residuales Interepisódicos
- Continua (los síntomas psicóticos dominantes están presentes durante el período de observación); *Especificar también si*: Con síntomas negativos predominantes.
- Episodio único en remisión parcial.
- Episodio único en remisión completa
- Otro patrón sin especificación.

ANEXO II

II- Protocolo para la visualización de parvoalbúmina (PV28)

1. Tres lavados de 10 minutos de duración en una solución TBS 0,05 M a pH 8.
2. Bloqueo del marcaje inespecífico mediante incubación, durante 1 hora, con suero fetal de cabra 5% en una solución TBS-Tx.
3. Incubación, durante 48 horas a 4° C, con el anticuerpo primario anti-PV28 obtenido en conejo (dilución 1/5000) en una solución TBS 0,05 M + 10% SFV + 0,5% Tx.
4. Tres lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,5 M a pH 8.
5. Un lavado de 15 minutos en una solución TBS 0,05 M a pH 8.
6. Incubación, durante 120 minutos a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario biotinado anti-conejo producido en cabra (dilución 1/200) en una solución TBS-Tx 0,05 M pH 8.
7. Tres lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,5 M a pH 8.
8. Dos lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,05 M a pH 8.
9. Incubación, durante 90 minutos a temperatura ambiente, con el complejo ABC (según las especificaciones del fabricante) disuelto en TBS-Tx a pH 8.
10. Dos lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,5 M a pH 8.
11. Dos lavados de 10 minutos en una solución Tris HCl (Tris[hidroximetil]aminometano, 50 mM) a pH 8.
12. Incubación entre 10 y 15 minutos en una solución de DAB 0,016% y H₂O₂ 0,006% en Tris HCl 0,05 M a pH 8.
13. Dos lavados de 10 minutos en una solución Tris HCl a pH 8.

III- Protocolo para la visualización de la proteína FOS

1. Tres lavados de 10 minutos de duración en una solución TBS 0,05 M a pH 8.
2. Bloqueo del marcaje inespecífico mediante incubación, durante 1 hora, con suero fetal de cabra 5% en una solución TBS-Tx.
3. Incubación, durante 48 horas a 4° C, con el anticuerpo primario anti-FOS obtenido en conejo (dilución 1/2500) en una solución TBS 0,05 M + 10% SFV + 0,5% Tx.
4. Tres lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,5 M a pH 8.
5. Un lavado de 15 minutos en una solución TBS 0,05 M a pH 8.
6. Incubación, durante 120 minutos a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario biotinado anti-conejo producido en cabra (dilución 1/200) en una solución TBS-Tx 0,05 M pH 8.
7. Tres lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,5 M a pH 8.
8. Dos lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,05 M a pH 8.
9. Incubación, durante 90 minutos a temperatura ambiente, con el complejo ABC (según las especificaciones del fabricante) disuelto en TBS-Tx a pH 8.
10. Dos lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,5 M a pH 8.
11. Dos lavados de 10 minutos en una solución Tris HCl (Tris[hidroximetil]aminometano, 50 mM) a pH 8.
12. Incubación entre 10 y 15 minutos en una solución de DAB 0,016% y H₂O₂ 0,006% en Tris HCl 0,05 M a pH 8.
13. Dos lavados de 10 minutos en una solución Tris HCl a pH 8.

IV- Protocolo para la visualización de CaBP d28K

1. Tres lavados de 10 minutos de duración en una solución TBS 0,05 M a pH 8.
2. Bloqueo del marcaje inespecífico mediante incubación, durante 1 hora, con suero fetal de cabra 5% en una solución TBS-Tx.
3. Incubación, durante 48 horas a 4° C, con el anticuerpo primario anti-CaBP obtenido en conejo (dilución 1/10000) en una solución TBS 0,05 M + 10% SFV + 0,5% Tx.
4. Tres lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,5 M a pH 8.
5. Un lavado de 15 minutos en una solución TBS 0,05 M a pH 8.
6. Incubación, durante 120 minutos a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario biotinado anti-conejo producido en cabra (dilución 1/200) en una solución TBS-Tx 0,05 M pH 8.
7. Tres lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,5 M a pH 8.
8. Dos lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,05 M a pH 8.
9. Incubación, durante 90 minutos a temperatura ambiente, con el complejo ABC (según las especificaciones del fabricante) disuelto en TBS-Tx a pH 8.
10. Dos lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,5 M a pH 8.
11. Dos lavados de 10 minutos en una solución Tris HCl (Tris[hidroximetil]aminometano, 50 mM) a pH 8.
12. Incubación entre 10 y 15 minutos en una solución de DAB 0,016% y H₂O₂ 0,006% en Tris HCl 0,05 M a pH 8.
13. Dos lavados de 10 minutos en una solución Tris HCl a pH 8.

VII- Protocolo para la visualización de GFAP

1. Tres lavados de 10 minutos de duración en una solución TBS 0,05 M a pH 8.
2. Bloqueo del marcaje inespecífico mediante incubación, durante 1 hora, con suero fetal de cabra 5% en una solución TBS-Tx.
3. Incubación, durante 48 horas a 4° C, con el anticuerpo primario anti-GFAP obtenido en conejo (dilución 1/500) en una solución TBS 0,05 M + 10% SFV + 0,5% Tx.
4. Tres lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,5 M a pH 8.
5. Un lavado de 15 minutos en una solución TBS 0,05 M a pH 8.
6. Incubación, durante 120 minutos a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario biotinado anti-conejo producido en cabra (dilución 1/200) en una solución TBS-Tx 0,05 M pH 8.
7. Tres lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,5 M a pH 8.
8. Dos lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,05 M a pH 8.
9. Incubación, durante 90 minutos a temperatura ambiente, con el complejo ABC (según las especificaciones del fabricante) disuelto en TBS-Tx a pH 8.
10. Dos lavados de 10 minutos en una solución TBS 0,5 M a pH 8.
11. Dos lavados de 10 minutos en una solución Tris HCl (Tris[hidroximetil]aminometano, 50 mM) a pH 8.
12. Incubación entre 10 y 15 minutos en una solución de DAB 0,016% y H₂O₂ 0,006% en Tris HCl 0,05 M a pH 8.
13. Dos lavados de 10 minutos en una solución Tris HCl a pH 8.

IX- Protocolo para la coloración de Nissl

1. Colocar en alcohol 95 % durante 5 min.
2. Colocar en alcohol 70 % durante 1 min.
3. Colocar en alcohol 50 % durante 1 min.
4. Colorear en la SOLUCIÓN DE VIOLETA DE CRESILO entre 2 y 5 min.
5. Lavar el exceso de colorante en agua destilada.
6. Colocar en alcohol acético entre 4 y 10 min.
7. Colocar en alcohol 95 % durante 1 min.
8. Colocar en alcohol 100 % durante 1 min.
9. Aclarar en xileno.
10. Cubrir con Entellan Neu (Merck, Darmstadt, Alemania).

SOLUCIÓN DE VIOLETA DE CRESILO:

Cresil Fast Violet -----5 g
 Agua destilada* -----800 ml
 Alcohol absoluto ----- 200 ml
 Añadir 1 ml de ácido acético cada 200 ml de solución.

* calentar hasta 50° C el agua destilada para facilitar la disolución del Cresil Fast Violet, luego esperar que se enfríe para añadir alcohol absoluto.

X- Listado de compuestos y reactivos utilizados en el trabajo

| | | |
|--|-----------------------|---------------------|
| Complejo avidina biotina POD, ABC Kit® | Referencia PK-4000 | Compañía ©Vector |
|--|-----------------------|---------------------|

| Anticuerpos | Animal productor | Referencia | Compañía |
|--------------------|-------------------------|-------------------|--------------------------|
| Anti-CaBP | Conejo | CB 28 k | Swant |
| Anti-PV | Conejo | PV 28 | Swant |
| Anti-GFAP | Conejo | 08-0063 | Zymed |
| Anti-FOS | Conejo | SC 52 | Santa Cruz Biotechnology |
| Anti-IgG de conejo | Cabra | BA-1000 | ©Vector |

| compuestos químicos | Fórmula | Referencia | Compañía |
|--|--|------------|-------------|
| Ácido clorhídrico, 35% | HCl | 319 | ©Merck |
| Carbógeno (gas) de oxígeno | CO ₂ /O | | ©Española |
| Carbonato sódico | NaHCO ₃ | 6329 | ©Merck |
| Cloruro potásico | KCl | 4936 | ©Merck |
| Cloruro sódico | NaCl | 6404 | ©Merck |
| 3,3' Diaminobencidina | | D-9015 | ©Sigma |
| Disodio hidrógenofosfato anhidro | Na ₂ HPO ₄ | 6586 | ©Merck |
| Entellan®neu | | 7961 | ©Merck |
| Etanol | C ₂ H ₆ O | E-08110 | ©Panreac |
| Gelatina | | 4078 | ©Merck |
| Hidróxido sódico | NaOH | 28245298 | ©Prolabo |
| Níquel amoniosulfatoso CarloErba | Ni(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O | 464545 | ©Farmitalia |
| Paraformaldehído | (CH ₂ O) _n | 28794295 | ©Prolabo |
| Peróxido de hidrógeno, 30% | H ₂ O ₂ | 8597 | ©Merck |
| Sacarosa | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | 27478296 | ©Prolabo |
| Sodio hidrógenofosfato monohidrato | NaH ₂ PO ₄ ·HO ₂ | 6346 | ©Merck |
| Triton® X-100 | C ₃₄ H ₆₂ O ₁₁ | 860 | ©Merck |
| Trizma®, Tris[hidroximetil] aminometano | C ₄ H ₁₁ NO ₃ | T-8524 | ©Sigma |
| Violeta de cresilo | | C-1791 | ©Sigma |
| Xileno | | 131769 | ©Panreac |

| Compañías suministradoras | | |
|---------------------------|----------------|----------|
| ©Chemicon | Temecula, CA | USA |
| ©Española de oxígeno | Valladolid | España |
| ©Farmitalia Carlo Erba | Milán | Italia |
| ©Merck | Darmstadt | Alemania |
| ©Molecular Probes | Eugene, OR | USA |
| ©Probus | Barcelona | España |
| ©Prolabo | Barcelona | España |
| ©Sigma | Madrid | España |
| ©Vector | Burlingame, CA | USA |