



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Farmacia y Bioquímica

Lugar de Trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)

**“Deleción selectiva del receptor dopaminérgico D2:  
Estudio de la alteración del balance inhibitorio-  
excitatorio en el comportamiento de ratones”**

Tesis para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires

**Lic. María Eugenia Tomasella**

Director de Tesis: Dr. Diego M. Gelman

Consejero de estudios: Dr. Christian Hotch

**2017**

## **Deleción selectiva del receptor dopaminérgico D2: Estudio de la alteración del balance inhibitorio-excitatorio en el comportamiento de ratones**

### **RESUMEN**

La esquizofrenia es un desorden mental que afecta a aproximadamente el 1% de la población mundial, constituyendo un síndrome complejo del neurodesarrollo, siendo afectada por factores genéticos y ambientales, y caracterizada por una colección heterogénea de síntomas.

Los síntomas de la esquizofrenia han sido clasificados en tres categorías: los positivos, que son aquellos que se adicionan al comportamiento normal, como los delirios y las alucinaciones; los negativos, aquellos que se sustraen de la personalidad normal, como la falta de motivación y sociabilización, y los síntomas cognitivos, que implican alteraciones en los procesos de funciones ejecutivas y de memoria.

Para el diagnóstico de pacientes con esquizofrenia no existen aún hoy métodos de diagnósticos confiables. El criterio de diagnóstico actual se basa en experiencias propias de quien padece la enfermedad y de sus familiares, así como observaciones del comportamiento, fundamentalmente síntomas de psicosis. El tratamiento farmacológico por excelencia prescripto hoy en día son los antipsicóticos, que se unen y bloquean al receptor de dopamina D2 (DRD2), los cuales son principalmente efectivos para los síntomas positivos, no existiendo un tratamiento eficaz para los síntomas negativos y cognitivos de la enfermedad. Se han postulado varias hipótesis acerca del origen de esta devastadora enfermedad. La hipótesis dopaminérgica plantea que la dopamina y mecanismos

dopaminérgicos son centrales en la esquizofrenia, y en particular en la psicosis, constituyendo una de las ideas más perdurables de la psiquiatría. Su versión más moderna propone un incremento de dopamina en el estriado, quien sería responsable de los síntomas psicóticos, concomitantemente con una disminución de los niveles de dopamina en la corteza, como mediador potencial de los síntomas cognitivos de la enfermedad. La hipótesis GABAérgica se fundamenta en el hecho de que estudios de cerebros postmortem de humanos con esquizofrenia demostraron déficits en la corteza prefrontal (CPF), observándose un número reducido de sinapsis GABAérgicas en pacientes con esta enfermedad, así como también una reducción en la expresión de la enzima GAD67, una de las enzimas que sintetiza el neurotransmisor inhibitorio ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA). Por otro lado, muchas líneas de investigación han descripto que las interneuronas GABAérgicas que expresan el neuropéptido parvalbúmina (PV) son las que se encuentran principalmente afectadas. La hipótesis glutamatérgica se postuló tras la observación de que antagonistas del receptor de N-Metil-D-Aspartato (NMDAR), como la feniclidina (PCP) y la ketamina, las cuales son utilizadas como drogas de abuso o recreativas, producen síntomas psicóticos y alteraciones cognitivas reminiscentes a la esquizofrenia. Dicha hipótesis establece la hipofunción de los NMDAR, cuenta con gran sustento experimental, y fue convalidada a través de varias líneas de modelos animales modificados genéticamente, con mutaciones en genes que codifican para las subunidades proteicas del NMDAR, que exhibieron fenotipos con características reminiscentes a la esquizofrenia.

Se han relacionado a las disrupciones del sistema dopaminérgico con desordenes psiquiátricos como la esquizofrenia, habiendo evidencia sustancial que sugiere que la

psicosis está asociada con la desregulación de la función del sistema dopaminérgico subcortical. Se postula que existe un sistema dopaminérgico hiper responsivo en esquizofrenia, y esto es apoyado por el descubrimiento de que drogas que incrementan la liberación de dopamina o la transmisión dopaminérgica, como la anfetamina o L-DOPA, exacerbaban la psicosis en pacientes con esquizofrenia o incluso generan síntomas similares a esta enfermedad en individuos sanos. Evidencia creciente plantea la presencia de un hipocampo hiperactivo, que conlleva a un incremento en el disparo tónico de neuronas dopaminérgicas y a un estado hiper responsivo del mismo sistema DA. Más aún, dada las proyecciones del hipocampo ventral (vHip) hacia la CPF, la amígdala baso lateral (BLA) y otras regiones involucradas en la cognición y las emociones, es posible que esta hiperactividad hipocampal también juegue un rol en los déficits cognitivos y negativos de la esquizofrenia.

Constituye un desafío construir modelos animales que permitan estudiar enfermedades psiquiátricas con etiología aún desconocida como la esquizofrenia. En este trabajo, se generó un modelo animal de ratón en donde se delecionó selectivamente el DRD2 de las interneuronas de PV (IPV), observándose características reminiscentes a la esquizofrenia. Esta línea mutante condicional exhibió alteraciones a nivel celular, molecular, fisiológico y de comportamiento, presentando fenotipos que son observados en pacientes con esta enfermedad. Además, los experimentos farmacológicos indicaron la importancia del DRD2 en las IPV para la efectividad de algunos antipsicóticos de los cuales aún hoy en día no se conoce claramente su mecanismo de acción.

Las causas que originan esta enfermedad son aún hoy desconocidas y, desafortunadamente, no existen marcadores biológicos confiables que permitan predecirla. La línea de ratón generado en el presente trabajo pretende constituirse en un nuevo modelo animal para poder estudiar la esquizofrenia en un camino hacia comprender su etiología.

## **Selective deletion of dopamine D2 receptor: Study of de excitatory/inhibitory balance alterations in mice behavior**

### **ABSTRACT**

Schizophrenia is a mental disorder that affects approximately 1% of world's population, and is considered a complex neurodevelopmental disorder affected by genetic and environmental factors, and characterized by a heterogeneous collection of symptoms.

Schizophrenia symptoms have been classified in three main categories: the positive symptoms, which are added to the normal behavior, such as hallucinations and delusions; the negative symptoms, the ones that are subtracted from the normal behavior, such as anhedonia and lack of sociability; and the cognitive symptoms, including altered memory and executive functions deficits.

Still today, there are no reliable diagnostic methods available for the diagnosis of schizophrenia. Diagnosis criteria is based on patients own experiences and from their relatives, including behavioral observations, being psychosis the most relevant. The main pharmacologic treatment prescription is the use of antipsychotic drugs, which are mostly effective for the positive symptoms, with no effective treatment for cognitive and negative symptoms. In general, antipsychotics bind to and block dopamine D2 receptors.

There are three main hypotheses about schizophrenia's origin. The dopaminergic hypothesis of this disease has been one of the most enduring ideas in psychiatry and postulates an excessive dopaminergic neurotransmission to be at the root of the disease. In its latest version, the dopaminergic hypothesis states a striatal hyperdopaminergia and

cortical hypodopaminergia, as the mediator of the cognitive symptoms of schizophrenia. The GABAergic hypothesis is based on the fact that postmortem studies from patients with schizophrenia have demonstrated GABAergic deficits in prefrontal cortex (PFC), with a reduced number of GABAergic synapses, and also a reduced expression of one of the enzymes that synthesizes the  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA): GAD67. Moreover, many lines of evidence point to a particular subtype of GABAergic interneurons as the most affected, the ones that express the protein parvalbumin. The glutamatergic hypothesis has been postulated after the observation that N-Metil-D-Aspartate receptors (NMDAR) antagonists, like phencyclidine (PCP) and ketamine, commonly used as abuse or recreative drugs, produce psychotic symptoms and cognitive alterations reminiscent to those observed in schizophrenia. This hypothesis establishes NMDAR hypofunction as the cause of schizophrenia and is supported by several genetically modified animal models, including mutations in genes that encode for NMDAR subunits, which exhibits phenotypes with comparable characteristics observed in patients.

Dopaminergic system dysfunctions are intimately related with psychiatric disorders like schizophrenia. A hyperresponsive dopaminergic system has been proposed, supported by the discovery that there are drugs that increase dopamine release or dopamine neurotransmission, as amphetamine or L-DOPA, exacerbating psychosis in patients with the disease or even generating symptoms reminiscent to schizophrenia in healthy controls. Increasing evidence suggests the presence of a hyperactive hippocampus, implying an increase in dopaminergic neurons tonic fire. Moreover, as ventral hippocampal (vHip) neurons project to the PFC, the basolateral amygdala (BLA) and other regions that are

involved in emotions and cognition, it is plausible that this hippocampal hyperactivity plays an important role in cognitive and negative symptoms of the disease.

It is a major challenge to develop reliable animal models to study psychiatric diseases as schizophrenia. In the present work, a conditional mutant mouse line was generated, where dopamine D2 receptor was specifically deleted from parvalbumin interneurons. This conditional mutant mouse line exhibited cellular, molecular, physiological and behavioral defects reminiscent to schizophrenia. In addition, pharmacological experiments showed the importance of DRD2 from PVI for the effectiveness of antipsychotic drugs.

The origin of this disease is still unknown and, unfortunately, there are no biological markers that allow us to predict the onset of this devastating disease. The mouse line generated in the present work may be a new animal model to study schizophrenia.

# INDICE

## **Indice**

Introducción .....	16
Síntomas .....	16
El cerebro durante la adolescencia .....	18
Sistema GABAérgico .....	21
Balance E/I .....	22
Hipótesis sobre el origen de la esquizofrenia .....	23
Hipótesis Dopaminérgica .....	23
Hipótesis GABAérgica.....	25
Hipótesis Glutamatérgica .....	26
Sistema Dopaminérgico.....	27
Neuroanatomía del sistema dopaminérgico .....	28
Regulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas .....	30
Actividad celular de la dopamina .....	32
El sistema dopaminérgico y la esquizofrenia.....	33
Hiperactividad hipocampal .....	35
Modelos Animales para el estudio de enfermedades psiquiátricas .....	36
Farmacología de la esquizofrenia .....	37
Risperidona:.....	39
Aripiprazol: .....	39
Quinpirol:.....	40
Litio:.....	40
Hipótesis .....	43
Objetivo General.....	45
Objetivos Específicos .....	45
Materiales y Métodos .....	47
Generación de la línea mutante condicional DRD2 y genotipificado .....	47
Preparación de las rodajas cerebrales .....	49
Registros electrofisiológicos .....	50
Calibración de la fuerza del input para la activación de células de la granulosa .....	51

Registros de potencial de campo (RPC).....	52
Inmunohistoquímica y análisis de imagen.....	54
Hibridización in-situ.....	54
Transcripción reversa, reacción en cadenas de la polimerasa (RT-PCR).....	56
Análisis de proteínas por Western Blot.....	57
Inyección viral en corteza prefrontal y análisis de espinas dendríticas .....	58
Cromatografía líquida de alta resolución .....	59
Análisis de comportamiento .....	60
Actividad locomotora:.....	60
Laberinto en cruz levado:.....	61
Enterramiento de bolitas: .....	61
Laberinto en "Y"-alternancia espontánea:.....	61
Estudio de reconocimiento del objeto: .....	62
Estudio de anidamiento: .....	62
Tratamiento para rescate:.....	63
Análisis estadístico .....	64
Resultados Parte I: Deleción selectiva del receptor de dopamina D2 de las interneuronas de Parvalbúmina .....	67
Especificidad de la recombinasa Cre limitada a las interneuronas de Parvalbúmina .....	67
Estudio de regiones prototípicas dopaminérgicas.....	71
Análisis de las propiedades intrínsecas de las interneuronas de Parvalbúmina .....	72
Resultados Parte II: Estudio de los efectos de la deleción selectiva del receptor D2 en las interneuronas de parvalbúmina .....	77
Análisis de comportamiento .....	77
Alteraciones en la CPF .....	86
Estudio del hipocampo ventral .....	95
Resultados Parte III: Estudio de la actividad funcional del receptor de dopamina D2 en las interneuronas de Parvalbúmina .....	102
Regulación de la neurotransmisión dopaminérgica por Litio.....	102
Respuesta al tratamiento agudo con risperidona y aripiprazol.....	104
Utilización del modelo animal carente del DRD2 para el diseño de un tratamiento farmacológico crónico en la etapa periadolescente .....	106

Discusión .....	111
Conclusión .....	121
Referencias .....	123

### **Abreviaturas**

AMPC: adenosina monofosfato cíclica

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BLA: amígdala baso lateral

CPF: corteza prefrontal

Cr: calretinina

DOPAC: ácido 3,4-dihidroxifenilacético

DRD1: receptor de dopamina D1

DRD2: receptor de dopamina D2

DRD3: receptor de dopamina D3

DRD4: receptor de dopamina D4

DRD5: receptor de dopamina D5

E/I: excitación/inhibición

EstV: estriado ventral

GABA: ácido  $\gamma$ -amino butírico

GAD67: enzima glutamato descarboxilasa 67

Hip: hipocampo

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HVA: ácido homovanílico

IFI: inmunofluorescencia indirecta

IP: intraperitoneal

IPV: interneuronas de Parvalbúmina

ISH: hibridación in situ

mCPSEs: corrientes post sinápticas excitatorias mini

mCPSIs: corrientes post sinápticas inhibitorias mini

mM: milimolar

NAc núcleo accumbens

NMDAR: receptor de N-metil-D-Aspartato

NOR: del inglés, Novel object recognition test

NPi: neuronas piramidales

NPY: neuropéptido Y

P30: postnatal 30

P60: postnatal 60

PBS: buffer salino fosfato

PCP: feniclidina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PET: tomografía de emisión de positrones

PFA: paraformaldehído

PPTg: núcleo pedúnculo pontino

PV: Parvalbúmina

qPCR: PCR en tiempo real

RT-PCR: Transcripción reversa, reacción en cadenas de la polimerasa

SC: subcutáneo

SNC: sistema nervioso central

SNc: sustancia nigra pars compacta

SPECT: tomografía computarizada de emisión de fotones simples

TuO: tubérculo olfatorio

vHip: hipocampo ventral

VIP: péptido vasointestinal

VPa: pálido ventral

VTA: área tegmental ventral

# INTRODUCCIÓN

## **Introducción**

### **Esquizofrenia**

Hace más de 100 años se introdujo el término “esquizofrenia” para la descripción y el diagnóstico de la demencia precoz (Bleuler 1988; Moskowitz and Heim 2011). Es un desorden mental que afecta a aproximadamente el 1% de la población mundial, constituyendo un síndrome complejo del neurodesarrollo. Su incidencia no se encuentra vinculada a un contexto socioeconómico y cultural (Sartorius et al. 1986), es afectada por factores genéticos y ambientales, y es caracterizada por una colección heterogénea de síntomas, dentro de los que se incluyen delirios, desorden del pensamiento, paranoias, comportamiento social anormal y una falla en el entendimiento de la realidad (Insel 2010; Liddle, Carpenter, and Crow 1994; Stefansson et al. 2002). Las causas que originan esta enfermedad son aún hoy desconocidas (Cardno et al. 1999; Tsuang et al. 2001) y, desafortunadamente, no existen marcadores biológicos confiables que permitan predecir al día de hoy el inicio de esta enfermedad (Stefansson et al. 2002).

### **Síntomas**

Los síntomas de la esquizofrenia han sido clasificados en tres categorías: los positivos, que son aquellos que se adicionan al comportamiento normal, como los delirios y las alucinaciones; los negativos, aquellos que se sustraen de la personalidad normal, como la falta de motivación y sociabilización, y los síntomas cognitivos, que implican alteraciones en los procesos de funciones ejecutivas y de memoria. El tratamiento farmacológico por

excelencia prescripto hoy en día son los antipsicóticos (Tandon 2011), los cuales son principalmente efectivos para los síntomas positivos, no existiendo un tratamiento eficaz para los síntomas negativos y cognitivos de la enfermedad. Muchos pacientes que incluso responden al tratamiento vigente, fallan en adaptarse a la sociedad, no pudiendo llevar una vida completa y normal (Stefansson et al. 2002).

Los primeros síntomas comienzan a ser evidentes en la adolescencia tardía o adultez temprana. La psicosis es uno de los síntomas positivos y constituye la característica clínica más notable de la esquizofrenia. Las alteraciones a nivel cognitivo son actualmente reconocidas como el eje central de la disfunción de la enfermedad (Keefe 2007) y se postula que se presentan años previos al inicio de la psicosis; son progresivas y la magnitud de las mismas es el mejor predictor a largo plazo de las consecuencias funcionales (Green 2006; Reichenberg et al. 2010).

La base neuronal que subyace a esta disfunción ha estado bajo intensa investigación en los últimos años (Lewis 2012), y se ha propuesto que la función cognitiva normal depende de la actividad oscilatoria de la red neuronal (P Fries et al. 2001; Pascal Fries, Nikolić, and Singer 2007; Pesaran et al. 2002; Womelsdorf and Fries 2006), la cual puede descomponerse en varias bandas de frecuencias que se activan ante diversas tareas cognitivas. Estudios recientes en la neocorteza humana demostraron que bandas de frecuencias más bajas, como theta (5-8Hz), modulan la actividad de frecuencias más altas, como gamma (30-70Hz) (Jensen and Colgin 2007). La actividad oscilatoria está relacionada con la activación funcional, en donde no sólo se mide la actividad de una neurona aislada, sino que se estudia la sincronía de una población neuronal o entre poblaciones neuronales de distintas regiones

cerebrales mediante el potencial de campo local (PCL). Las oscilaciones neuronales pueden ser descritas como cambios rítmicos en la excitabilidad cortical, en donde la información y el procesamiento de la misma son integrados a lo largo de escalas espaciales y temporales vinculados a los ritmos oscilatorios (Canolty and Knight 2010).

Se ha prestado particular interés a la sincronización de la banda gamma vinculada a la actividad de las interneuronas GABAérgicas de Parvalbúmina (PV) (Cardin et al. 2009; Klausberger and Somogyi 2008; Rotaru, Lewis, and Gonzalez-Burgos 2012), debido al rol que tiene la frecuencia gamma en funciones cerebrales complejas, y debido a evidencia convergente que sugiere que anomalías en la actividad oscilatoria sincronizada podría jugar un papel central en la esquizofrenia (P. J. Uhlhaas and Singer 2011).

### **El cerebro durante la adolescencia**

La adolescencia, abarcando desde el inicio de la pubertad (aproximadamente desde los 9 a 12 años) hasta alrededor de los 20 años de edad (Crone and Dahl 2012; Spear 2000), constituye una etapa importante en los procesos finales de desarrollo del cerebro y en la neuroplasticidad, la cual subyace al refinamiento en los dominios cognitivos, afectivos y sociales (Lourenco and Casey 2013). Dicho periodo está caracterizado por cambios extensivos del comportamiento, hormonales y neuroquímicos (Anthony A. Grace 2016; Spear 2000), mediados por alteraciones sustanciales en la maduración de la estructura, la química y la función cerebral, dadas por interacciones dinámicas entre los genes y factores ambientales como el stress o el abuso de drogas.

Durante este periodo, los axones y dendritas en la neocorteza generan abundante arborización y establecen conexiones sinápticas (Benson, Colman, and Huntley 2001), para así poder establecer campos receptivos estables cuando los inputs sinápticos excitatorios e inhibitorios se encuentran maduros, haciéndolos sensibles a los distintos estímulos del ambiente (Carcea and Froemke 2013; Dorn et al. 2010; Hensch and Stryker 2004). Resulta importante destacar que este período coincide con un dramático incremento en la incidencia de varias enfermedades psiquiátricas (Lichenstein, Verstynen, and Forbes 2016; Paus, Keshavan, and Giedd 2010), ocasionado por alteraciones en el desarrollo de estructuras cerebrales que presentan procesos madurativos prolongados, en particular, la corteza prefrontal (CPF) (D K Cass et al. 2014).

Las alteraciones en el circuito neuronal entre y dentro de distintas regiones cerebrales podrían ser explicadas, al menos en parte, por deficiencias a nivel de las espinas dendríticas de las neuronas piramidales (NPI), quienes constituyen el sitio de la mayor parte de las conexiones sinápticas excitatorias. Se han identificado alteraciones en las espinas dendríticas en múltiples regiones cerebrales de pacientes con esquizofrenia, pero han sido mejor caracterizadas en la neocorteza. Se postula que este déficit inicia durante el desarrollo y que genera alteraciones a nivel molecular que subyacen a la formación, retracción o mantenimiento de las espinas dendríticas (Glausier and Lewis 2013). Se han realizado previamente estudios que demostraron una reducción de la densidad de espinas dendríticas en la CPF de individuos con esquizofrenia (Konopaske et al. 2014).

Los mamíferos presentan la capacidad de adaptarse rápidamente a un entorno cambiante debido a las funciones cognitivas sofisticadas, mediadas por la neocorteza (Markram et al.

2004). La corteza cerebral ha evolucionado a redes neuronales complejas y está formada principalmente por dos tipos de neuronas: las neuronas piramidales y las interneuronas, las cuales utilizan glutamato y el ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) como neurotransmisores, respectivamente. En la corteza del adulto, las NPi son excitatorias, mientras que las interneuronas GABAérgicas son típicamente inhibitorias (D. M. Gelman and Marín 2010). Una cuestión fundamental, que aún continúa sin resolverse completamente, es mediante qué mecanismos los distintos tipos de neuronas excitatorias e inhibitorias son generadas a partir de diferentes progenitores celulares y de qué manera se integran posteriormente en los circuitos neuronales (Marín and Müller 2014). Las neuronas piramidales se originan de progenitores en la región palial del cerebro en desarrollo y se especializan en transmitir la información entre regiones corticales y a otras regiones del cerebro. Las interneuronas, se originan de progenitores en el subpallio y deben migrar hacia su posición final en la corteza (Anderson et al. 1997; Marín and Müller 2014), comprendiendo un grupo heterogéneo de neuronas que contribuye a conjuntos locales en donde proveen inputs inhibitorios que modulan las respuestas de las NPi (Ciceri et al. 2013; Kelsom and Lu 2013; Markram et al. 2004).

Interesantemente, la influencia de las interneuronas GABAérgicas sobre las NPi es dependiente del tipo de sinapsis que estas generen, lo cual depende de la clase de interneurona que se especializa en un blanco subcelular, ya sea en una NPi (soma, segmento inicial del axón o dendritas) u otras interneuronas, lo que provee a los circuitos corticales la gran capacidad del procesamiento de la información (D. Gelman et al. 2011).

### **Sistema GABAérgico**

Las interneuronas GABAérgicas constituyen la única fuente de GABA y la principal fuente de inhibición en el sistema nervioso central (SNC) del mamífero. Constituyen entre un 10-25% de la población neuronal de la corteza, en donde juegan un rol crucial en orquestar la actividad de las NPi (Le Magueresse and Monyer 2013). Las interneuronas GABAérgicas son extremadamente diversas en morfología y función, por lo que se las puede clasificar en 4 grandes grupos: 1) De disparo rápido, contienen Parvalbúmina (PV) y pueden ser morfológicamente de tipo canasto o candelabro; 2) interneuronas que contienen el neuropéptido Somatostatina (SST); 3) interneuronas de adaptación rápida, con morfología bipolar, que frecuentemente expresan calretitina (Cr) y/o el péptido vasointestinal (VIP) y 4) interneuronas de adaptación rápida, con morfología multipolar, que frecuentemente expresan el neuropéptido Y (NPY) o relina, pero no SST (D. M. Gelman and Marín 2010).

Una característica importante del sistema GABAérgico es la duración prolongada de su desarrollo. La generación de interneuronas se solapa en gran medida con la generación de neuronas excitatorias, pero como fue nombrado previamente, su sitio de origen difiere.

Hay evidencia que apunta a una disfunción en el circuito GABAérgico como la base potencial para el inicio de los síntomas cognitivos de la esquizofrenia (Hoftman and Lewis 2011; P. J. Uhlhaas and Singer 2011). Resulta importante determinar y entender la trayectoria normal del desarrollo de los componentes GABAérgicos individuales durante la adolescencia, debido al rol crucial que juegan las interneuronas GABAérgicas locales en la maduración del control cognitivo. Cualquier manipulación que comprometa de manera directa o indirecta a las interneuronas GABAérgicas, alteraría la adquisición del control

inhibitorio normal que ocurre en la CPF, necesario en el cerebro adulto (Daryn K. Cass et al. 2013; Thomases et al. 2014; Thomases, Cass, and Tseng 2013). De hecho, la maduración funcional del sistema GABAérgico durante la adolescencia es lo que confiere las propiedades adultas al circuito prefrontal a través de cambios en los niveles de excitación e inhibición, resultando en un balance excitatorio/inhibitorio (E/I) finamente moldeado.

Se ha demostrado previamente que la expresión de PV es modificada mediante una regulación dependiente de la actividad (Philpot, Lim, and Brunjes 1997), sugiriendo que el incremento de la señal de PV observada durante el periodo periadolescente, podría estar asociado a una transmisión sináptica excitatoria incrementada (Caballero et al. 2014; Caballero and Tseng 2016).

### **Balance E/I**

Los circuitos neuronales son moldeados por la actividad durante periodos críticos, a lo largo del desarrollo. Se postula que los circuitos corticales locales, excitatorios e inhibitorios, tienden a alcanzar el balance óptimo durante la etapa de mayor plasticidad, la adolescencia (Hensch and Stryker 2004). De éste modo, cualquier alteración que se produce durante la adolescencia, lleva a consecuencias comportamentales y fisiológicas que persisten durante la adultez (D K Cass et al. 2014; Daryn K. Cass et al. 2013; Thomases, Cass, and Tseng 2013). El GABA es sintetizado por dos isoformas de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), GAD65 y GAD67, ambos presentes en las neuronas GABAérgicas, y su expresión es utilizada como marcador de la correcta maduración de la capacidad neuronal para producir y liberar GABA (Le Magueresse and Monyer 2013). Los modelos animales con alteraciones en

cualquiera de éstas dos isoformas, han demostrado disrupciones a nivel inhibitorio, sea por una falla en la producción o en la liberación de GABA (Asada et al. 1996, 1997; Hensch and Stryker 2004).

Para estudiar cambios en la excitación se generaron alteraciones en la composición de las subunidades que conforman al receptor de glutamato N-Metil-D-Asparato (NMDAR). Este receptor está compuesto por una subunidad principal, NR1, y diferentes subunidades modulatorias NR2, las cuales moldean las corrientes sinápticas en la corteza. A lo largo del desarrollo se produce un cambio de la subunidad NR2B predominante durante la pubertad, a NR2A, predominante en el cerebro adulto maduro (Caballero and Tseng 2016; Nase et al. 1999). Sin embargo, este cambio de subunidades no ocurre en la corteza prefrontal, predominando la expresión de la subunidad NR2B.

Para un correcto balance E/I resulta importante el ajuste preciso de la inhibición (Pouille and Scanziani 2001), implicando fundamentalmente a las interneuronas de PV (IPV) como controladoras del inicio del disparo, dado que la de tipo candelabro tiene como blanco el segmento inicial del axón y como reguladoras de la propagación de la señal, ya que las de tipo canasto se conectan al soma de las NPi (Hensch and Stryker 2004; Somogyi et al. 1998).

### **Hipótesis sobre el origen de la esquizofrenia**

#### **Hipótesis Dopaminérgica**

La hipótesis acerca de que la dopamina y mecanismos dopaminérgicos son centrales en la esquizofrenia, y en particular en la psicosis, ha sido una de las ideas más perdurables de la

psiquiatría. Fue originalmente postulada por van Rossum en los años 1960s, en donde se planteó que una “sobre estimulación de los receptores de dopamina podría ser parte de la etiología de la enfermedad” (Baumeister and Francis 2002). Surgió a raíz del descubrimiento de los antipsicóticos, en donde se identificó que estas drogas incrementaban el metabolismo de la dopamina cuando fue administrada en animales (Carlsson and Lindqvist 1963; Delay, Deniker, and Harl 1952). Estudios realizados con anfetamina, un agonista dopaminérgico indirecto, que puede inducir síntomas psicóticos, ha provisto evidencias importantes que apoyaron a la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia (Lieberman, Kane, and Alvir 1987). No fue hasta los años 1970s en donde se descifró que los antipsicóticos tienen efectividad clínica dada por su afinidad a los receptores de dopamina (P Seeman et al. 1976; P Seeman and Lee 1975).

La hipótesis dopaminérgica evolucionó a lo largo del tiempo y se la reconceptualizó, basándose en evidencias empíricas a partir de observaciones en humanos, postulando ahora la existencia de una hiperdopaminergia subcortical, con una hipodopaminergia cortical (Davis et al. 1991).

La modificación más reciente de la hipótesis propone un incremento de dopamina en el estriado, así como una disminución de los niveles de dopamina en la corteza, como mediador potencial de los síntomas cognitivos de la enfermedad (Yukiori Goto and Grace 2007). Esto fue corroborado por estudios de memoria realizados en pacientes con esquizofrenia en donde no se observaron cambios en la actividad de la CPF ante la realización de tareas cognitivas. También se encontró una reducción del flujo cerebral de esta región, en donde se observaron alterados los niveles del ácido homovanílico (HVA),

uno de los metabolitos de la dopamina, en contraposición de los controles en donde si se observó incrementada la actividad de la CPF ante la estimulación para realizar una tarea de memoria (Weinberger, Berman, and Illowsky 1988; Weinberger, Berman, and Zec 1986). Se presentaron también evidencias más directas, mediante el estudio por tomografías de emisión de positrones (PET), que demostraron que la liberación de dopamina inducida por anfetamina, resultó ser más alta en el estriado de pacientes con esquizofrenia, en comparación con individuos sanos (Slifstein et al. 2015). Así mismo, mediante PET se encontró una mayor disponibilidad de dopamina en las presinapsis estriatales así como una mayor liberación de la misma, estudiada por tomografía computarizada de emisión de fotones simples (SPECT), corroborando una mayor transmisión dopaminérgica (Howes et al. 2009).

### **Hipótesis GABAérgica**

La hipótesis GABAérgica se fundamenta en el hecho de que estudios de cerebros postmortem de humanos con esquizofrenia demostraron déficits GABAérgicos en la CPF, observándose un número reducido de sinapsis inhibitorias en pacientes con esta enfermedad (Hoftman and Lewis 2011), así como también una reducción en la expresión de la enzima GAD67 (Hashimoto et al. 2003; Volk et al. 2000). Adicionalmente, muchas líneas de evidencias han descripto que las IPV son las que se encuentran principalmente afectadas (Curley and Lewis 2012; del Pino et al. 2013; Hoftman and Lewis 2011) y, apoyando a esta teoría, se ha observado una reducción en el número de interneuronas de PV y en la expresión de PV, generando una disminución en la funcionalidad de las mismas, lo que resulta no sólo en un control inhibitorio reducido sobre la actividad de las NPi, sino también

en una disfunción de la actividad coordinada de las redes neuronales (Daniel J Lodge, Behrens, and Grace 2009). De hecho, se ha demostrado la importancia de las IPV de disparo rápido en la generación de potenciales oscilatorios corticales e hipocampales, y estos hechos se asocian a que se ha visto que ante la realización de una tarea, las oscilaciones gamma en la CPF se encontraron alteradas en pacientes con esquizofrenia (Basar-Eroglu et al. 2007; Freund and Katona 2007; Gonzalez-Burgos, Hashimoto, and Lewis 2010; Peter J Uhlhaas et al. 2008; Whittington, Traub, and Jefferys 1995).

### **Hipótesis Glutamatérgica**

La observación de que antagonistas del receptor de N-metil-D-Aspartato (NMDAR), como la feniciclidina (PCP) y la ketamina, producen síntomas psicóticos y alteraciones cognitivas reminiscentes a la esquizofrenia, dio lugar a la hipótesis glutamatérgica (Nestler and Hyman 2010) que establece la hipofunción de los NMDAR como la causa de la enfermedad. Dicha hipótesis es sustentada a través de varias líneas de modelos animales modificados genéticamente, con mutaciones en genes que codifican para las subunidades proteicas del NMDAR, que exhibieron fenotipos con características reminiscentes a la esquizofrenia (Belforte et al. 2010; Gainetdinov et al. 2001; Labrie, Lipina, and Roder 2008). Se postula que las interneuronas GABAérgicas corticolímbicas podrían ser el blanco principal para la función atenuada del NMDAR, lo que se vio apoyado por la administración sistémica de antagonistas de NMDAR, en donde se observó una hiperactividad de neuronas piramidales corticales y una liberación excesiva de glutamato (M. E. Jackson, Homayoun, and Moghaddam 2004). Por otro lado, se observó que las IPV son más sensibles a los antagonistas de NMDAR que las neuronas piramidales, más allá de que el mecanismo

preciso mediante el cual sucede esto es aún incierto (Belforte et al. 2010; Grunze et al. 1996). Finalmente, la administración repetitiva de antagonistas del NMDAR genera un reducción en la expresión de GAD67 y PV en interneuronas corticales GABAérgicas (Cochran et al. 2003; Morrow, Elsworth, and Roth 2007), uniendo así la hipofunción del NMDAR con la disfunción de neuronas GABAérgicas.

### **Sistema Dopaminérgico**

El sistema dopaminérgico es único entre los sistemas modulatorios del cerebro ya que emite proyecciones discretas a determinadas zonas del cerebro involucradas en el comportamiento motor, la cognición y las emociones (Anthony A. Grace 2016). Es el último de los sistemas monoaminérgicos en establecerse durante la ontogenia (Lauder and Bloom 1974), lo que sugiere podría tener una importante función en la estabilización e integración de los circuitos cerebrales, y en donde su disrupción podría alterar dichos circuitos de diversas maneras.

Las neuronas dopaminérgicas se ubican principalmente en el mesencéfalo (Menegas et al. 2015a) y pueden ser clasificadas dependiendo de su ubicación, hacia donde proyectan y su función (Anthony A. Grace 2016; Menegas et al. 2015b; Swanson n.d.), presentando propiedades diversas.

Las disfunciones del sistema dopaminérgico han sido vinculadas con desordenes como la esquizofrenia o el stress. Recientemente se ha postulado que la psicosis está asociada con la desregulación de la función del sistema dopaminérgico subcortical más que por alteraciones del sistema dopaminérgico en sí mismo (Y Goto, Otani, and Grace 2007). Más

aún, se postula que existe un sistema dopaminérgico hiper responsivo en esquizofrenia, y esto está apoyado por el descubrimiento de que drogas que incrementan la liberación de dopamina o la transmisión dopaminérgica, como la anfetamina o L-DOPA, exacerbaban la psicosis en pacientes con esquizofrenia o incluso generan síntomas remiiscentes a esta enfermedad en individuos sanos, en los que se administró una dosis elevada o repetitiva. De hecho, se han establecido modelos animales de dosis repetitivas de anfetamina para estudiar la esquizofrenia, debido a los efectos en la estimulación locomotora de los animales y en la liberación dopaminérgica (Angrist et al. 1974; R. Chen et al. 2007b; Janowsky et al. 1973).

### **Neuroanatomía del sistema dopaminérgico**

Las neuronas dopaminérgicas proyectan al cerebro anterior a través de 3 vías principales:

- Sistema Nigroestriatal: Compuesto por neuronas dopaminérgicas que están ubicadas en la sustancia nigra pars compacta (SNc), que proyectan al estriado dorsal (Anden et al. 1964; Bédard et al. 1969). Este sistema está principalmente involucrado en el control motor (Hornykiewicz 1971; Lloyd and Hornykiewicz 1970).
- Sistema Mesolímbico: Compuesto por neuronas dopaminérgicas localizadas en el área tegmental ventral (VTA) que proyectan hacia el estriado ventral (EstV) incluyendo el núcleo acumbens (NAc), el tubérculo olfatorio (TuO) y estructuras límbicas como la amígdala baso lateral (BLA) y el hipocampo (Hip) (Brinley-Reed and McDonald 1999; Fallon and Moore 1978a, 1978b; Scatton and Bartholini 1980; Voorn et al. 1986). La liberación de dopamina en la amígdala y el Hip se cree está

involucrado en el aprendizaje emocional (Bissière, Humeau, and Lüthi 2003; Jellestad and Garcia Cabrera 1986; Rosenkranz and Grace 2002) y en la memoria a largo plazo (Li et al. 2003; Lisman and Grace 2005), respectivamente. Este sistema, modula la integración de la información y de esta forma influencia al comportamiento motor.

- Sistema mesocortical: Compuesto por neuronas dopaminérgicas localizadas en la VTA que proyectan a la CPF (E. K. Miller and Cohen 2001; Ranganath and Jacob 2016), el cíngulo anterior y la corteza entorinal (Fallon and Moore 1978a, 1978b; Thierry et al. 1973).

La VTA es una estructura heterogénea que consiste en neuronas dopaminérgicas y neuronas GABAérgicas. Algunas de estas neuronas GABAérgicas son interneuronas, mientras que otras son neuronas de proyección GABA que inervan tanto la CPF como el EstV.

La corteza prefrontal es considerada como el centro de cognición, en donde su participación en el control ejecutivo puede ser explicado en parte por la memoria de trabajo que implica almacenamiento activo de la información y el procesamiento de la misma. Para llevar a cabo esto, los mecanismos neuronales en la CPF deben presentar interacciones dinámicas y flexibles (Funahashi 2001; Fuster 1997; Goldman-Rakic 1995; Knight, Grabowecky, and Scabini 1995; Shimamura 2000). La liberación de dopamina en la CPF es esencial para su función, como la memoria a corto plazo (Funahashi, Inoue, and Kubota 1993; Goldman-Rakic 1995), la atención (Gorenstein, Mammato, and Sandy 1989; Knight, Grabowecky, and

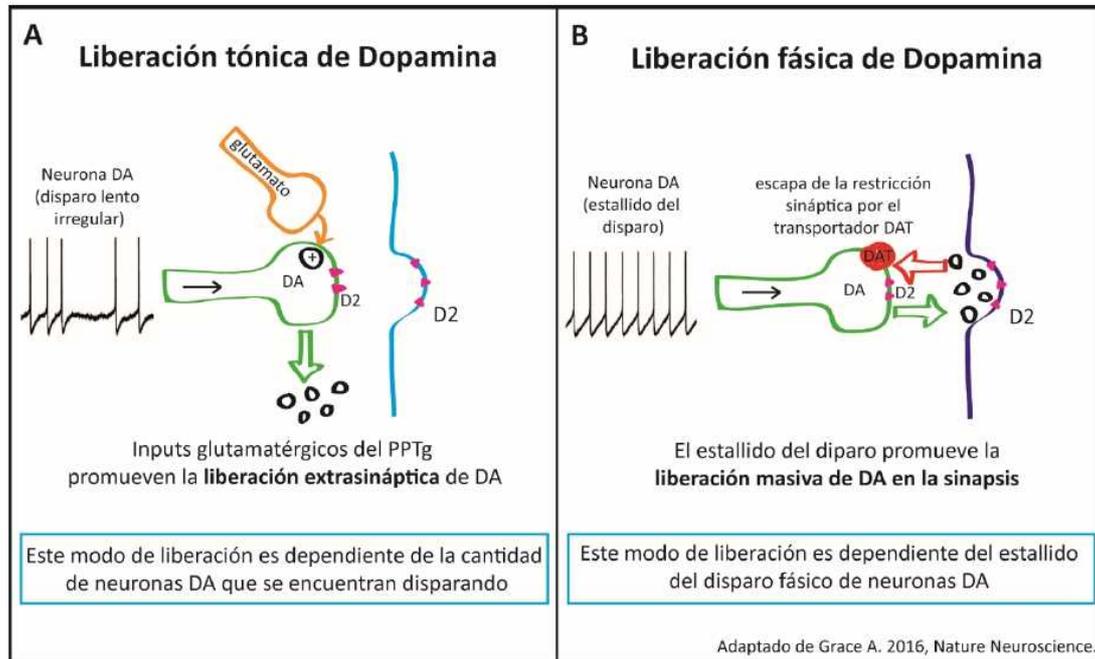
Scabini 1995; Muir 1996) y la planificación futura (Baker et al. 1996; Ingvar 1985; Owen et al. 1990), entre otras.

### **Regulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas**

Las neuronas dopaminérgicas presentan estados de actividad únicos. Son conocidas por presentar dos tipos de patrones de disparo: tónico y fásico (A A Grace and Bunney 1984a, 1984b). La descarga tónica (espontánea) está dirigida por una conductancia tipo marcapasos en donde se produce una despolarización de la membrana lenta y espontánea, que mantiene el estado de actividad basal (A A Grace and Bunney 1983a, 1983b). Este tipo de disparo determina la funcionalidad de las neuronas DA debido a que establece el nivel de responsividad del sistema a estímulos fásicos (D. J. Lodge and Grace 2006). Por el contrario, el estallido de disparos transientes, es desencadenado por estímulos externos, especialmente aquellos asociados con recompensas inesperadas o señales sensoriales que predicen recompensas (Schultz et al. 1993). Se ha propuesto que la proporción de neuronas dopaminérgicas que se encuentran disparando de manera espontánea en la VTA, determina el tono basal de responsividad del sistema dopaminérgico (Anthony A. Grace 2012). La respuesta fásica rápida de las neuronas dopaminérgicas es caracterizada por el inicio de disparos. Sin embargo, esta respuesta es posible solamente en neuronas que se encuentran disparando espontáneamente. El inicio del disparo rápido en neuronas de la VTA es dirigido por glutamato, proveniente del núcleo tegmental pedúnculo pontino (PPTg) (Floresco and Grace 2003; Hong and Hikosaka 2014; D. J. Lodge and Grace 2006), actuando sobre los NMDAR (Chergui et al. 1993). Mediante la regulación del número de neuronas que se

encuentran disparando, el pálido ventral (VPa) regula la ganancia de la respuesta fásica permitiendo al sistema ajustarse dependiendo de las necesidades del organismo específicamente en el contexto en donde se presentan estímulos (Anthony A. Grace 2012). El número de neuronas que disparan es modulado entonces de manera opuesta por dos regiones cerebrales. Se ha demostrado experimentalmente que la activación del subículo del Hip incrementa la inhibición GABAérgica estriatal-VPa, generando la liberación de las neuronas dopaminérgicas de la inhibición, y causando así un incremento en la actividad poblacional de esas neuronas (Floresco and Grace 2003; D. J. Lodge and Grace 2006). Por el contrario, la BLA es conocida por activarse ante estímulos estresantes (Chang and Grace 2014), disminuyendo el disparo tónico de neuronas dopaminérgicas y atenuando así la responsividad del sistema a las emociones y las recompensas (Anthony A. Grace 2016).

En la **figura 1** se ilustra el disparo tónico y fásico de las neuronas DA, en donde la liberación tónica de dopamina es dependiente de la cantidad de neuronas que se encuentran disparando espontáneamente, mientras que la liberación fásica de dopamina es estimulada por el PPTg, el cual induce el estallido de disparos fásicos de neuronas dopaminérgicas.



**Figura 1** A) Liberación tónica de dopamina. B) Liberación fásica de dopamina. DAT: transportador de dopamina; DA: dopamina; D2: receptores D2; PPTg: núcleo tegmental pedúnculo pontino.

### Actividad celular de la dopamina

La dopamina es una catecolamina que actúa como neuromodulador, ya que modula la transmisión excitatoria e inhibitoria, afectando a la plasticidad sináptica inducida entre los circuitos de las regiones cerebrales a donde proyectan. Debido a esto, se ha asociado al sistema dopaminérgico con aspectos de las funciones cognitivas, involucrando el aprendizaje y la memoria (Yukiori Goto and Grace 2007).

Las acciones de la dopamina son mediadas por 5 tipos de receptores (DRD) distintos, los cuales son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a la proteína G. Existen dos grandes clases de DRD que median la acción de la dopamina: la familia tipo D1 y la

familia tipo D2. Los receptores de tipo D1 presentan dos subclases D1 y D5 (DRD1, DRD5), que activan la adenilato ciclasa generando un incremento de la concentración intracelular de adenosina monofosfato cíclica (AMPc). La familia de tipo D2 está compuesta por D2, D3 y D4 (DRD2, DRD3 y DRD4), que inhiben la formación de AMPc mediante la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (D. M. Jackson and Westlind-Danielsson 1994; Philip Seeman, Guan, and Van Tol 1993). DRD1 y DRD2 son los subtipos más abundantes en el SNC y se expresan en distintos tipos neuronales (Jaber et al. 1996).

Resulta relevante destacar sobre la modulación dopaminérgica de canales y receptores en la CPF y el estriado, la facilitación del influjo de calcio en las neuronas, mediada por DRD1, a través de interacciones con los canales de NMDA. En la CPF los DRD1 pueden incrementar las corrientes de NMDA, potenciar la excitabilidad de las NPi, así como también activar interneuronas (Kuei Y Tseng and O'Donnell 2004).

### **El sistema dopaminérgico y la esquizofrenia**

Como fue mencionado anteriormente, se ha postulado que desbalances del sistema dopaminérgico o la modulación del mismo, subyacen a muchos desordenes psiquiátricos. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual se produce es aún incierto. Por ello, entender el desarrollo y la maduración del sistema dopaminérgico resulta esencial para una mayor comprensión de la etiología y la patofisiología de la esquizofrenia (Yukiori Goto and Grace 2007; Anthony A. Grace 2012; Lammel et al. 2008). Parte de las neuronas dopaminérgicas que nacen en el mesencéfalo sufren posteriormente una muerte celular programada (Jackson-Lewis et al. 2000). Durante la pubertad, se produce una marcada retracción de

inervaciones dopaminérgicas, la cual ocurre diferencialmente dependiendo de la región cerebral que se trate. De hecho, se ha demostrado que la maduración del sistema dopaminérgico tiene significancia funcional con respecto a la facilitación de las corrientes de NMDA mediadas por DRD1 y la modulación de la actividad interneuronal por DRD2 en la CPF (Kuei Y Tseng and O'Donnell 2004). Estudios en roedores (M. E. Jackson, Frost, and Moghaddam 2001), primates (Saunders et al. 1998) y en humanos (A. Meyer-Lindenberg et al. 2002) han demostrado que existe una actividad atenuada de la CPF en pacientes con esquizofrenia y que esto se encuentra correlacionado con el incremento de la liberación de dopamina en el estriado. Debido a la interacción entre la CPF y el Hip, se ha propuesto que una función atenuada de la CPF resulta en una actividad incrementa del Hip, lo que ocasionaría un incremento en la liberación de dopamina en el EstV (Yukiori Goto and Grace 2005; A. S. Meyer-Lindenberg et al. 2005). Se postula que en esquizofrenia existe una alteración en el Hip que conlleva a la disfunción del sistema dopaminérgico (Anthony A. Grace 2016). Se ha demostrado por medio de estudios del desarrollo que las interneuronas son el último componente en ser incorporado en el cerebro, y que las mismas migran a su posición final para estabilizar las redes excitatorias ya establecidas (Le Magueresse and Monyer 2013). Las interneuronas son cruciales para la generación de la actividad rítmica entre los circuitos cerebrales (Pascal Fries, Nikolić, and Singer 2007; Traub et al. 2004), por lo que no resultaría sorprendente que la actividad rítmica y la coherencia a lo largo de las regiones cerebrales se encuentren alteradas en condiciones patológicas.

### **Hiperactividad hipocampal**

Existe mucha evidencia que implica al Hip en la fisiopatología de la esquizofrenia. Estudios postmortem de cerebros humanos demuestran que el Hip tiene menor tamaño en pacientes con esta enfermedad (Suddath et al. 1990). Más aún, evidencias de estudios de neuroimagen del hipocampo de pacientes con esquizofrenia demostraron que el hipocampo ventral (vHip) es hiperactivo, con una actividad modificada durante el reposo, así como ante la realización de tareas cognitivas e incluso durante la aparición de alucinaciones (Heckers 2001; Silbersweig et al. 1995). Las IPV son necesarias para la generación de las oscilaciones gamma, las cuales también se han encontrado alteradas en esquizofrenia (Benes et al. 2007; Lewis, Hashimoto, and Volk 2005). En conjunto, esta información sugiere que, en los pacientes con esquizofrenia, una hiperactividad hipocampal lleva a un incremento en el número de neuronas dopaminérgicas que se encuentran en estado de disparo tónico y a un estado hiper responsivo del sistema dopaminérgico. Este modelo es apoyado por estudios realizados en modelos animales de esquizofrenia en donde se observó una disminución en el número de IPV así como alteraciones en la ritmicidad del rango gamma (D. J. Lodge and Grace 2007). Interesantemente, en estos modelos también se observó una disminución en el número de IPV en el vHip. Más aún, el número de neuronas dopaminérgicas que disparan espontáneamente es más del doble en la VTA en estos animales, lo que es consistente con la excesiva activación del vHip (D. J. Lodge and Grace 2007). El incremento en el número de disparos de neuronas dopaminérgicas que exhiben disparo tónico es además consistente con el incremento de la captación de

fluorodopa en el estriado (Egerton et al. 2013), correspondiendo a un incremento en el número de neuronas dopaminérgicas que disparan.

Esta información sugiere que, ante un vHip hiperactivo, todos los estímulos resultarían en una señal dopaminérgica incrementada, impidiendo así al organismo discriminar estímulos relevantes y dejando de lado aquellos irrelevantes, lo que constituye una característica saliente de la psicosis. Más aún, dada las proyecciones del vHip hacia la CPF, la BLA y otras regiones involucradas en la cognición y las emociones (Herman and Mueller 2006; Sirota et al. 2008), es posible que también juegue un rol en los déficits cognitivos y negativos de la esquizofrenia.

### **Modelos Animales para el estudio de enfermedades psiquiátricas**

Constituye un desafío generar modelos animales que permitan estudiar enfermedades del cerebro. La creciente facilidad con la que se generan modelos en roedores e invertebrados por manipulación genética, no han obviado las dificultades que se presentan para modelar desordenes que en general son únicamente humanos. Muchos de los síntomas que se establecen en diagnósticos psiquiátricos en humanos, por ejemplo, las alucinaciones y delirios, no pueden ser modelados en animales. Existen correlaciones acerca de la motivación, la memoria de trabajo y otros, en donde sólo se generarían aproximaciones para poder estudiar la enfermedad. Aun así, desarrollar y estudiar modelos animales de desórdenes neuropsiquiátricos constituye la herramienta por excelencia utilizada hoy en día para el estudio de la neurobiología y el comportamiento anormal (Nestler and Hyman 2010).

Los modelos animales desarrollados para estudiar la esquizofrenia han utilizado enfoques y métodos farmacológicos (F.-J. Chen and Sara 2007), manipulaciones genéticas (Belforte et al. 2010) o incluso lesiones (Du and Grace 2016), para recapitular los síntomas de esta enfermedad.

Más allá de los avances promisorios realizados en el campo, la relación de la causalidad entre las anormalidades neuronales y las 3 clases de síntomas permanece incierta.

### **Farmacología de la esquizofrenia**

Para el diagnóstico de un paciente con esquizofrenia no existen, aún hoy, métodos de diagnósticos confiables (Fond et al. 2015). El criterio de diagnóstico actual para desordenes psiquiátricos se basa en experiencias propias del paciente y de sus familiares, así como observaciones del comportamiento, principalmente brotes psicóticos (Fond et al. 2015).

El manejo clínico de este devastador desorden está basado en el uso de fármacos antipsicóticos (Kapur and Mamo 2003), los cuales actúan principalmente sobre el DRD2. Un neuroléptico o antipsicótico es un fármaco que se utiliza por excelencia para el tratamiento de la psicosis (Samara et al. 2014). Los antipsicóticos pueden ser clasificados en típicos o de 1ra generación y, atípicos o de 2da generación. El primer fármaco antipsicótico, la clorpromazina, fue descubierto de manera accidental en los años 1950s. Es un fármaco de 1ra generación, capaz de producir cierta somnolencia, y de disminuir las reacciones ante estímulos ambientales, sin ocasionar la pérdida total de la consciencia. Las prescripciones de los antipsicóticos típicos ha disminuido significativamente en los últimos años, debido principalmente al aumento paralelo del uso de antipsicóticos atípicos, que presentan menor

riesgo de síntomas extrapiramidales, y son más efectivos con los síntomas cognitivos y negativos de la enfermedad. Sin embargo, el mecanismo de acción de los antipsicóticos, hasta el momento, no ha sido del todo comprendido (Leucht et al. 2013). De acuerdo a la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia, los síntomas positivos son el resultado de una excesiva actividad de la vía dopaminérgica mesolímbica. Esto está basado en parte en la observación que las sustancias que producen un aumento de la disponibilidad dopaminérgica (como la L-DOPA, la amfetamina, entre otros), pueden disparar síntomas psicóticos en individuos que no padecen la enfermedad (Slifstein et al. 2015).

Los antipsicóticos atípicos constituyen un grupo heterogéneo de psicofármacos no relacionados entre sí, excepto por el hecho de que su mecanismo de acción difiere de los antipsicóticos típicos. Muchos tienen la característica común de actuar sobre los receptores de serotonina, además del DRD2. En general todos los antipsicóticos mejoran los síntomas positivos de la enfermedad, no existiendo tratamientos efectivos para los síntomas negativos y cognitivos. El tratamiento antipsicótico presenta generalmente efectos secundarios, además de disminuir su eficacia a lo largo del tiempo de tratamiento y una proporción sustancial de pacientes responden poco o no responden a una gran variedad de antipsicóticos (Kapur and Mamo 2003; Suzuki et al. 2011).

Es aceptado que los síntomas positivos de la esquizofrenia están asociados con una transmisión hiperdopaminérgica, particularmente en la vía dopaminérgica mesolímbica, mientras que los síntomas negativos y cognitivos de la enfermedad son asociados a la vía dopaminérgica mesocortical (Lindenmayer et al. 2013).

En este trabajo hemos utilizado los siguientes antipsicóticos: Risperidona y Aripiprazol. También se analizó el efecto de un modulador del estado del ánimo: litio y, además, se utilizó un agonista dopaminérgico para los experimentos de electrofisiología: quinpirol. A continuación, se desarrolla una breve descripción de cada una de ellas.

**Risperidona:** es un antipsicótico con antagonismo combinado del DRD2 y del receptor de serotonina (5-HT<sub>2</sub>) (Kane 1996) y constituye una de las drogas más utilizadas hoy en día. El tratamiento con risperidona presenta muchas ventajas clínicas dentro de las que se incluyen menor incidencia de síntomas extrapiramidales, mayor mejora clínica, menor probabilidad de recaída y efectos favorables en los síntomas cognitivos y negativos (Csernansky et al. 2002; Heck et al. 2000). Como ocurre con todos los antipsicóticos, existen respuestas diferenciales de los distintos pacientes tanto en los efectos terapéuticos como en los efectos adversos (Xing et al. 2007).

**Aripiprazol:** es un agente antipsicótico atípico que actúa generando agonismo parcial sobre los DRD2 y antagonismo sobre 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub>. Estudios clínicos de gran escala han demostrado que el tratamiento con aripiprazol presenta mayor seguridad y un perfil de tolerancia que presenta menor riesgo de padecer incremento de la concentración de prolactina en sangre, parkinsonismo, ganancia de peso, entre otros efectos adversos (D. D. Miller et al. 2007). Se ha demostrado experimentalmente en ratones que, al ser administrado como dosis única o mediante un tratamiento de dosis consecutivas por 7 días, luego de la aplicación del psicotomimético PCP, el aripiprazol generó una mejora en la memoria de reconocimiento (Nagai et al. 2009; Picada et al. 2011). Como desventaja para el uso de este antipsicótico se presenta el incremento de las apariciones de acatisia, la cual

sería un efecto adverso del uso de esta droga, generando un impedimento para mantenerse quieto, acompañado de una sensación de intranquilidad a nivel corporal (Robinson et al. 2015).

**Litio:** es una droga que se utiliza para tratar desordenes del estado de ánimo, incluyendo los episodios maníacos como la hiperactividad, agitación y pensamientos recurrentes. Las sales de litio se encuentran dentro de las drogas psiquiátricas más efectivas, sin embargo, la ventana terapéutica del tratamiento con litio es angosta y sus efectos secundarios pueden ser muy severos. El mecanismo mediante el cual el litio ejerce su efecto no ha sido aun completamente establecido, en donde varios blancos moleculares se han propuesto, desde el descubrimiento de sus efectos ante episodios maníacos (Cade 1949; Schou et al. 1954). Dentro de los mismos, se ha demostrado que inhibe de manera directa al inositol monofosfatasa (Berridge, Downes, and Hanley 1989) y a las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la glucógeno sintasa kinasa 3 (GSK3) (Klein and Melton 1996; Stambolic, Ruel, and Woodgett 1996).

**Quinpirol:** es un agonista selectivo del DRD2/DRD3. Se ha demostrado que produce una respuesta sensibilizada en ratas mediante la exhibición de hiperlocomoción, luego de la exposición repetitiva a esta droga psicoestimulante, utilizado como modelo para estudiar la conducta compulsiva (Levant, Grigoriadis, and DeSouza 1992; Szechtman, Sulis, and Eilam 1998).

Ya son más de 50 años desde la primera vez que se introdujeron los antipsicóticos como tratamiento para la esquizofrenia, y, más allá del esfuerzo que se ha llevado a cabo durante décadas de investigación, poco progreso real se ha realizado para crear nuevas drogas y

terapias no dopaminérgicas. El tratamiento exitoso del primer episodio de la psicosis es uno de los factores que impactan en el pronóstico a largo plazo, pero actualmente no existen marcadores biológicos (biomarcadores) satisfactorios que permitan predecir que pacientes con episodios declarados de psicosis responderán a que tratamiento (Fond et al. 2015). Los desórdenes neuropsiquiátricos como la esquizofrenia generan sufrimiento humano y se convierten en una cuestión socioeconómica de suma importancia para la sociedad moderna. Aún hoy en día se desconoce el origen de esta devastadora enfermedad, constituyendo un desorden crónico muy inhabilitante.

A partir de todo lo expuesto anteriormente, en este trabajo se postula la generación de un nuevo modelo animal, basado en herramientas genéticas, para poder estudiar los distintos síntomas de la enfermedad, abarcando además el tratamiento con fármacos que se utilizan en pacientes hoy en día en donde se buscan nuevos blancos para desarrollar nuevos tratamientos para sobrellevar la esquizofrenia.

# **HIPOTESIS**

Como el receptor de dopamina D2 es el blanco principal de los antipsicóticos que se utilizan para tratar a los pacientes y, debido a que las interneuronas de Parvalbúmina se encuentran ampliamente vinculadas con la etiología de la esquizofrenia, se postuló la siguiente hipótesis.

### **Hipótesis**

El receptor de dopamina D2 en las interneuronas de parvalbúmina es esencial para mantener el correcto funcionamiento de la red neuronal y de regular el delicado balance excitatorio/inhibitorio normal del cerebro.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

- Analizar si la eliminación selectiva del receptor de dopamina D2 de interneuronas de PV es relevante para el balance excitatorio/ inhibitorio, en el contexto de enfermedades psiquiátricas.

### **Objetivos Específicos**

- Estudiar los efectos provocados por la eliminación selectiva del receptor D2 a nivel celular, molecular, fisiológico y comportamental y evaluar su viabilidad como un potencial modelo de la esquizofrenia.
- Evaluar la posible utilidad de esta línea condicional para el diseño de terapias para el tratamiento, diagnóstico o prevención de la enfermedad.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

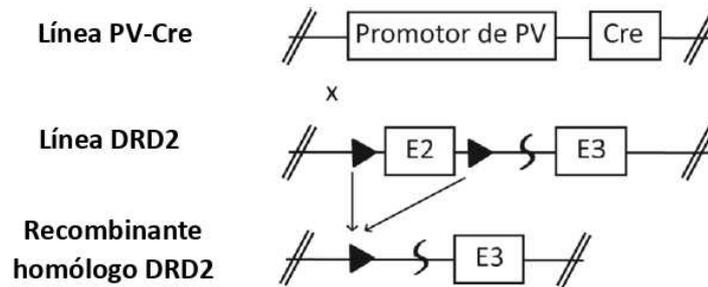
## **Materiales y Métodos**

Se generó una línea mutante condicional de ratón para estudiar esta devastadora enfermedad mediante la utilización de técnicas celulares, moleculares, electrofisiológicas y de comportamiento.

En las próximas secciones se expondrán detalladamente los procedimientos utilizados.

### **Generación de la línea mutante condicional DRD2 y genotipificado**

Ratones mutantes que presentan los sitios lox P flanqueando al exón 2 del receptor de dopamina de tipo 2 (DRD2), donde se encuentra el sitio ATG de iniciación de la transcripción (Bello et al. 2011),<sub>2</sub> fueron cruzados con una línea recombinante homóloga que lleva la expresión de la recombinasa Cre, bajo el promotor de Parvalbúmina (PV) en un fondo C57/BL6 (Hippenmeyer et al. 2005).<sub>2</sub> Se estableció una colonia mediante el apareo de DRD2<sup>flox/flox</sup> con PV<sup>+ / Cre</sup>::DRD2<sup>flox/flox</sup> que permitió obtener una progenie de ambos genotipos en proporciones iguales. La **Figura 2** es un esquema representativo de la generación de la línea mutante condicional. Se generó un apareo entre la línea transgénica que expresa Cre bajo el promotor de PV y la línea recombinante homóloga DRD2, del receptor de dopamina D2 flanqueado por los sitios LoxP (triángulos negros). Finalmente, el exón 2 fue deletado luego de la expresión de Cre. Sólo ratones machos fueron utilizados para este experimento.



**Figura 2. Eliminación selectiva del DRD2 de las interneuronas de PV.** Diagrama esquemático de las líneas que se utilizaron para generar la escisión del exón 2 del DRD2 en las interneuronas de PV. El locus DRD2 se encuentra flanqueado por los sitios loxP (triángulos negros), en donde el exón 2 del DRD2 con el codón de iniciación ATG. LA recombinasa Cre se expresa bajo el promotor de PV.

Los animales fueron mantenidos en un ambiente controlado de temperatura, ciclo de luz y humedad (20–22 °C, 12 h ciclo de luz/oscuridad) y, fueron agrupados de a 5 animales en cajas individuales ventiladas, con alimento y agua a libre demanda (*ad libitum*). En los registros electrofisiológicos, para identificar a las interneuronas de PV, se utilizó una línea reportera Tomato (tdT;ai14)<sup>3</sup> para generar PV<sup>+/Cre</sup>::DRD2<sup>flox/flox</sup>::tdT y PV<sup>+/Cre</sup>::tdt. Para la demostración de la correcta expresión de PV, se utilizó una línea reportera RCE la cual es activable por Cre (Sousa et al. 2009). Las líneas utilizadas fueron PV<sup>+/Cre</sup>::DRD2<sup>flox/flox</sup>::RCE y PV<sup>+/Cre</sup>::RCE. El ADN genómico fue obtenido de biopsias de oreja de ratón, y el material purificado fue utilizado para realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para identificar cada genotipo. La secuencia de los cebadores utilizados para genotipificar los animales fueron: Para DRD2: sentido 5' GCTTCACAGTGTGCTGCC TA 3' y antisentido 5' CCATTGCTGCCT CTACCAAG 3'; para PV<sup>+/Cre</sup>: sentido 5' GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG 3' y antisentido 5' AAAATTTGCCTGCATTACCG 3'; para tdT 5' CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT 3', 5' CGAGGCGATCACAAGCAATA 3' y 5' TCAATGGGCGGGGTGCGTT 3'; para RCE 5' AAAGTTGCTCTGAGTTGTTAT 3'; 5' CCAGGCGGGCCATTTACCGTAAG 3' y 5'

GGAGCGGGAGAAATGGATATG 3'. Los experimentos fueron llevados a cabo de acuerdo con los Principios de Cuidado de Animales de Laboratorio y en base a las guías aprobadas por el Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL).

### **Preparación de las rodajas cerebrales**

Ratones adultos de días postnatal 60 (P60) fueron anestesiados con una solución de ketamina/xylazina (Ketamina 80-100mg/kg y xylazina 2%, 10mg/kg, intraperitoneal (IP)) seguido por una perfusión transcardíaca con una solución fría baja en sodio/antioxidantes que contiene (en mM): sucrosa 200, KCl 2.5, NaHCO<sub>3</sub> 26, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, glucosa 20, ácido ascórbico 0.4, ácido pirúvico 2, ácido kinurénico 1, Cl<sub>2</sub>Ca 1 y MgSO<sub>4</sub>, carboxigenado con 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>. Los animales fueron decapitados y los cerebros rápidamente removidos y colocados en fluido cerebroespinal frío, con bajo Ca<sup>2+</sup>. Esta solución contuvo lo siguiente (en mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 3 MgSO<sub>4</sub>, 0.1 CaCl<sub>2</sub>, 1.25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 ácido ascórbico, 3 mioinositol, 2 ácido pirúvico, 25 D-glucosa, y 25 NaHCO<sub>3</sub> saturado con 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>. Cortes sagitales de 300 µm, de la corteza prefrontal y el hipocampo fueron obtenidos utilizando un vibratomo (Vibratome 1000 Plus, Pelco, Ted Pella). Las rodajas fueron cortadas secuencialmente y transferidas a una cámara de incubación conteniendo líquido cerebroespinal (mM): 125 NaCl, 2.5 KCl, 2.3 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1.3 MgCl<sub>2</sub>, 1.3 Na<sup>+</sup>-ascorbato, 3.1 Na<sup>+</sup>-piruvato, y 10 dextrosa (315 mOsm) a 37°C por 30 minutos. Luego de la incubación, las rodajas fueron mantenidas a temperatura ambiente. El pH se mantuvo en 7.4 mientras se carboxigenó con 95% O<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub>.

### **Registros electrofisiológicos**

Las rodajas fueron transferidas a una cámara de experimentación. Durante los registros, fueron continuamente perfundidas con líquido cerebrospinal carboxigenado (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>), y mantenido a temperatura ambiente (22–25°C). Se montaron en un microscopio Zeiss Axioscop. Los registros fueron realizados con pipetas para patch, de vidrio borosilicado con paredes angostas (1B100F-4, World Precision Instruments). Los electrodos presentaron las resistencias de 3.2– 4.2 MΩ al ser llenados con la solución interna. Las soluciones para registros de voltaje fijo contuvieron los siguientes (en mM): 120 Cs- metanosulfonato, 20 CsCl, 10 HEPES, 10 Na<sub>2</sub>-phosphocreatina, 10 TEA-Cl, 0.5 EGTA, 4 Mg-ATP, y 0.3 Li-GTP. El pH fue ajustado a 7.2 con CsOH. Adicionamos We TTX (1 μM) y bicuculina (20 μM) para aislar las corrientes post sinápticas excitatorias mini (mCPSEs). El metanosulfonato de cesio fue reemplazado por K-gluconato en la solución intracelular para registros de corrientes fija. Para registros de *patch-clamp* de célula entera en interneuronas, células que expresaron PV<sup>+/Cre</sup>::DRD2<sup>flox/flox</sup>::tdT y PV<sup>+/Cre</sup>::tdt fueron excitadas a 594nm. Las interneuronas fueron identificadas utilizando un objetivo de inmersión 40X y una cámara con aumento contraste (Dage-MTI). Los siguientes parámetros fueron rápidamente medidos en dichas interneuronas: potencial de membrana en reposo, resistencia de membrana, capacitancia de membrana, umbral de potencial para disparos y la frecuencia máxima de disparos. Los registros de célula entera realizando el sello, fueron llevadas a cabo utilizando un amplificador Axopatch 200A (Molecular Devices), un Digidata conversor 1322 A/D (Molecular Devices), y pClamp 10.2 software (Molecular Devices). La información fue muestreada a 50 kHz y filtrada a 4-6 kHz (low-pass Bessel filter).

Las células piramidales en el área CA1 fueron registradas con un videomicroscopio DIC en infrarrojo. Los registros de célula entera fueron realizados utilizando un microelectrodo (4-8 M $\Omega$ ) relleno con (mM): 130 CsOH, 130 D-ácido glucónico, 2 MgCl<sub>2</sub>, 0.2 EGTA, 5NaCl, 10 HEPES, 4 ATP-tris, 0.3 GTP-tris, 10 fosfocreatina. Los registros de campo fueron realizados con pipetas rellenas con 3M NaCl. Los resultados fueron obtenidos utilizando los amplificadores Axopatch 200B y Multiclamp700B, digitalizados, y adquiridos a 20 KHz en una computadora personal utilizando el software pClamp10. La capacitancia de membrana y la resistencia del input fueron obtenidas por trazos de corrientes evocadas por pasos hiperpolarizantes de 10 mV.

#### **Calibración de la fuerza del input para la activación de células de la granulosa**

La fuerza del input es proporcional al número de axones activados en los colaterales de Schaffer. La pendiente del potencial de campo postsináptico excitatorio (PCPE) incrementa linealmente con el número de axones activados. Por lo cual, la fuerza del input fue determinada como porcentaje de la pendiente del PCPE. Para este propósito, un microelectrodo de registro de campo fue colocado en el área CA1 de la capa de células piramidales para determinar el PCPE y la población de disparos (disparo explosivo) en respuesta a la estimulación de los colaterales de Schaffer (CS). Para comparar la fuerza del input a lo largo de los distintos experimentos, la pendiente provocada del PCPE a cualquier intensidad de estímulo dado, fue normalizada a la pendiente del PCPE que evocó la máxima de disparos explosivos (100%). La fuerza del input se mantuvo  $\leq 50\%$  para todos los experimentos. Un abordaje similar para la calibración de la fuerza del input fue previamente utilizado. Corrientes postsinápticas excitatorias (CPSE) e inhibitorias (CPSI) monosinápticas

fueron evocadas y registradas luego de la estimulación de los CS. Las CPSEs fueron aisladas por voltaje constante en neuronas piramidales en el potencial de retorno de las corrientes CPSIs medidas para cada neurona individual ( $\sim -70$  mV). En algunos casos, las CPSIs fueron registradas en el potencial de retorno de las CPSEs ( $\sim 0$  mV). Las conductancias de las sinapsis excitatorias e inhibitorias fueron tomadas como CPSE o CPSI divididas por la fuerza mediante la cual las corrientes sinápticas fueron registradas. Los experimentos de electrofisiología en rodajas cerebrales fueron llevados a cabo por el Dr. Mariano DiGuilmi y la Lic. Mora Ogando, en colaboración con los laboratorios de la Dra. Belén Elgoyhen en el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular y la Dra. Antonia Marín-Burgin del Instituto de Investigación en Biomedicina de Buenos Aires, respectivamente.

### **Registros de potencial de campo (RPC)**

Los ratones fueron anestesiados con uretano (1.8 g/kg, IP) y colocados de manera fija en un marco estereotáxico. Se chequeó la dosis adecuada de anestesia por observación de falta de reflejos en las patas. La temperatura corporal fue medida utilizando una sonda rectal y mantenida constante a 37 °C utilizando un tablero de control. El cráneo fue sujeto a dos craneotomías en las que fue perforado en las coordenadas de la corteza prefrontal (CPF) y en el hipocampo dorsal (dHip) (CPF: AP = 1.7 mm, L = 0.3 mm, DV = 2 mm; dHip: AP = -2.1 mm, L = 1.2 mm, DV = 1.5 mm; Bregma como referencia). Un tornillo de acero inoxidable fue insertado en el hueso occipital como referencia, y un macroelectrodo de acero inoxidable (superficie = 0.038 mm<sup>2</sup>) fue introducido en cada área para los RPC. Los electrodos fueron pre-inmersos en una solución Dil, para una posterior localización de los

sitios de registro. Un registro (30 minutos de duración) fue realizado por animal. Las señales obtenidas fueron pre-amplificadas x10, y luego amplificadas x1000. La información fue adquirida con aparatos de National Instruments a una frecuencia de muestreo de 30 KHz, y submuestreado a 2.5 KHz. El espectro de poder y la coherencia fueron medidos con el método de multi-taper (tiempo-ancho de banda producido = 3, número de reducciones = 5; paquete de Chronux, <http://chronux.org/>). Para estimar el acople de amplitud de fases, el valor de fase asegurado (PLV, por sus siglas en inglés) fue tomado en cuenta como:

$$PLV = \frac{1}{N} \left| \sum_{n=1}^N e^{-i(\phi_H(n) - \phi_L(n))} \right|$$

Donde N es el número total de muestras para un registro dado,  $\phi_H(n)$  es el ángulo de fase para la muestra  $n$  del sobre de la frecuencia de banda elevada (gamma, 30 – 70 Hz), y  $\phi_L$  es el ángulo de fase de la muestra  $n$  de la banda de frecuencia baja (alpha, 8 – 15 Hz). Para obtener estos dos valores, primero se utilizó un filtro de fase cero en la señal muestreada, en orden para obtener bandas de alta y baja frecuencia. Para obtener  $\phi_H$  primero computamos la envolvente de las frecuencias de banda elevada como la amplitud de su transformación de Hilbert. Luego, computamos la transformación de Hilbert una vez más sobre la envolvente y tomamos su ángulo de fase como  $\phi_H$ . Par obtener  $\phi_L$  computamos la transformación de Hilbert de la frecuencia baja y tomamos su ángulo de fase. Los estudios de potencial de campo fueron llevados a cabo por el Dr. Camilo Minini, en colaboración con el grupo del Dr. Silvano Zanutto.

### **Inmunohistoquímica y análisis de imagen**

Los ratones fueron perfundidos por vía transcardíaca con paraformaldehído (PFA) 4% y el cerebro fue removido y fijado en la misma solución por 180 minutos a 4°C. El tejido fue crioprotegido secuencialmente en una solución de sacarosa 10%-20%-30% preparada en buffer salino fosfato (PBS) y luego cortados secuencialmente en un criostato Shandon Cryotome E (Thermo Scientific) en secciones cerebrales coronales de 40 µm de grosor. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: a) monoclonal anti-Parvalbúmina de ratón (1:2000, Swant); b) policlonal anti Parvalbúmina (1:2000 Swant); c) anti GFP (1:2000, Aves); d) anti Neu N (1:250, Cell Signalling), e) anti Somatostatina (1:250, Millipore), f) anti-calretinina (1:3000, Swant) y, como anticuerpos secundarios: anti-ratón AF-594 (1:400, Jackson IR), anti-pollo AF-488 (1:400, Jackson IR), anti-rata AF 594 (1:400, Jackson IR), anti-conejo AF-555 (1:400, Jackson IR). Las secciones marcadas tanto de los controles como de los ratones mutantes fueron fotografiadas durante la misma sesión, utilizando un microscopio Olympus BX41 con un objetivo 20X. Para el recuento celular, las imágenes fueron procesadas utilizando el programa Image J, mediante la utilización del programa "Contador celular".

### **Hibridización in-situ**

Los animales fueron perfundidos con PFA 4% y los cerebros fueron fijados toda la noche en la misma solución, crioprotegidos en sacarosa 30%, preparada en PBS libre de RNAsas, embebido en Cryoplast (Biopack) y almacenado congelado a -80°C. Secciones de veinticinco micrómetros (25µm) fueron cortadas utilizando el criostato, colocadas en portaobjetos en series, y fijados posteriormente en PFA 4% por 10 minutos. Luego, se realizaron 3 lavados en PBST (PBS1X + Tween 0,1% 8Sigma)), y las secciones fueron tratadas con 10 µg/ml de

proteinasas K (Roche) en PBST por 10 minutos, transferidas a PFA 4% por 5 minutos y luego, brevemente enjuagadas en PBST. Seguidamente, las secciones fueron acetiladas por 10 minutos (1.3% Trietanolamina (Sigma), 0.25% Anhídrido acético (Merk), y 21 mM HCl), luego lavadas con PBT 3 veces de 5 minutos cada lavado y transferidas a la cámara de hibridización para la incubación con la solución de prehibridización (50% Formamida (Milipore), 20% de Dextran Sulfato (Sigma), 1mg/ml tRNA (Sigma), 1X de Solución de Denhardt's (Sigma), SSC 5X (de una solución stock de 20X que contenía 3M NaCl (Cicarelli), 0,3M Citrato de Sodio (Sigma), Tween 0,1%, EDTA 5mM (Sigma)) por 3 horas a temperatura ambiente. La solución de prehibridización fue llevada a 85°C por 15 minutos y, sondas de RNA marcadas con Digoxigenina (DIG) también fueron llevadas a 85°C, por 5 minutos. Las sondas desnaturalizadas fueron luego adicionadas a la solución de prehibridización previamente calentada, en una concentración final de 1ng/μl y mantenida a 85°C por otros 5 minutos. La solución de prehibridización fue luego drenada de los portaobjetos y 250μl de la solución conteniendo la sonda fue agregada a cada portaobjeto, los cuales fueron secuencialmente cubiertos con un cubreobjetos e incubados toda la noche a 62°C. Al día siguiente, los cubreobjetos fueron removidos gentilmente y los portaobjetos fueron lavados con 50% de formamida, 1X SSC, 0,1% de Tween, 3 veces de 30 minutos cada uno, a 62°C. Los portaobjetos fueron luego lavados en PBST (PBS + 0,1% Tritón (Merck)) por 10 minutos e incubados por 2 horas con solución de bloqueo (1X PBS, 2mg/ml Suero Albúmina Bovino (BSA (Sigma)), 0,1% Tritón, 10% Suero de Cabra (Natocor)) y seguidamente incubados toda la noche con el anticuerpo anti-DIG (Roche), diluido 1:2000 en la solución de bloqueo. Al día siguiente, los portaobjetos fueron lavados por 10 minutos en una solución que contenía

100mM de Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl (Cicarelli) y 0,1% de tritón. Luego, los portaobjetos fueron lavados en un buffer de fosfatasa alcalina (100mM Tris-HCl pH 9,5, 50mM 50mM MgCl<sub>2</sub> (Cicarelli), 100mM NaCl (Cicarelli), 0,1% Tween 20) por 10 minutos e incubados en la oscuridad a temperatura ambiente en una solución de fosfatasa alcalina con nitroazul de tetrazolio (NBT) y 5 bromo- 4 cloro- 3 fosfato indólico (BCIP) (300 µl/ml NBT (Sigma): 175 µl/ml BCIP (Sigma))

Los portaobjetos fueron revisados periódicamente y la reacción fue detenida en un buffer de Tris-EDTA. Finalmente, los portaobjetos fueron dejados secándose toda la noche, deshidratados y cubiertos con DPX medio de montaje (Sigma).

#### **Transcripción reversa, reacción en cadenas de la polimerasa (RT-PCR)**

La corteza prefrontal, el hipocampo ventral, el estriado y la corteza somatosensorial fueron diseccionados en cada animal, en un ambiente libre de RNAsas, de animales controles y mutantes condicionales y fueron lisados en trizol (Tripure, reactivo de extracción fenol-cloroformo, Roche). El ARN mensajero (ARNm) fue extraído y transcrito a ADN complementario (ADNc) con el Kit "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit" (Roche). Los siguientes cebadores fueron utilizados para la RT-PCR: DRD2, sentido 5' CCACACTGGTTATGCCCTGG 3'; antisentido: 5' GGTTCAAGATGCTTGCTGTGC 3'; DRD1, sentido: 5' GATGGCTCCTAACACTTCTACC 3'; antisentido: 5' GGCTGTGAGGA TGC GAAAG 3'; GAD67, sentido: 5' CATGGCGGCTCGGTACAAAGTA 3'; antisentido: 5' AACAGTCGTGCCTGCGGTTGC 3'; NR2A, sentido: 5' GCCTGAGAATGTGGACT TCC 3'; antisentido: 5' TTCTGTGACCAGTCCTGC 3'; NR2B, sentido: 5' GCATTGCCA CAATGAGAAGAA 3'; antisentido: 5' CACAGTCATAGAGCCCATCAA 3'; PV, sentido:

5'CTGCCCGCTCAAGTTG 3'; antisentido: 5' TCTGCAGCAAAGGCTC 3'; Ciclofilina, como gen de expresión constitutiva, sentido: 5' TGGAGATGAATCTGTAGGACGA 3'; antisentido: 5' GAAGTCTCCACC CTGGATCA 3'.

### **Análisis de proteínas por Western Blot**

Los ratones fueron decapitados y seguidamente, se realizó la extracción de la corteza prefrontal de manera rápida. Se colocó el tejido de cada animal en diferentes tubos, con buffer de lisis que contuvo (en mM): 50 Tris-HCl pH 7,5, 150 NaCl, 1% IGEPAL con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa. Las muestras fueron desnaturalizadas y corridas en un gel al 12% de poliacrilamida SDS-PAGE. Los geles fueron transferidos electroforéticamente a una membrana de PVDF (dichas membranas fueron previamente activadas durante 30 segundos en metanol). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de BSA en TBST 0,1% (50mM Tris Base pH 7,5, 150mM NaCl y 0,1% de Tween 20) por 1 hora e incubado con los siguientes anticuerpos primarios, durante toda la noche a 4°C: anti-Serina 9-Gsk3 $\beta$  (1:1000, Cell Signalling (CS)), anti-Gsk3 $\beta$  total (1:1000, CS) o anti- $\alpha$ -tubulina (1:4000, Milipore). Subsecuentemente, los complejos inmunes fueron revelados utilizando los anticuerpos secundarios apropiados conjugados con peroxidasa (HRP, Jackson Immuno-Research) junto con los reactivos de detección quimioluminiscente ECL (Thermo Scientific). Los resultados fueron adquiridos por exposición de las membranas en el Gbox (Syngene) y las imágenes obtenidas fueron procesadas en formato 8 bit y cuantificadas en el programa Image J.

### **Inyección viral en corteza prefrontal y análisis de espinas dendríticas**

Los ratones fueron anestesiados con una dosis intraperitoneal de ketamina (100mg/kg del peso corporal) y xilacina (10mg/kg), y fueron colocados en un marco estereotáxico (Stoelting CO). Una incisión fue realizada a lo largo de la línea media para exponer el cráneo. El Bregma fue identificado y un orificio fue perforado en las coordenadas apropiadas. Una jeringa Hamilton de 10.0µl acoplada a una aguja de acero inoxidable de 36G fue utilizada para la inyección de 2µl de suspensión lentiviral ( $0,6 \times 10^7$  unidades de transducción (UT)), que acarreó el cassette reportero GFP (de las siglas en inglés, proteína fluorescente verde), bajo el control del promotor de ubiquitina, en ambos hemisferios en la corteza prelimbica en las coordenadas (Paxinos et al., 2001): antero-posterior: +2.5 mm, lateral:  $\pm 0.5$  mm, dorso-ventral: -2.5 mm y -1.5 mm, medidos desde el Bregma. La tasa de inyección fue 0,2µl/min. Durante la cirugía y hasta la completa recuperación de los animales, los mismos fueron mantenidos a condiciones constantes de temperatura (30°C-37°C). Inmediatamente luego de la cirugía, los ratones recibieron el analgésico aponal (1mg/kg, subcutáneo (SC)). Catorce (14) días luego de la inyección lentiviral, los ratones fueron perfundidos con PFA 4% en PBS 1X. Los cerebros fueron estabilizados en pasajes sucesivos de 24hs en sacarosa 10%, 20% y 30%. Se realizaron cortes coronales de los cerebros utilizando el crióstato, obteniendo secciones de 60µm. Las secciones fueron montadas sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje DPX. Las fotografías fueron obtenidas con un microscopio Olympus BX41 (objetivo 100X). Las imágenes fueron adquiridas con una resolución de 4080 x 3072. Dos o tres dendritas secundarias (20-80µm de distancia desde el soma) de cada

neurona, fueron tomadas para el análisis de espinas dendríticas. El número de protrusiones dendríticas fue contabilizado manualmente utilizando el software Image J.

### **Cromatografía líquida de alta resolución**

Ratones de ambos genotipos fueron desnucados, rápidamente decapitados y se realizó la extracción de las estructuras en estudio: corteza prefrontal, estriado e hipocampo. Cada estructura fue pesada en fresco y rápidamente congelada en nitrógeno líquido. Se almacenaron las estructuras a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización. Las muestras fueron homogeneizadas y desproteinizadas individualmente con una solución de Ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 0.2N y fueron centrifugadas a 13.000g durante siete minutos. El sobrenadante fue inyectado en una columna NOVA-PAK C18 3.9x150mm (Waters, USA), siendo la fase móvil de PICB8 5.24ml, Sodio Dihidrogeno Fosfato Monohidrato  $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$  10.8 gramos, EDTA 0.99mM y 6% de metanol. Para la cromatografía se utilizó un equipo con la bomba Shimadzu LC-10AS y un detector electroquímico (Bioanalytical Systems, USA). El programa Peak Simple Chromatography Data System (Model 302 Dix Channel USB) fue utilizado para analizar los picos de intensidad de voltaje. Se realizó la normalización de las áreas de los picos con respecto a una muestra control, para así calcular la concentración endógena de Dopamina, sus metabolitos DOPAC y HVA, serotonina y el metabolito 5-HIAA. Los experimentos de HPLC fueron conducidos por la Lic. Fernanda defino del Instituto de Investigaciones Farmacológicas.

### **Análisis de comportamiento**

Los experimentos de comportamiento fueron llevados a cabo durante la etapa oscura del ciclo de luz/oscuridad entre las 6pm y las 11pm, y realizados sin conocimiento previo de los genotipos de los animales, para evitar sesgos en el trabajo. Todos los estudios comportamentales se realizaron utilizando el sistema de adquisición de información VirtualDub 1.4 auxiliary setup. El orden en el que se realizaron los estudios fue: campo abierto (actividad locomotora), laberinto en cruz elevado (ansiedad), estudio del entierro de bolitas (ansiedad), laberinto en forma de "Y" (memoria espacial), exámen de reconocimiento del objeto novedoso (NOR, memoria a corto plazo) y el exámen del nido (motivación).

**Actividad locomotora:** La actividad locomotora espontánea en el campo abierto fue medida utilizando el Sistema de Rastreo por Video Any-Maze (Stoelting CO). La distancia total recorrida fue analizada. Para experimentos realizados con droga, los ratones fueron inyectados previamente con el vehículo (solución fisiológica) o droga (10ml/kg del peso del animal, IP), y colocados dentro del campo abierto. Fueron monitoreados por 30 a 60 minutos dependiendo de cada caso. La concentración de las drogas utilizadas fueron las siguientes: MK-801 0,2mg/kg Sigma, USA); Aripiprazol 0,6mg/kg (Maprimed, Argentina); Risperidona 0,025mg/kg (Maprimed, Argentina); Anfetamina 5mg/kg (Sigma, USA).

Para el exámen del Stress, los animales fueron separados en dos grupos: controles y estresados, obteniendo así un total de cuatro grupos, dos para cada genotipo. Los animales controles fueron transferidos al campo abierto para la medición de la locomoción total y el número de eventos de aseo. Los animales del grupo estresado recibieron previo a la

medición de la locomoción, una inyección con solución fisiológica (200µl), utilizada como agente estresante.

**Laberinto en cruz levado:** Fue utilizado para estudiar y medir comportamiento tipo ansioso. El aparato consiste en una plataforma con forma de cruz, con dos pares de brazos opuestos de 30 cm de longitud y 8 cm de ancho, que se encuentra elevado a 50 cm del piso. Un par de brazos opuestos presenta paredes (sin techo), mientras que el otro par de brazos opuestos no las presenta. Debido a la altura sobre el piso en la que se encuentra, los brazos abiertos representan un ambiente aversivo para el ratón. La proporción de tiempo que los ratones pasaron en los brazos abiertos durante ocho (8) minutos fue considerado como una medida de la ansiedad exhibida. La distancia recorrida también fue analizada como medida de la actividad tenida a lo largo del experimento en el aparato.

**Enterramiento de bolitas:** Cajas de dimensiones 30x24x15 cm fueron rellenas con 5cm de viruta, y doce bolitas de vidrio fueron posicionadas en un patrón a lo largo de la caja, equidistantes entre sí y con las paredes de la caja. Los ratones exploraron libremente la caja durante treinta minutos. Luego, se retiró el ratón de la caja y se tomó una fotografía para poder analizar los resultados utilizando el programa Image J. El número de bolitas enterradas exitosamente fue contabilizado. Una bolita se definió como “enterrada” cuando menos de 30% de su superficie fue visible.

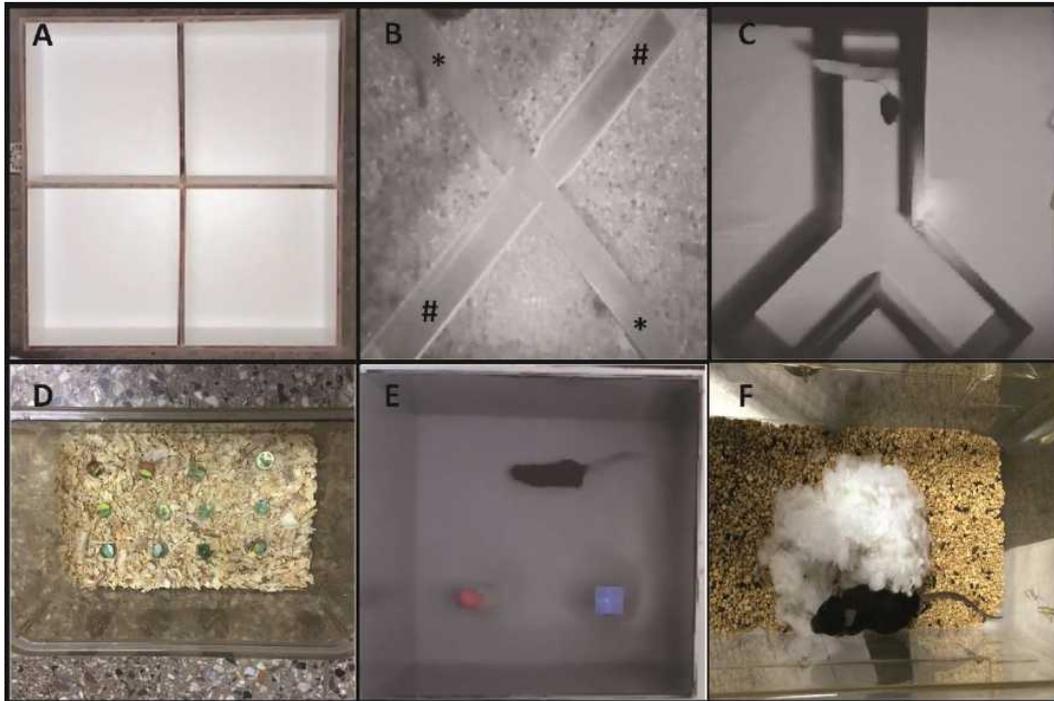
**Laberinto en “Y”-alternancia espontánea:** El estudio fue llevado a cabo en un laberinto con forma de “Y”, de dimensiones 35x5cm cada brazo, con ángulos iguales entre cada brazo. Los ratones fueron colocados en el inicio de uno de los brazos y se permitió que exploren libremente el aparato por siete minutos. Se realizó una grabación por cada animal. El

porcentaje de alternancia espontánea fue calculado como el número de triadas que contuvo entradas en los tres brazos dividido el número total de entradas en todos los brazos.

**Estudio de reconocimiento del objeto:** Los ratones fueron colocados en un campo de 30x30 cm vacío, y se les permitió explorarlo por cinco minutos. Veinticuatro horas luego, se realizó la familiarización, en donde cada ratón fue presentado a dos objetos idénticos dentro de la arena, en una determinada posición, y se les permitió que los exploren libremente durante cinco minutos. Una vez finalizada la familiarización, uno de los dos objetos fue reemplazado por un objeto nuevo. Se llevó a cabo entonces el estudio de reconocimiento del objeto propiamente dicho, en donde los ratones pudieron explorar libremente durante 3 minutos. El porcentaje de tiempo en el que los ratones exploran el objeto novedoso provee un índice de memoria de reconocimiento. La locomoción total también fue determinada durante el testeo.

**Estudio de anidamiento:** Para estudiar la motivación de los ratones para construir nidos, una pieza de algodón prensado (previamente pesado, aproximadamente de 3 gramos cada uno), fue colocado dentro de cada caja en donde los ratones se encontraban guardados individualmente. Se dejó al ratón junto con la pieza de algodón por doce horas en el período oscuro del ciclo de luz/oscuridad. Se extrajo a ratón de la jaula y se tomó una fotografía. Inmediatamente se tomaron aquellos trozos identificables como no desenredados y se los pesó. Se analizó el porcentaje de material no utilizado para realizar el nido, así como también la forma del mismo.

**Tratamiento para rescate:** Se generó un protocolo en el cual los animales de ambos genotipos fueron tratados con un antagonista del DRD2, Risperidona 0,025mg/kg, durante quince días desde p30 a p45. Los animales fueron pesados a p30, previo a la primera inyección de la droga, a p45 y p60. Se realizaron los exámenes de campo abierto en las edades p30, p47 (con 2 días de lavado post administración de la droga) y p>60, para realizar la medición de la locomoción. Luego, se administró una dosis simple de amfetamina 5mg/kg para testear la hipersensibilidad de los genotipos luego del tratamiento, se analizó la locomoción durante 1 hora, para así poder evaluar la cinética del efecto de la amfetamina. La **Figura 3** muestra las imágenes de los distintos aparatos en donde fueron llevados a cabo los diferentes experimentos de comportamiento.



**Figura 3.** Aparatos en donde fueron llevados a cabo los distintos experimentos de conducta. **A.** Open field, **B.** Laberinto en cruz elevado con (\*) indicando los brazos abiertos del aparato y (#) los brazos cerrados, **C.** Laberinto en “Y”, **D.** Enterramiento de bolitas, **E.** Test de reconocimiento del objeto novedoso, **F.** Test de anidamiento.

### Análisis estadístico

Llevamos a cabo el análisis estadístico utilizando el programa GraphPad Prism 5. Los resultados se presentan como la media  $\pm$  desvío estándar. Los resultados obtenidos de la Real Time, Western Blot, y la cuantificación de espinas dendríticas fueron analizados por medio de la T de Student no pareado. La información recolectada de los análisis de conducta fue analizada por T de Student, two way ANOVA y one way ANOVA dependiendo de cada caso, seguido por exámenes *post-hoc*. Un estadístico  $p < 0.05$  fue considerado significativo. El test de Mann Whitney Wilcoxon (no paramétrico), con un  $p < 0.05$ , fue utilizado para

analizar el test de anidamiento y el de enterramiento de bolitas. Para los registros electrofisiológicos, las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) fueron determinadas por two way ANOVA, T de Student no pareado o T de Student pareado dependiendo el caso. Para los estudios de registro de campo se analizaron los resultados mediante T de Student.

## **Resultados PARTE I**

### **Delección selectiva del receptor de dopamina D2 de las interneuronas de Parvalbúmina**

## **Resultados Parte I: Deleción selectiva del receptor de dopamina D2 de las interneuronas de Parvalbúmina**

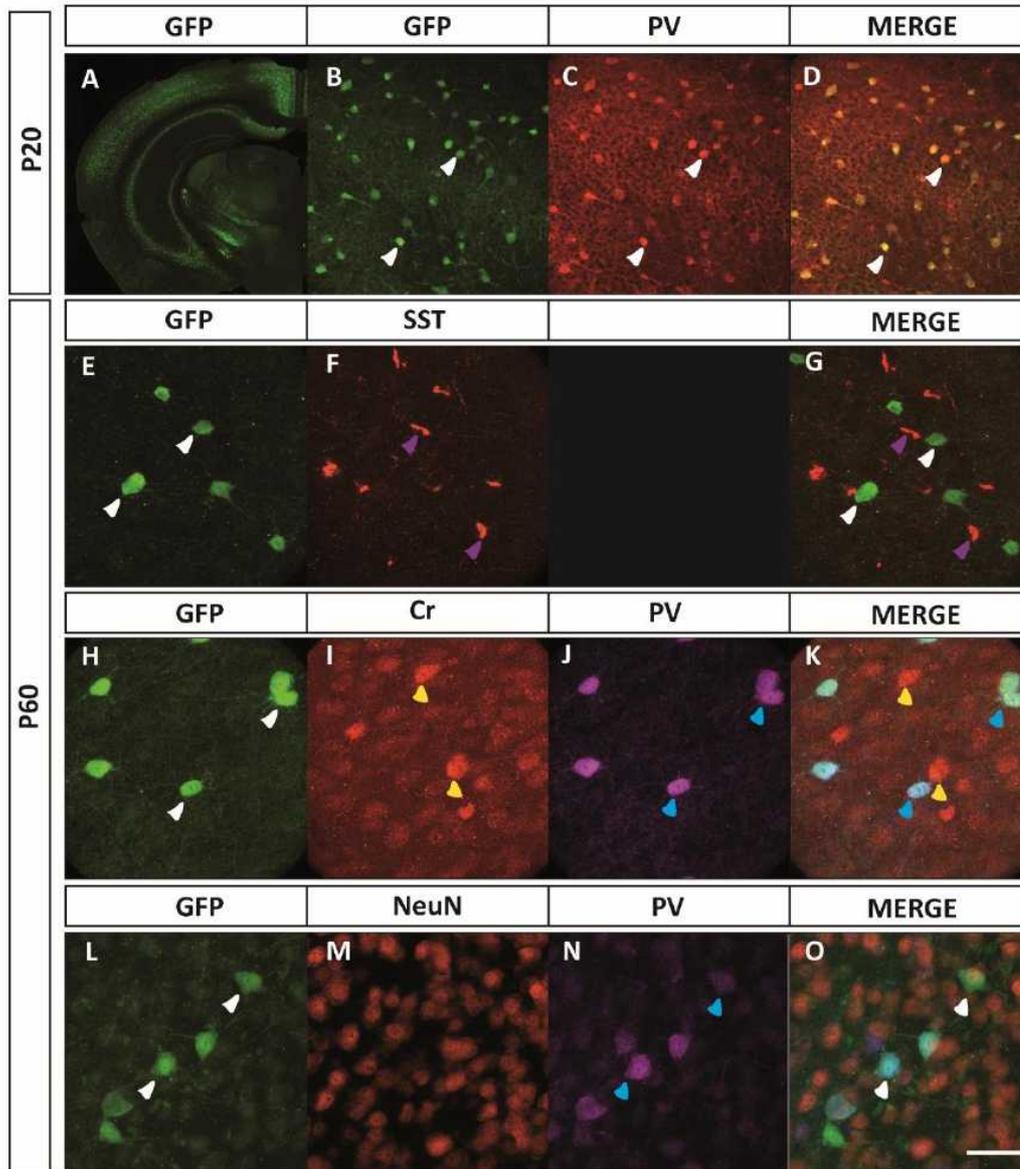
Con el propósito de estudiar que función desempeña el receptor de dopamina D2 en las interneuronas de PV, se utilizaron las líneas recombinantes homólogas PV-cre (Hippenmeyer et al. 2005) y cD2 (Bello et al. 2011), para generar una línea mutante condicional que presenta la deleción selectiva del DRD2 específicamente de las IPV.

### **Especificidad de la recombinasa Cre limitada a las interneuronas de Parvalbúmina**

El neuropéptido parvalbúmina comienza a expresarse en ratones aproximadamente a partir del día post natal 14 (P14). La línea PV-Cre utilizada es un “*knock in*” que presenta la inserción de la expresión de la recombinasa Cre bajo el promotor de PV (Dymecki and Kim 2007; Hippenmeyer et al. 2005; Taniguchi et al. 2011). Una vez que se produce la expresión de PV, inicia la expresión de la recombinasa Cre la cual recombina con el par de sitios LoxP que se encuentran flanqueando al exón 2 del DRD2 y se produce la ulterior deleción del mismo (ver Figura 2).

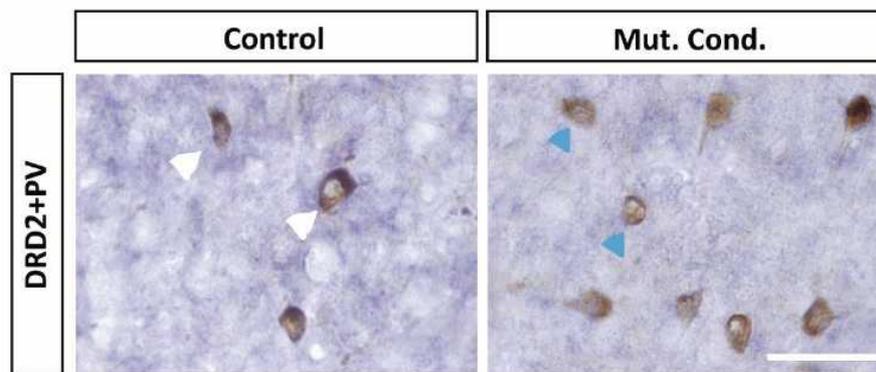
Para poder determinar la correcta expresión de Cre bajo el promotor de PV y su especificidad en este subtipo interneuronal, se realizaron experimentos de inmunofluorescencia indirecta (IFI), en donde todas aquellas interneuronas en donde se haya expresado PV, y, por lo tanto, la recombinasa Cre, aparecerían marcadas por la línea reportera GFP utilizada (PV-Cre::RCE). En la **figura 4** se observa que para el día post natal 20

(P20), la expresión de PV se encuentra presente y la marca del reportero es específica en dichas interneuronas (**figura 4 A-D**). Adicionalmente, se realizaron IFI en animales adultos (P60) en donde se observó que la expresión de PV se restringió a dicho tipo interneuronal, ya que no colocalizó con las interneuronas que expresan SST (**figura 4 E-G**), Cr (**figura 4 H-K**) u otro tipo de neuronas (NeuN; **figura 4 L-O**).



**Figura 4:** Imágenes de inmunofluorescencia en donde se demuestra la especificidad de la expresión de la recombinasa Cre bajo el promotor de PV mediante la utilización de la línea reportera GFP. A P20 ya se puede observar la expresión de Cre restringida a interneuronas de PV mediante la utilización de la línea reportera PV-CRE::GFP. La flecha blanca indica GFP (B) y PV (C) que colocalizan (A-D). IFI de animales adultos (P60) en donde la expresión de GFP (flecha blanca) es restringida a las IPV (E-O); GFP (E,G,H,K,L,O) no colocalizó con SST, flecha lila (F,G), con Cr, flecha amarilla (I,K) y es restringido a IPV, (flechas turquesa) (J,K,N,O) y no a otro tipo neuronal (flecha blanca) (M,O). La barra indica 50µm.

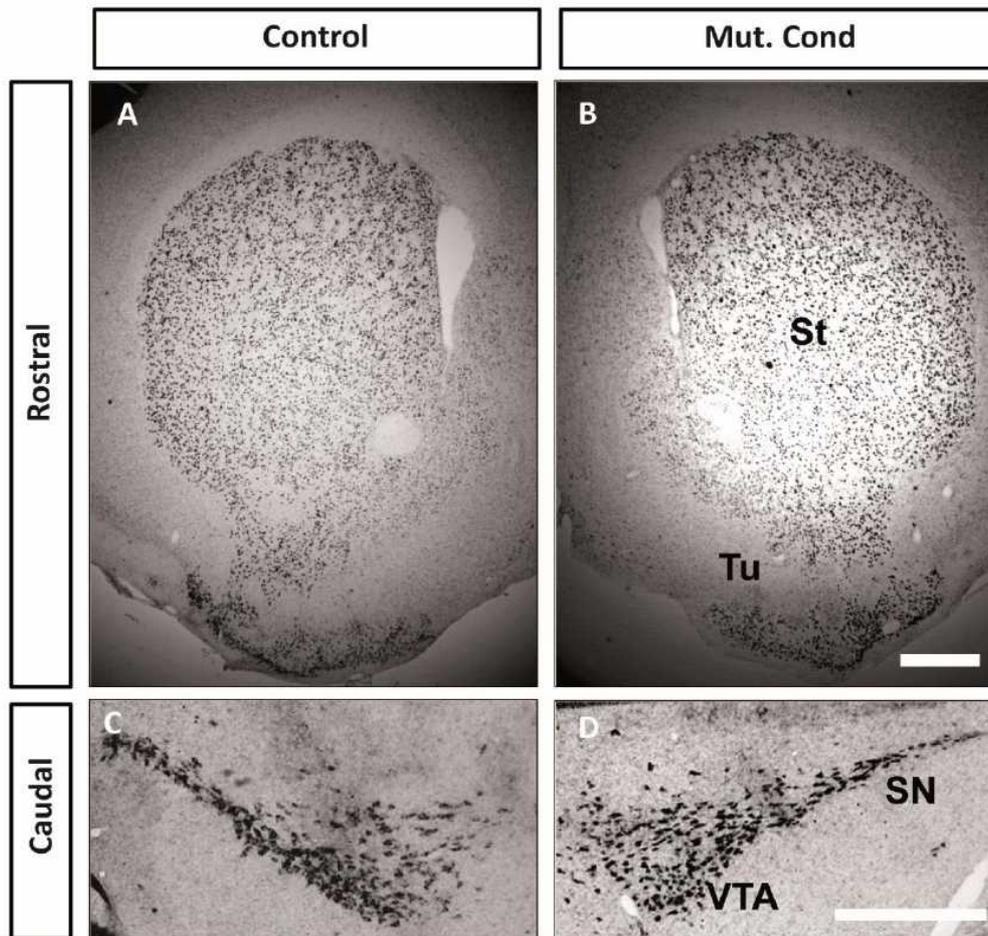
Asimismo, para corroborar la correcta expresión del receptor, se utilizó una técnica combinada de hibridación in situ (ISH) e inmunohistoquímica para marcar ARNm de DRD2 en las IPV, respectivamente. En la **figura 5** se puede observar la expresión de DRD2 y PV en el hipocampo ventral de ratones controles en donde la marca de PV colocaliza con la del mensajero de DRD2. Por el contrario, en los animales mutantes condicionales solamente se puede observar la marca correspondiente a PV y no a la del mensajero del receptor D2.



**Figura 5: Técnica combinada de ISH (DRD2) e inmunohistoquímica (PV).** Animales control exhiben marca de DRD2 (violeta) y PV (marrón, flecha blanca) (A). En contraste, los animales mutantes condicionales solamente presentan la marca marrón de las IPV (flecha turquesa), no presentándose la marca violeta del DRD2 (B). La barra indica 50  $\mu$ m.

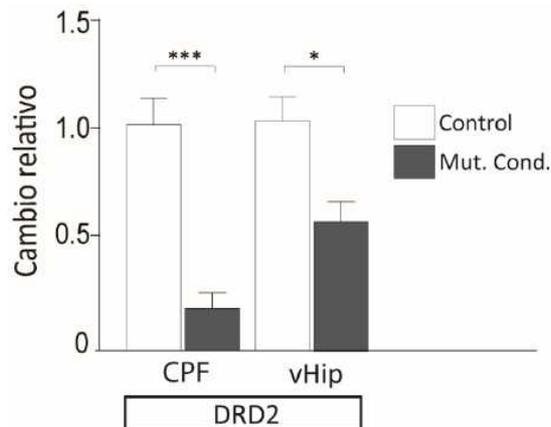
### Estudio de regiones prototípicas dopaminérgicas

Para evaluar si la eliminación selectiva del receptor D2 de las interneuronas de PV produjo cambios en la expresión en otras regiones donde el receptor es normalmente expresado, realizamos experimentos de hibridación in situ (**figura 6**). No se observaron modificaciones en la expresión del DRD2 tanto en controles como en mutantes condicionales adultos, en el estriado, la VTA, la SN y el TuO.



**Figura 6:** Expresión de ARNm en regiones prototípicas de DRD2. Expresión normal del mensajero del DRD2 en animales controles (A, C) y mutantes condicionales (B, D) en estriado (st) y tubérculo olfatorio (TuO) (A,B) y en la sustancia nigra (SN) y el área tegmental ventral (VTA) (C,D). La barra indica 500  $\mu$ m.

Adicionalmente, fueron analizados los niveles de expresión del ARNm de DRD2 en las regiones cerebrales que se abordaran a lo largo de este estudio por su implicancia en la esquizofrenia, la CPF y el vHip. Dichos niveles fueron determinados por medio de PCR en tiempo real (qPCR). Pudimos observar una drástica reducción en la expresión del DRD2 en ratones mutantes condicionales adultos en ambas regiones en estudio, en comparación con los animales control (**Figura 7**).



**Figura 7. Expresión del ARNm de DRD2 en el mutante condicional.** Disminución de la expresión del ARNm de DRD2 en la CPF y el vHip en animales mutantes condicionales, tras la delección selectiva del DRD2 de las IPV. \* $P \leq 0.1$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ , t de Student, N=6-8 animales por genotipo.

### **Análisis de las propiedades intrínsecas de las interneuronas de Parvalbúmina**

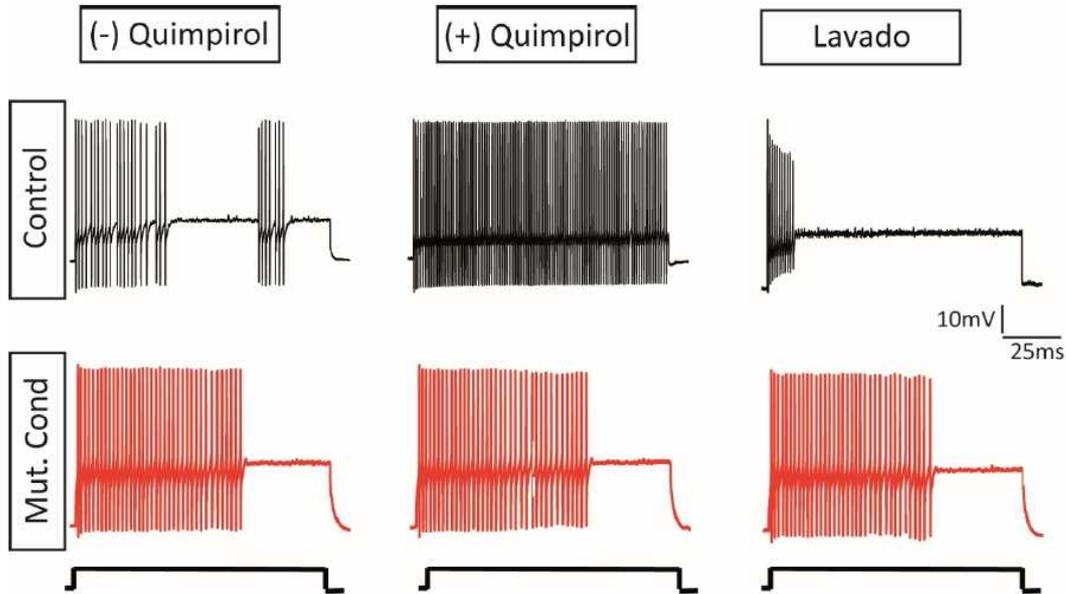
Con el propósito de analizar las propiedades intrínsecas de las interneuronas de parvalbúmina y evaluar posibles cambios en las mismas tras la delección selectiva del DRD2, se realizaron estudios electrofisiológicos por medio de patch clamp en las IPV de la CPF. Se estudiaron distintos parámetros electrofisiológicos medidos en condiciones basales, como el potencial de membrana en reposo, el umbral de disparo, la amplitud del potencial de

acción, el periodo luego de la hiperpolarización, entre otros. En la **tabla 1** se presentan los valores obtenidos. No se observan diferencias sustanciales entre ambos genotipos tras la delección del receptor, aunque se pudo determinar una diferencia significativa en la amplitud del potencial de acción de pico a pico, en donde los resultados sugieren que fue generado por un periodo de hiperpolarización significativamente mayor en los animales mutantes condicionales.

	CORTEZA		
	WT	KO	P value
<b>RMP (mV)</b>	-75.55±2.73 (8)	-76.66±1.62 (13)	0.357
<b>Rm (MΩ)</b>	178.98±15.54 (8)	219.61±26.31 (13)	0.136
<b>APT (mV)</b>	-36.88±1.84 (8)	-39.98±1.32 (13)	0.089
<b>Retraso del 1er AP (ms)</b>	0.695±0.045 (8)	0.679±0.017 (13)	0.354
<b>APA (mV)</b>	42.21±3.91 (8)	44.62±1.89 (13)	0.272
<b>APA pico a pico (mV)</b>	124.55±3.74 (8)	133.23±2.97 (13)	* (0.043)
<b>APD (ms)</b>	0.346±0.01 (8)	0.343±0.01 (13)	0.397
<b>AHP</b>	-82.33±1.39 (8)	-88.62±2.08 (13)	* (0.022)
<b>MFF (Hz)</b>	81.63±9.01 (8)	74.67±9.67 (12)	0.312

**Tabla 1:** Propiedades basales de membrana de las interneuronas de PV en la CPF de animales controles y mutantes condicionales. RMP: potencial de membrana en reposo; Rm: resistencia de la membrana; APT: umbral del potencial de acción; AP: potencial de acción; APA: amplitud del potencial de acción; APD: retraso del potencial de acción; AHP: periodo de hiperpolarización posterior; MFF: máxima frecuencia de disparo.

A partir de estos resultados podemos concluir que la expresión de la recombinasa Cre fue específica en las interneuronas de PV y que el mensajero del receptor D2 dejó de ser expresado en dichas interneuronas en animales mutantes. No obstante, para poder contar con una evidencia concluyente que demuestre que el receptor D2 no se expresó en dicha subpoblación neuronal, se diseñó un experimento a modo de determinar la actividad funcional de las interneuronas de PV y evaluar el efecto de un agonista selectivo del receptor D2. Se llevaron a cabo registros por patch-clamp de las IPV y se determinó el número de potenciales de acción dados por una corriente intracelular de amplitud constante, en presencia y ausencia del agonista selectivo del DRD2, quinpirol. En la **figura 8** se pueden ver trazos representativos del experimento realizado, en donde se observa que luego de la aplicación de una dosis efectiva del quinpirol (1  $\mu$ M) el incremento de la frecuencia de disparos solamente ocurre en las neuronas de que expresan el DRD2, habiendo incrementado el número de picos evocados cerca de 14 veces. En cambio, la adición del agonista selectivo no provocó cambios en la frecuencia de disparos de los mutantes condicionales.



**Figura 8:** Experimento funcional para demostrar la delección selectiva del DRD2 de las IPV mediante la aplicación del agonista selectivo del receptor D2 quinpirol ( $1\mu\text{M}$ ). La excitabilidad fue determinada por el conteo del número de potenciales de acción evocados por la inyección de una corriente intracelular de amplitud constante, en donde la amplitud fue inicialmente ajustada a unos pocos (5-20) picos por segundos (una estimulación no saturante) y, luego de la aplicación de 5-7 minutos del quinpirol, el número de picos evocados incrementó en el control, pero no se observó ningún efecto en los animales mutantes condicionales.

Mediante los experimentos descritos en esta sección se probó la especificidad de la línea recombinante homóloga que dirige la expresión de la recombinasa Cre, ya que la expresión fue exclusiva de las interneuronas de parvalbúmina, generándose la delección del receptor de dopamina D2 de manera selectiva en dicha subpoblación neuronal.

En la siguiente sección se describe el estudio de los efectos de la eliminación selectiva del receptor D2 en el comportamiento y a nivel fisiológico, y su relevancia en el contexto de la esquizofrenia.

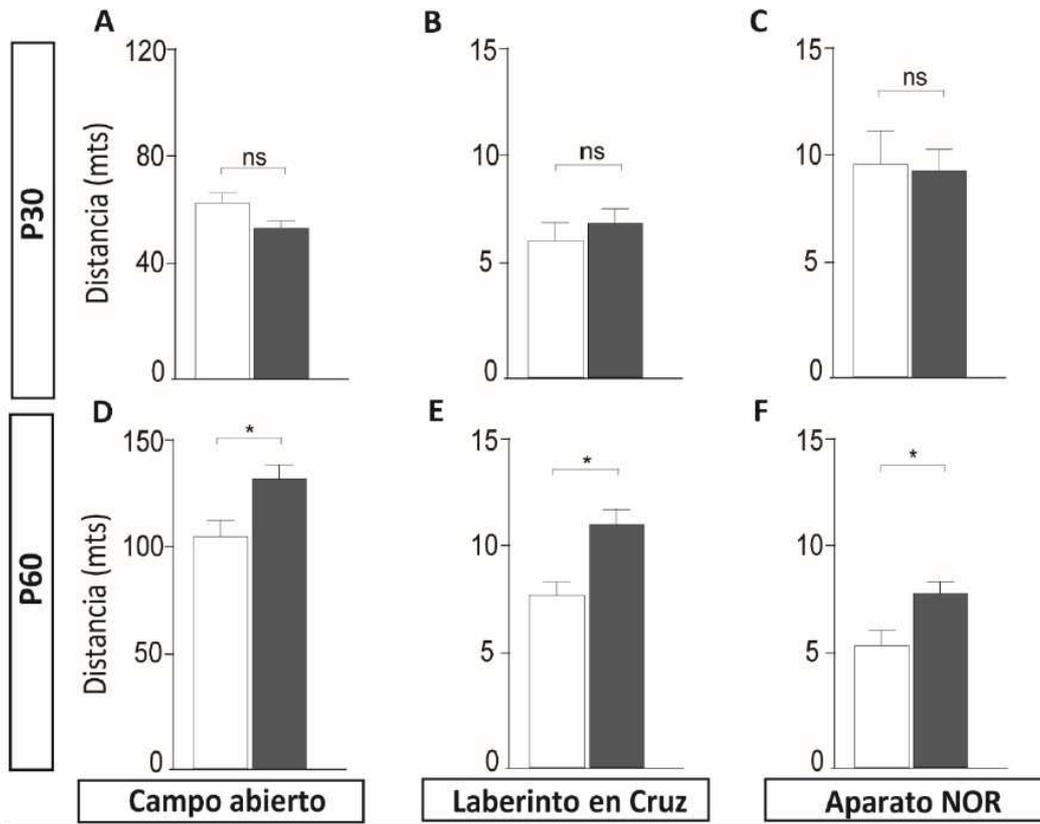
## **Resultados PARTE II**

### **Estudio de los efectos de la delección selectiva del receptor D2 en las interneuronas de parvalbúmina**

## **Resultados Parte II: Estudio de los efectos de la delección selectiva del receptor D2 en las interneuronas de parvalbúmina**

### **Análisis de comportamiento**

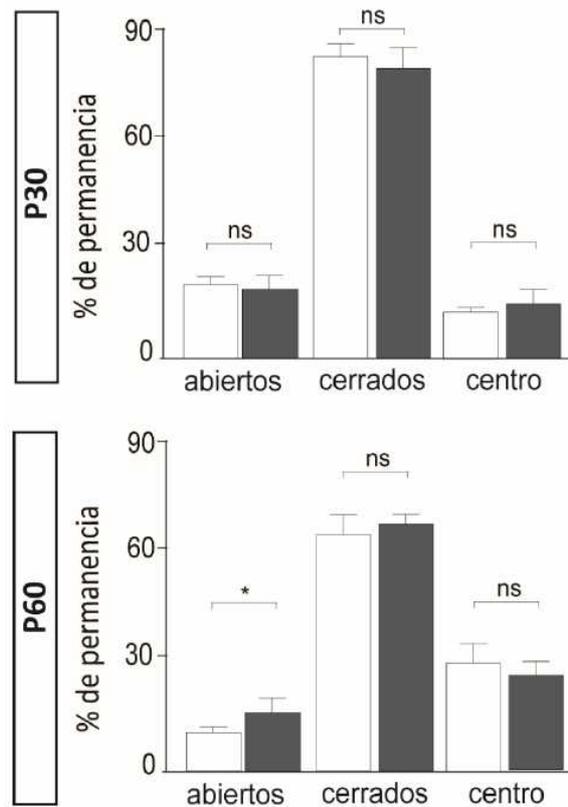
Se realizó un estudio profundo de diferentes aspectos de la conducta animal, desde la habilidad cognitiva, las emociones y el desempeño en la locomoción, en animales jóvenes de día post natal 30 (P30) y adultos, los cuales son considerados como tales cuando ya han alcanzado la madurez sexual a partir de P60. En primer lugar, se estudió la locomoción total de los animales en el campo abierto, así como también se evaluó su locomoción durante el test de reconocimiento del objeto novedoso y el laberinto en cruz elevado. En la **figura 9** se observa la distancia recorrida por los animales jóvenes y adultos de ambos genotipos, en los distintos contextos en donde fue analizada. No se observaron diferencias en los animales jóvenes entre ambos genotipos, mientras que en los animales adultos se observó hiperlocomoción en los mutantes condicionales.



**Figura 9. Locomoción total exhibida en tres contextos distintos.** Los animales jóvenes no presentaron diferencias en la locomoción entre genotipos (A-C). Los mutantes condicionales adultos exhibieron hiperlocomoción en todos los contextos estudiados (D-F). ns= no significativo; \* $P \leq 0.05$ , t de Student, N= 10-14 animales por genotipo.

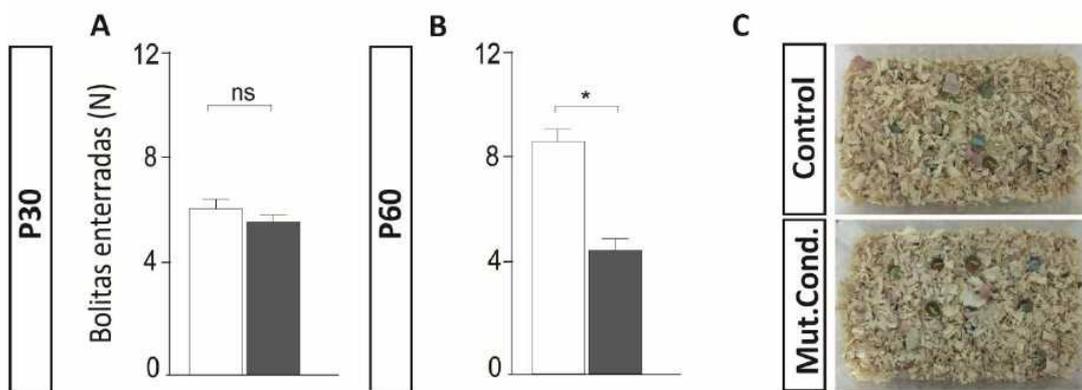
El laberinto en cruz elevado es un aparato que se utiliza para cuantificar los niveles de ansiedad, incluyendo la respuesta tigmotáctica, en donde los animales presentan la tendencia a permanecer cerca de superficies verticales (Filgueiras, Carvalho-Netto, and Estanislau 2014; Telonis and Margarity 2015). Este test evalúa la predisposición de los animales a permanecer en los brazos abiertos o cerrados del aparato. Generalmente, los animales prefieren evitar los brazos abiertos, más riesgosos, dado que se sienten inseguros. En la **figura 10** se puede observar el porcentaje de tiempo que pasaron los animales en los

distintos brazos del aparato. No se observaron diferencias en los animales jóvenes de ambos genotipos, en la cantidad de tiempo que pasaron en una u otra parte del aparato. Por el contrario, los animales adultos mutantes condicionales permanecieron más tiempo en los brazos abiertos del aparato, en relación con los controles adultos, lo que se interpretó como un comportamiento de ansiedad reducida o de una mayor predisposición al riesgo.



**Figura 10. Porcentaje de permanencia en el laberinto de cruz elevado.** Los animales jóvenes no presentaron diferencias entre ambos genotipos. Los animales adultos permanecieron mayor cantidad de tiempo en los brazos abiertos, en relación a los controles. ns= no significativo; \* $P \leq 0.05$ , Anova de una vía con Bonferroni como *post hoc*. N=10-14 animales por grupo.

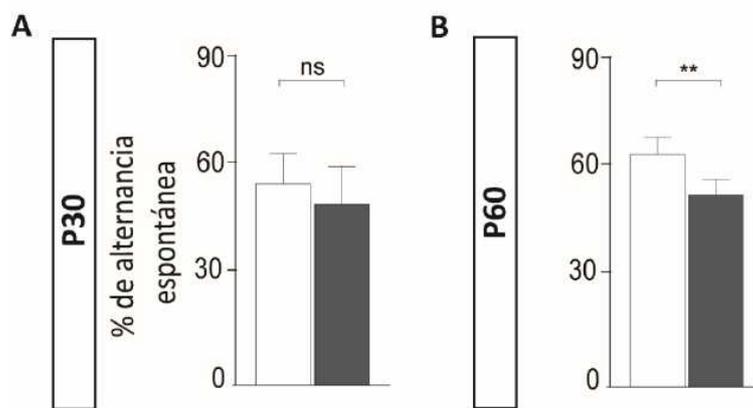
En sumatoria, para el estudio del comportamiento de ansiedad se utilizó el examen del enterramiento de bolitas, que analiza el comportamiento repetitivo y perseverante (Laurent B.Nicolas 2006). Se entiende en este contexto que una reducción en el número de bolitas enterradas indicaría niveles de ansiedad reducidas en ratones. En la **figura 11** se observan los resultados obtenidos en los animales controles y mutantes condicionales, tanto jóvenes como adultos. El número de bolitas enterradas en los animales jóvenes no difirió entre genotipos. Sin embargo, los adultos mutantes condicionales enterraron menor cantidad de bolitas que los controles, exhibiendo una ansiedad reducida y un comportamiento compulsivo disminuido en relación a los ratones controles.



**Figura 11. Estudio por medio del enterramiento de bolitas.** Los animales jóvenes no exhibieron diferencias (A) mientras que los animales adultos mutantes condicionales enterraron menos bolitas en comparación con los animales controles (B, C). ns= no significativo; \* $P \leq 0.05$ , Mann Whitney, N= 10-14 animales por grupo.

A continuación, se evaluaron aspectos cognitivos mediante el “laberinto en Y”. Los ratones presentan la tendencia a alternar entre los brazos de un laberinto con estas características e investigar un brazo novedoso antes que regresar a un brazo conocido, previamente

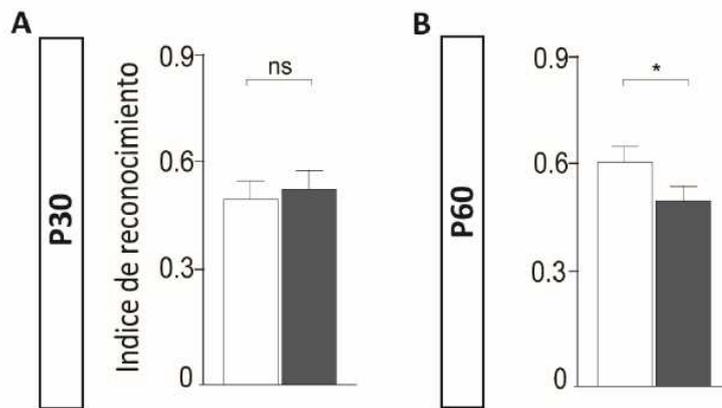
visitado. En la **figura 12** se observa que no se presentaron diferencias en la alternancia en los ratones jóvenes, mientras que se presentó una disminución en el porcentaje de alternancia espontánea de los mutantes condicionales adultos, demostrando así una alteración a nivel cognitivo.



**Figura 12. Porcentaje de alternancia espontánea.** Los animales jóvenes no presentaron diferencias en el porcentaje de alternancia espontánea (A). Por el contrario, se observa una disminución en la alternancia en los mutantes condicionales adultos (B). ns= no significativo; \*\* $P \leq 0.01$ , t de Student, N= 10-14 animales por grupo.

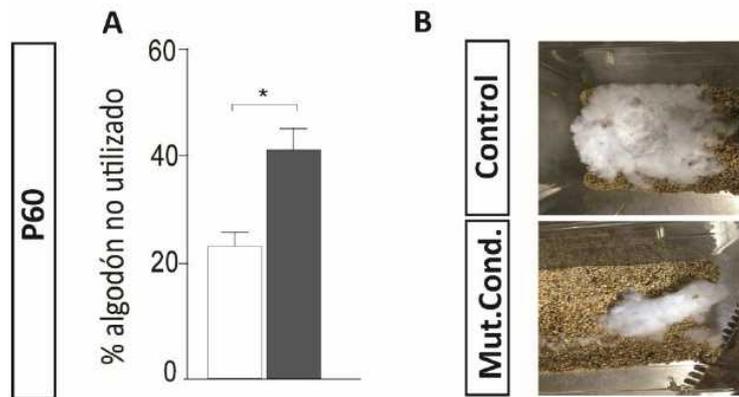
La novedad es una alteración de un evento esperado probable, basado tanto en información previa, como la exposición previa a un objeto, así como a estimaciones internas de situaciones probables (Antunes and Biala 2012). El test de reconocimiento de un objeto novedoso (NOR, por su significado en inglés “Novel Object Recognition test”) evalúa la habilidad de los roedores para reconocer un objeto que previamente desconocía. Se utilizó el test NOR para evaluar la memoria a corto plazo de los animales de ambos genotipos de ambas edades en estudio. Una vez más, los animales jóvenes no presentaron diferencias en

cuanto a la preferencia de exploración entre uno y otro objeto. Sin embargo, en la **figura 13** se observa que los ratones controles adultos presentaron un índice de reconocimiento del objeto novedoso más alto, indicando que pasaron mayor porcentaje de tiempo explorando al objeto novedoso. Por el contrario, los animales adultos mutantes condicionales presentaron un índice de reconocimiento cercano al 50%, sugiriendo que pasaron la misma cantidad de tiempo explorando el objeto novedoso y el objeto conocido, sugiriendo así una alteración en la memoria.



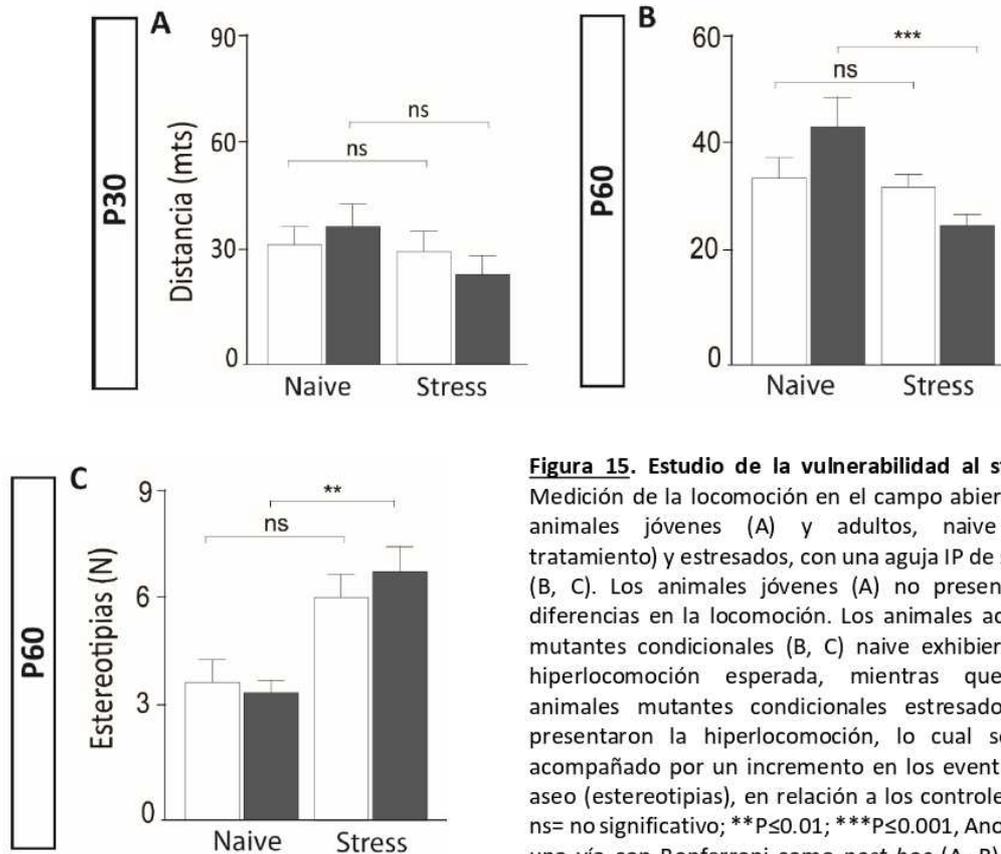
**Figura 13. Índice de reconocimiento del objeto novedoso.** Los animales jóvenes de ambos genotipos pasaron aproximadamente la misma cantidad de tiempo explorando ambos objetos (A). Los animales adultos mutantes condicionales presentaron un índice de reconocimiento cercano a 0.5, indicando que pasaron la misma cantidad de tiempo en ambos objetos, sin embargo, los animales controles adultos pasaron mayor parte del tiempo explorando al objeto novedoso. ns= no significativo; \* $P \leq 0.05$ . t de Student, N= 10-14 animales por genotipo.

Los nidos son considerados de suma importancia para los roedores pequeños para la conservación del calor, así como para reproducción y refugio. Los nidos constituyen una evidencia directa del comportamiento animal respecto de la motivación para mejorar su aptitud y aumentar sus chances de supervivencia. En general, los ratones normales estarían motivados a una construcción del nido, al estar en contacto con material con el cual puedan construirlo. A continuación, se evaluó la motivación de los animales para armar el nido. Para ello, se proveyó a los animales de ambos genotipos con una pieza de algodón prensado a partir del cual podrían construir su nido, a través del desmenuzamiento de dicha pieza. En la **figura 14** se grafica el porcentaje de algodón que no fue utilizado para armar los nidos, y se puede observar que los animales mutantes condicionales adultos no sólo utilizaron menos algodón, sino que también armaron nidos más desorganizados.



**Figura 14.** Test de la motivación para el armado del nido. Porcentaje de algodón no utilizado para la construcción del nido (A). Imágenes representativas de la forma de los nidos armados por los animales controles y los mutantes condicionales (B). \* $P \leq 0.05$ , Wilcoxon, Mann Whitney,  $N = 10-14$  animales por genotipo.

El estrés es una experiencia que influencia el comportamiento y el bienestar del organismo, y, en situaciones extremas, contribuye a numerosas patologías. El hipocampo es una región cerebral que es conocida por ser influenciada por situaciones estresantes como la presencia de predadores, situaciones riesgosas, entre otras (Anthony A. Grace 2016; Kim, Pellman, and Kim 2015). Los agentes estresantes pueden producir consecuencias deletéreas en los organismos a nivel fisiológico (cambios en el flujo sanguíneo y en la composición sanguínea), así como en el comportamiento (reacciones emocionales y estereotipias, que incluyen acciones repetitivas como olfateo y aseo), en donde la respuesta al estrés presenta una función adaptativa (Garner 2005; Laurence et al. 2015). Se estudió que efecto podría generar un evento estresante, en este caso una inyección intraperitoneal (IP) de solución fisiológica, en la actividad locomotora y las estereotipias, los cuales fueron cuantificados por medio del test del campo abierto. En **la figura 15** se puede observar que no se presentaron cambios en la locomoción de los animales jóvenes, independientemente del genotipo en estudio. En cambio, en los animales adultos se observó una disminución en la locomoción total de los mutantes condicionales luego de la aplicación del agente estresante respecto de los animales que no recibieron la inyección. Esta disminución en la locomoción total se vio acompañada por un incremento de estereotipias en los animales mutantes condicionales adultos.



**Figura 15. Estudio de la vulnerabilidad al stress.**

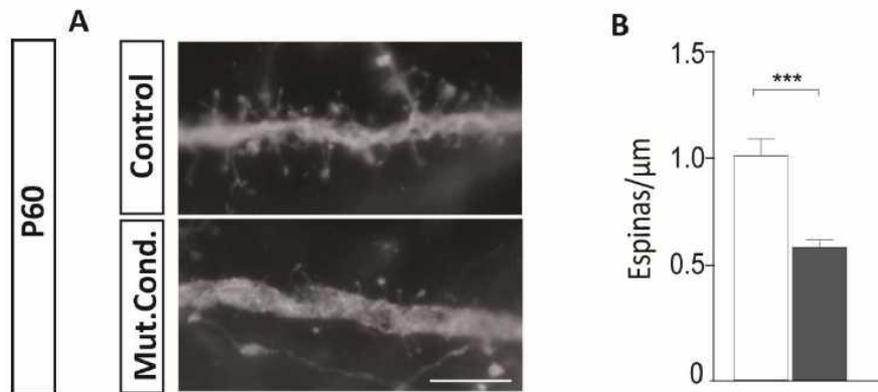
Medición de la locomoción en el campo abierto en animales jóvenes (A) y adultos, naive (sin tratamiento) y estresados, con una aguja IP de salina (B, C). Los animales jóvenes (A) no presentaron diferencias en la locomoción. Los animales adultos mutantes condicionales (B, C) naive exhibieron la hiperlocomoción esperada, mientras que los animales mutantes condicionales estresados no presentaron la hiperlocomoción, lo cual se vio acompañado por un incremento en los eventos de aseo (estereotipias), en relación a los controles (C). ns= no significativo; \*\* $P \leq 0.01$ ; \*\*\* $P \leq 0.001$ , Anova de una vía con Bonferroni como *post hoc* (A, B), t de Student (C) N=10-14 animales por genotipo.

En resumen, mediante el análisis del comportamiento se observaron déficits del tipo cognitivo, motivacionales y de la actividad locomotora que son reminiscentes a los observados en pacientes. Resulta importante destacar que estas alteraciones se presentaron solamente en animales adultos, siguiendo así una aparición de los síntomas que tiene un paralelo a lo que ocurre en pacientes con esquizofrenia, es decir hacia el final de la adolescencia o el inicio de la adultez.

### **Alteraciones en la CPF**

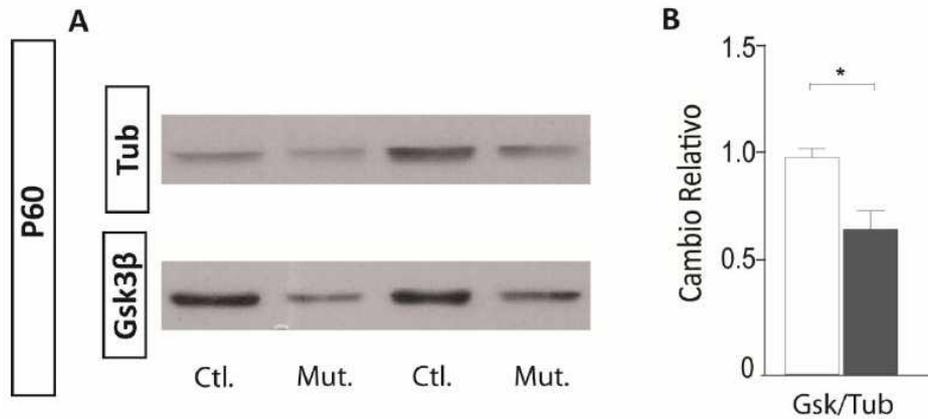
La acción de la dopamina sobre las NPi de la CPF es compleja, ya que depende de qué tipo de receptor es activado. Los DRD1 incrementan la excitabilidad de las NPi y promueven la función de NMDAR. Por el contrario, a través del DRD2 se genera la activación de las interneuronas provocando la disminución de la excitabilidad de las NPi y generando así una inhibición mediada por GABA (K. Y. Tseng and O'Donnell 2004).

La esquizofrenia como desorden del neurodesarrollo incluye defectos en los circuitos neuronales, dentro de los que se incluyen alteraciones en las espinas dendríticas. Se ha demostrado previamente que la señalización dopaminérgica a través del DRD2 regula la morfogénesis de espinas dendríticas de las NPi (Jia et al. 2013). Con el propósito de estudiar el posible impacto de la eliminación del DRD2 en distintos aspectos de la CPF, se comenzó con el estudio de la densidad de espinas dendríticas en la CPF. Los resultados indicaron que los animales adultos mutantes condicionales presentaron una drástica reducción en la densidad de espinas dendríticas en comparación con los controles (**Figura 16**) resultado que está de acuerdo con lo observado en estudios post mortem de pacientes con esquizofrenia (Konopaske et al. 2014).



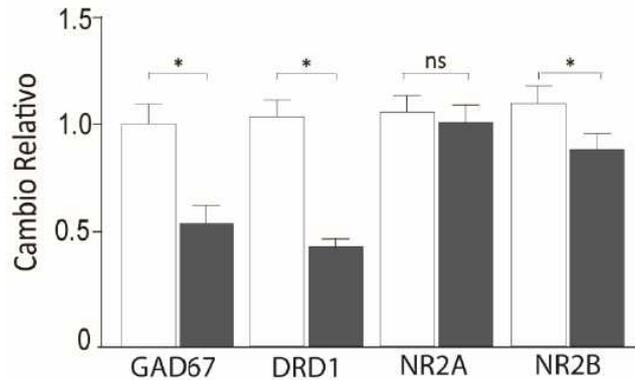
**Figura 16. Densidad de espinas dendríticas.** Microfotografías de las espinas dendríticas de NPi en la CPF en animales control y mutante condicionales (A). Cuantificación del número de espinas por  $\mu\text{m}$ . Se observa una reducción cercana al 50% de las espinas dendríticas en los mutantes condicionales. La barra indica 5  $\mu\text{m}$ . \*\*\* $P \leq 0.01$ , t de Student,  $N=7-9$  dendritas de  $N=3$  animales por genotipo.

La quinasa Glucógeno Sintasa 3B (Gsk3 $\beta$ ) es una proteína quinasa muy abundante en el cerebro, involucrada en cascadas de transducción de señales de múltiples procesos celulares, particularmente en el neurodesarrollo (Kozlovsky, Belmaker, and Agam 2000). Gsk3 $\beta$  es una molécula río abajo de la señalización del DRD2 y está implicada en la transducción de la señal luego de la unión de dopamina al DRD2, en donde ha sido demostrada la desregulación de dicha señalización con la esquizofrenia (Beaulieu et al. 2004). Adicionalmente, se han visto reducidos los niveles de Gsk3 $\beta$  en la CPF de pacientes con esquizofrenia (Emamian et al. 2004; Kozlovsky, Belmaker, and Agam 2000). Por medio de western blot se analizaron los niveles de Gsk3 $\beta$  en la CPF en ambos genotipos en animales adultos. Pudimos observar que la expresión de dicha proteína sufrió una disminución significativa en mutantes condicionales respecto a los controles (**figura 17**).



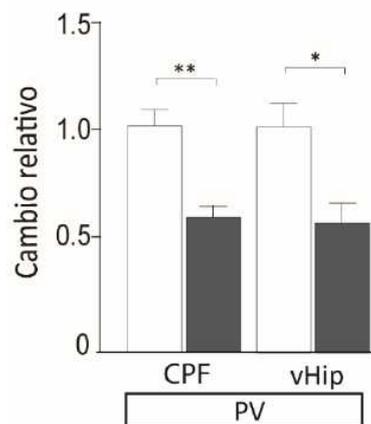
**Figura 17. Alteración en los niveles de Gsk3β.** Fotografía representativa de las membranas de WB con la disminución de los niveles proteicos de Gsk3β totales en mutantes condicionales (A). Cuantificación de los niveles de proteína (B). t de Student, \*P≤0.05. N= 5-6 animales por genotipo.

Dado que reducciones en los niveles de GAD67 y PV son características centrales en la etiología de la esquizofrenia, se decidió estudiar que ocurría con los niveles del mensajero de GAD67 y PV en los animales mutantes condicionales. Se estudiaron también los niveles de otro tipo de receptor de dopamina, el DRD1, para evaluar si la pérdida de un tipo de receptor de dopamina podría alterar la expresión de otro tipo de receptor dopaminérgico. Por otra parte, dadas las evidencias que apoyan a la teoría hipoglutamatérgica de la esquizofrenia, se determinaron también los niveles de expresión de dos subunidades del NMDAR claves durante el neurodesarrollo, NR2A y NR2B. En la **figura 18** se observa una drástica reducción de los niveles de GAD67, así como también del DRD1 en la CPF de los mutantes condicionales adultos en relación a los controles. Resulta interesante destacar que no se observaron cambios en la expresión de NR2A, pero sí se observó una significativa disminución de la subunidad de NR2B en los mutantes condicionales.



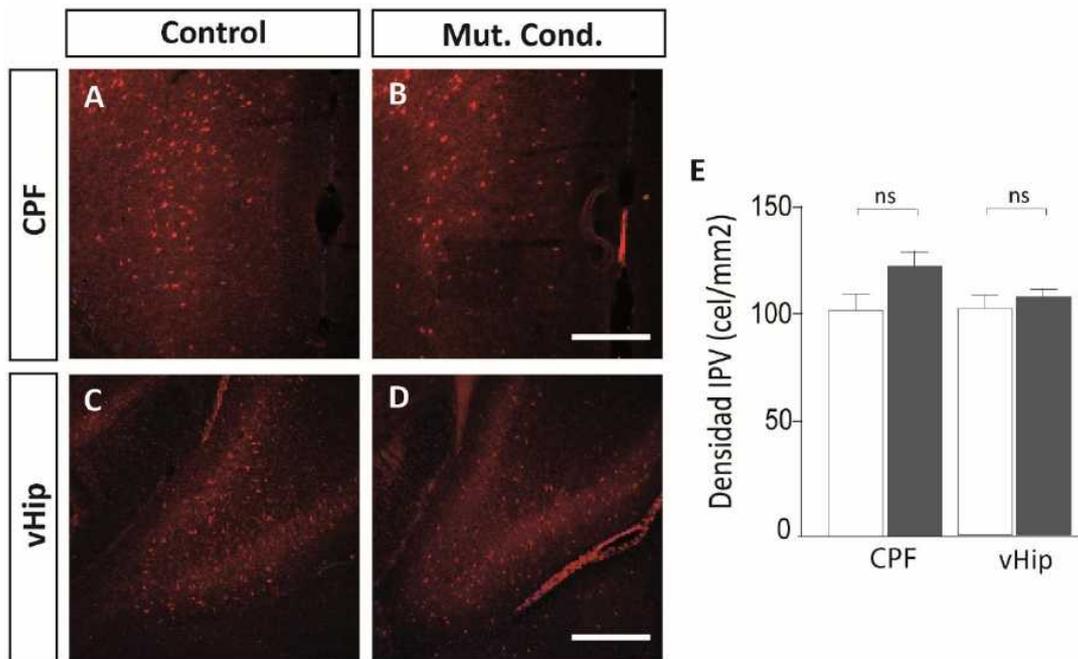
**Figura 18. Expresión génica anormal en CPF.** Cambio relativo de los niveles de ARNm de GAD67, DRD1, y las subunidades del NMDAR: NR2A y NR2B. t de Student, ns= no significativo, \* $P \leq 0.05$ . N= 5-8 animales por genotipo.

Para analizar posibles alteraciones en la funcionalidad de las IPV, se evaluó la expresión de PV por medio de qPCR, en la CPF y el vHip. En la **figura 19** se puede observar que los mutantes condicionales presentan una reducción significativa en la expresión de PV respecto de los controles, tanto en la CPF como en el vHip.



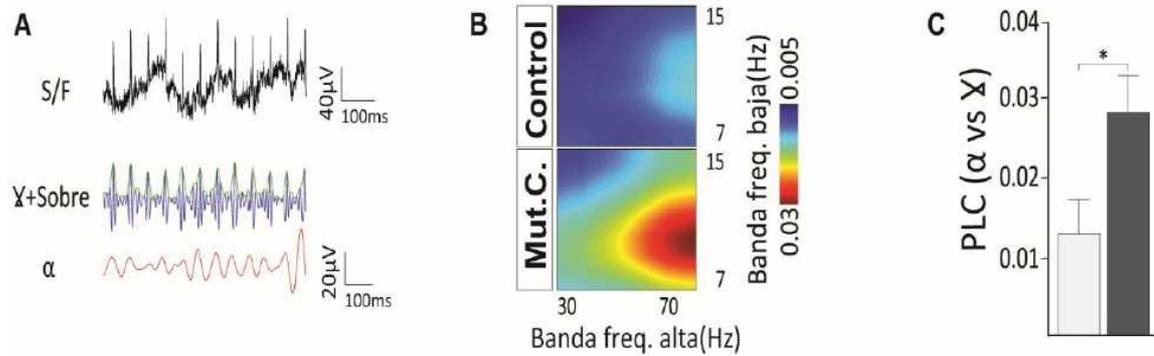
**Figura 19. Disminución de la expresión del ARNm de PV en los mutantes condicionales.** Disminución de la expresión de ARNm PV en la CPF y el vHip en animales mutantes condicionales, tras la delección selectiva del DRD2 de las IPV. \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , t de Student, N= 6-8 animales por genotipo.

Interesantemente, se observó dicha alteración en la expresión de PV, a pesar de que no se observan diferencias en la densidad de interneuronas en ambas regiones (**figura 20**)

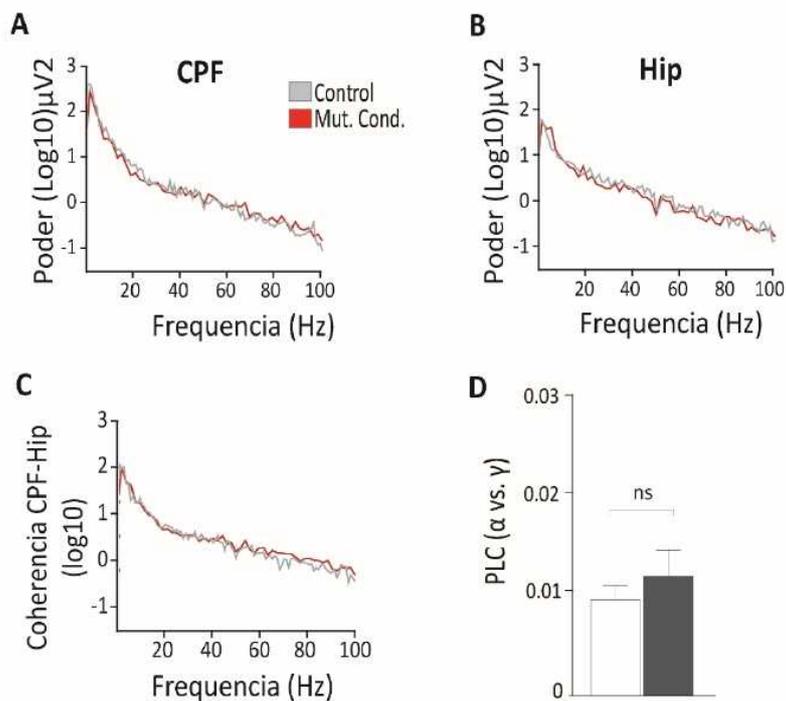


**Figura 20.** Cuantificación de interneuronas de Parvalbúmina en la corteza prefrontal y el hipocampo ventral. Imágenes de IFI de PV de la CPF (A, B) e vHIP (C, D) en ratones controles (A, C) y mutantes condicionales (B, D). Cuantificación de las interneuronas de Parvalbúmina (E). La barra indica 250  $\mu$ m. ns= no significativo, t de Student, N= 8-12 animales por genotipo.

Los pacientes con esquizofrenia presentan déficits cognitivos que están correlacionados con alteraciones en la producción de las oscilaciones gamma para las cuales las interneuronas de PV juegan un papel central. El potencial de campo local (PCL) es un estudio electrofisiológico en el cual se analizan las señales generadas por la suma de las corrientes eléctricas de neuronas cercanas. La actividad oscilatoria que se obtiene mediante este estudio es descompuesta en las distintas frecuencias para luego realizar un análisis de cada una. Por ello, estudiamos la actividad oscilatoria por medio de la determinación de PCL tanto en la CPF como en el hipocampo de los ratones adultos de ambos genotipos. El objetivo fue analizar no sólo la actividad de los ritmos oscilatorios dentro de una región, sino también la coherencia entre las regiones en estudio. En la **figura 21** observamos los resultados obtenidos del análisis de la actividad oscilatoria en donde se observó un excesivo acople de una banda de menor frecuencia, alfa, y una frecuencia más alta, gamma, en la CPF de los ratones mutantes condicionales en relación a los controles. No se observaron diferencias en el espectro de poder a lo largo de las frecuencias analizadas entre ambos genotipos ni en la coherencia entre las regiones cerebrales estudiadas (**figura 22**).

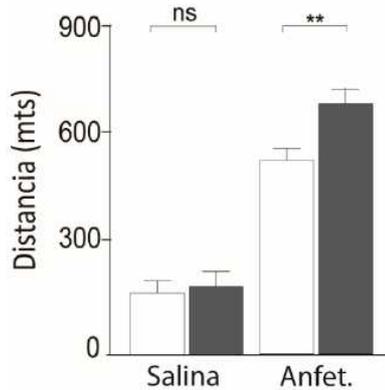


**Figura 21. Actividad oscilatoria.** Se filtró la señal obtenida del potencial de campo local (PCL) y se estudiaron todas las bandas (A). Mediante el PCL se observó un excesivo acople de la banda alfa y gamma en mutantes condicionales en la CPF (B, C). t de student, \* $P \leq 0.05$ . N= 5-6 animales por genotipo.



**Figura 22. Espectro de poder y coherencia entre CPF y vHip.** El espectro de poder a lo largo de las frecuencias en CPF (A) e hipocampo (B), o la coherencia entre estas estructuras (C). No se observaron diferencias en el espectro de poder en CPF e Hip (A, B) y tampoco en la coherencia entre ambas regiones (C). El PCL no presentó diferencias entre genotipos para el Hip (D). t de student, ns= no significativo. N= 5-6 animales por genotipo.

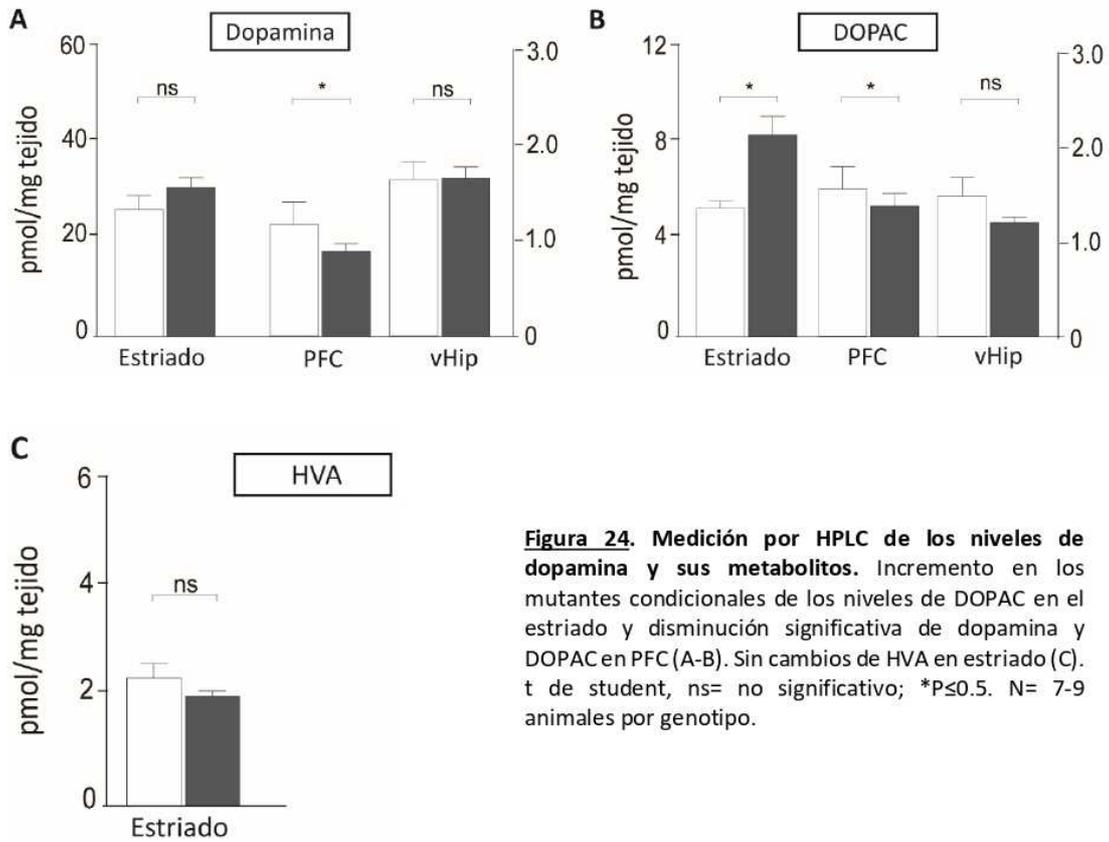
La administración crónica de anfetamina en roedores, un agonista indirecto dopaminérgico, es un modelo farmacológico de la enfermedad firmemente establecido (R. Chen et al. 2007a), que induce una sensibilización persistente exagerando la hiperactividad producida luego de la administración de una dosis de dicha droga. El uso de anfetamina en personas sanas conduce al desarrollo de comportamientos que son similares a los síntomas positivos de la enfermedad. Mas aun, ha sido demostrado que la administración de anfetamina a pacientes provoca la reaparición de síntomas. Si el mutante condicional para el receptor D2 puede encuadrarse como un modelo animal de esta enfermedad, una dosis única de anfetamina debería resultar en una respuesta locomotora aumentada, es decir, con hipersensibilidad. Al administrar anfetamina a los animales, no se presentaron diferencias en la actividad locomotora entre genotipos en el grupo al cual fue administrado solución salina, en donde la hiperlocomoción de los animales mutantes condicionales se vio inhibida probablemente por la sensibilidad al estrés tras la inyección de solución salina (**Figura 23 y Figura 15**). En cambio, se observa que los animales mutantes condicionales exhibieron una locomoción incrementada en comparación con los controles luego de la administración de anfetamina (**Figura 23**).



**Figura 23. Hipersensibilidad a la anfetamina.**

Distancia total recorrida durante 1 hora en el campo abierto luego de la administración de una dosis simple de anfetamina (5mg/kg). Los animales mutantes condicionales adultos fueron hipersensibles en comparación con los controles. Anova de una vía con el test de Bonferroni como post hoc, ns= no significativo, \*\* $P \leq 0.01$ . N=10-14 animales por genotipo.

Debido a que la hipótesis dopaminérgica postula un desbalance en la neurotransmisión dopaminérgica entre estructuras corticales (CPF) y subcorticales (estriado), se analizaron los niveles de dopamina y sus metabolitos, tanto en la CPF como en el hipocampo ventral y el estriado de animales controles y mutantes condicionales adultos, con el objetivo de determinar si en mutante condicional del receptor D2 se exhibe un patrón similar. Por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se cuantificaron los niveles de dopamina, ácido 3,4-dihidroxipentalacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) en dichas estructuras. La **figura 24** muestra un incremento significativo de DOPAC en el estriado (**figura 24 B**) y una reducción significativa de dopamina y DOPAC en la PFC de los ratones mutantes condicionales (**figura 24 A-B**). No se observaron diferencias en los niveles de HVA, que lamentablemente pudieron ser determinados únicamente en el estriado debido a la sensibilidad del equipo (**figura 24 C**).

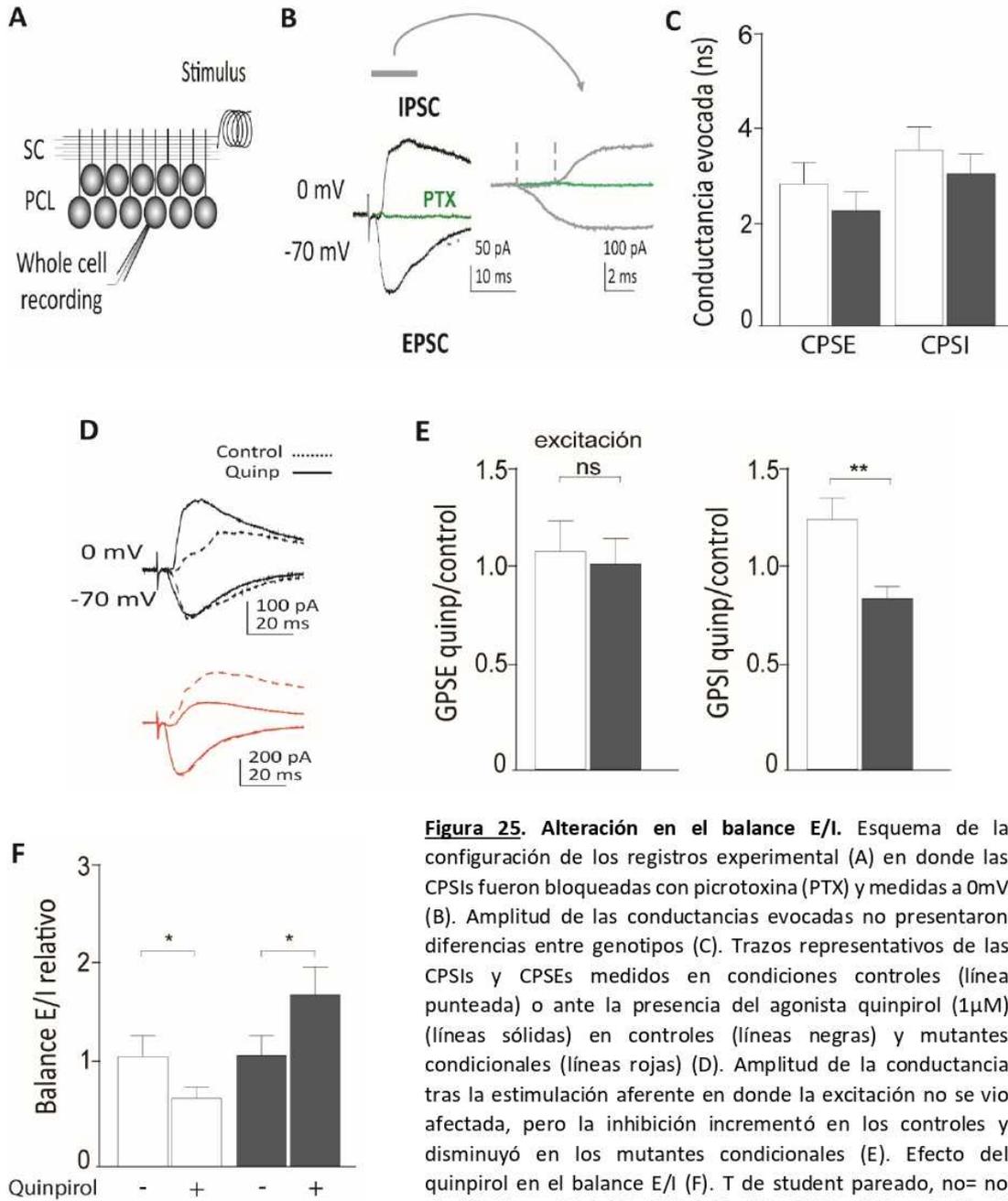


**Figura 24. Medición por HPLC de los niveles de dopamina y sus metabolitos.** Incremento en los mutantes condicionales de los niveles de DOPAC en el estriado y disminución significativa de dopamina y DOPAC en PFC (A-B). Sin cambios de HVA en estriado (C). t de student, ns= no significativo; \* $P \leq 0.05$ . N= 7-9 animales por genotipo.

### Estudio del hipocampo ventral

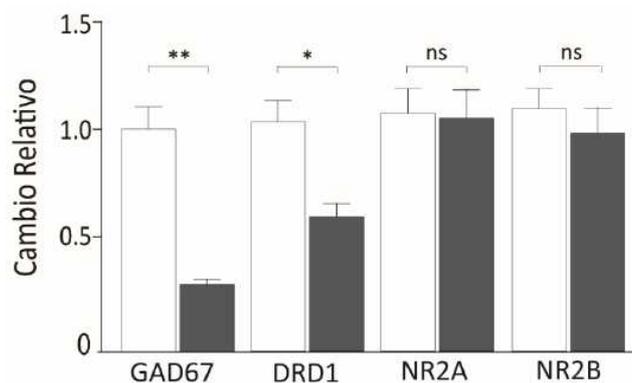
El hipocampo ha sido ampliamente vinculado con la esquizofrenia, en donde se ha visto que presenta menor tamaño en pacientes. A través de estudios por imágenes se ha observado una hiperactividad en el hipocampo de pacientes con esta enfermedad, y, que esta hiperactividad se correlaciona con la aparición de la psicosis (Anthony A. Grace 2016; Heckers 2001; Suddath et al. 1990). Dada las extensas evidencias que asocian a la esquizofrenia con alteraciones del hipocampo ventral decidimos realizar un estudio minucioso de dicha región. Por ello, evaluamos inicialmente la respuesta de las neuronas

piramidales del área CA1 del hipocampo a la estimulación aferente y se llevaron a cabo estudios electrofisiológicos por medio de patch clamp sobre NPi. Se comenzó con registros de voltaje constante para analizar las corrientes post sinápticas excitatorias e inhibitorias (CPSE y CPSI, respectivamente) evocadas por la estimulación de la vía colateral de Schaffer, que constituye la vía aferente principal al área CA1 del hipocampo. La **figura 25** ilustra un esquema representativo de cómo fue llevado a cabo el experimento (**figura 25 A**), en donde las CPSIs medidas a 0mV fueron completamente bloqueadas por picrotoxina, bloqueante no competitivo de los receptores GABA<sub>A</sub> (**figura 25 B**; ver materiales y métodos). No se observaron diferencias en la conductancia evocada tanto de CPSEs como de CPSIs en ambos genotipos en estudio (**figura 25 C**). Sin embargo, ante la presencia de quinpirol, la respuesta evocada por los controles y los mutantes condicionales ante la estimulación aferente fue distinta. La inhibición se vio significativamente incrementada en los controles luego de la adición del quinpirol, mientras que en los mutantes condicionales se vio disminuida (**figura 25 D-E**). Este efecto diferencial en la inhibición generó un cambio en el balance E/I tras la estimulación aferente (**figura 25 F**).



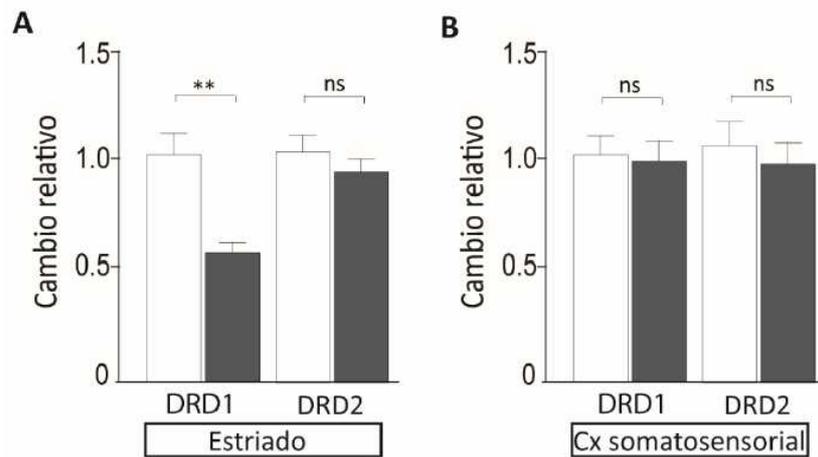
**Figura 25. Alteración en el balance E/I.** Esquema de la configuración de los registros experimentales (A) en donde las CPSIs fueron bloqueadas con picrotoxina (PTX) y medidas a 0mV (B). Amplitud de las conductancias evocadas no presentaron diferencias entre genotipos (C). Trazos representativos de las CPSIs y CPSEs medidos en condiciones controles (línea punteada) o ante la presencia del agonista quinpirol (1 $\mu$ M) (líneas sólidas) en controles (líneas negras) y mutantes condicionales (líneas rojas) (D). Amplitud de la conductancia tras la estimulación aferente en donde la excitación no se vio afectada, pero la inhibición incrementó en los controles y disminuyó en los mutantes condicionales (E). Efecto del quinpirol en el balance E/I (F). T de student pareado, no= no significativo, \*P $\leq$ 0.05, \*\*P $\leq$ 0.01. N= 6-10 células de N= 5 animales por genotipo.

Los resultados obtenidos en la figura 25 nos permitieron concluir que la delección selectiva del DRD2 de las IPV provocó una relación entre excitación e inhibición alterada en el hipocampo de los animales mutantes condicionales, con una disminución en la actividad inhibitoria. Nos preguntamos entonces si la síntesis de GABA estaría también afectada en el hipocampo, dado que previamente se demostró la reducción de los niveles de GAD67 en la CPF (**ver figura 18**). Se realizó la cuantificación relativa de los niveles de ARNm de GAD67 en el hipocampo ventral y se encontró una reducción significativa de su expresión en los animales mutantes condicionales adultos. Por otro lado, una neurotransmisión alterada podría modificar los niveles de expresión de los receptores dopaminérgicos y glutamatérgicos. Entonces, se analizaron los niveles de DRD1, así como de NR2A y NR2B en el hipocampo. Observamos una drástica reducción de los niveles del DRD1 en los mutantes condicionales, pero no se vieron diferencias en los niveles del mensajero de las subunidades del receptor de NMDA (**figura 26**).



**Figura 26. Expresión génica anormal en vHip.** Cambio relativo de los niveles de ARNm de GAD67, DRD1, y las subunidades del NMDAR: NR2A y NR2B. t de Student, ns= no significativo, \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ . N= 5-8 animales por genotipo.

Para estudiar si la disminución de los niveles de receptores dopaminérgicos era un hecho generalizado, se estudió que ocurría con los receptores dopaminérgicos DRD1 y DRD2 en una región con elevada inervación dopaminérgica, el estriado, y otra en donde la inervación dopaminérgica es más discreta, la corteza somatosensorial. Se analizaron por qPCR los niveles de mensajero y se observó una drástica reducción del DRD1 en el estriado de los mutantes condicionales. Por el contrario, no se observaron cambios entre genotipos para ambos receptores en la corteza somatosensorial (**figura 27**).



**Figura 27. Cuantificación de los niveles del ARNm de los receptores de dopamina.** Reducción de DRD1, pero no DRD2 en estriado de mutantes condicionales (A). En la corteza (Cx) somatosensorial, región con poca inervación dopaminérgica, no se observaron cambios en animales controles y mutantes condicionales (B). t de Student, ns= no significativo; \*\* $P \leq 0.1$ . N= 5 animales por genotipo.

Los resultados obtenidos en esta sección demostraron que los animales con la delección selectiva del DRD2 de las IPV exhibieron características reminiscentes a la esquizofrenia, ya que presentaron alteraciones a nivel molecular, celular, fisiológico y de comportamiento, comparables a las que se observan en pacientes con esta enfermedad. Los animales mutantes condicionales exhibieron fenotipos de tipo esquizofrenia, con síntomas que solo se presentaron a partir de la adultez, siguiendo el mismo patrón temporal de aparición sintomatológico observado en pacientes. En adición, se presentaron alteraciones en la CPF y el hipocampo, así como una desregulación y desbalance del sistema dopaminérgico.

## **Resultados PARTE III**

### **Estudio de la actividad funcional del receptor de dopamina D2 en las interneuronas de Parvalbúmina**

### **Resultados Parte III: Estudio de la actividad funcional del receptor de dopamina D2 en las interneuronas de Parvalbúmina**

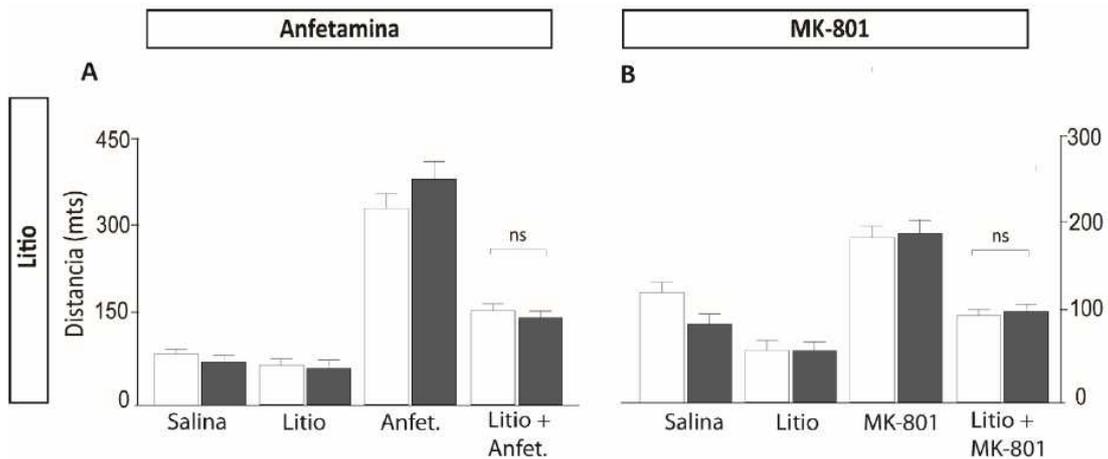
Dada la alta similitud de los fenotipos observados previamente en los animales mutantes condicionales carentes del receptor de dopamina D2 con los observados en pacientes y, puesto que el DRD2 es el blanco principal de la mayoría de los antipsicóticos, decidimos explorar la relevancia de la actividad funcional de este receptor en las interneuronas de PV para el tratamiento y la efectividad de diferentes drogas, incluyendo los antipsicóticos. Esto nos permitiría acercarnos al entendimiento sobre el mecanismo de acción de las distintas drogas utilizadas.

### **Regulación de la neurotransmisión dopaminérgica por Litio**

La modulación de la señalización de Akt/Gsk3 $\beta$  por litio, antagoniza el desarrollo de comportamientos dependientes de dopamina en roedores. Dentro de sus efectos, el litio inhibe a Gsk3 $\beta$  de manera directa, o por la vía indirecta a través de la inhibición por Akt (Beaulieu et al. 2004)

Para investigar la acción del litio sobre la vía DRD2/Akt/Gsk3 $\beta$  ante la delección del DRD2 de las IPV, ratones controles y mutantes condicionales adultos fueron tratados con una dosis simple de litio bajo condiciones en donde se activa Akt y se genera la inhibición de Gsk3 $\beta$ , pero que no representa toxicidad para el animal. Los animales de ambos genotipos fueron tratados con dos psicotrópicos diferentes: anfetamina o MK-801, un antagonista del NMDAR que indirectamente libera dopamina de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo. Estos psicotrópicos producen un incremento en la locomoción total en

ratones, constituyendo un efecto que se asemeja a los síntomas psicóticos de la esquizofrenia. La administración del litio se realizó sola o en combinación con uno u otro psicotrópico, en donde se observó una disminución en la locomoción total tras el tratamiento combinado. Dicho rescate de la locomoción se observó en ambos genotipos, indicando así que los efectos del litio no serían mediados por el DRD2 expresado en las IPV (figura 28) y que podría ser debido a un exceso de la forma activa de Gsk3 $\beta$  en neuronas piramidales.

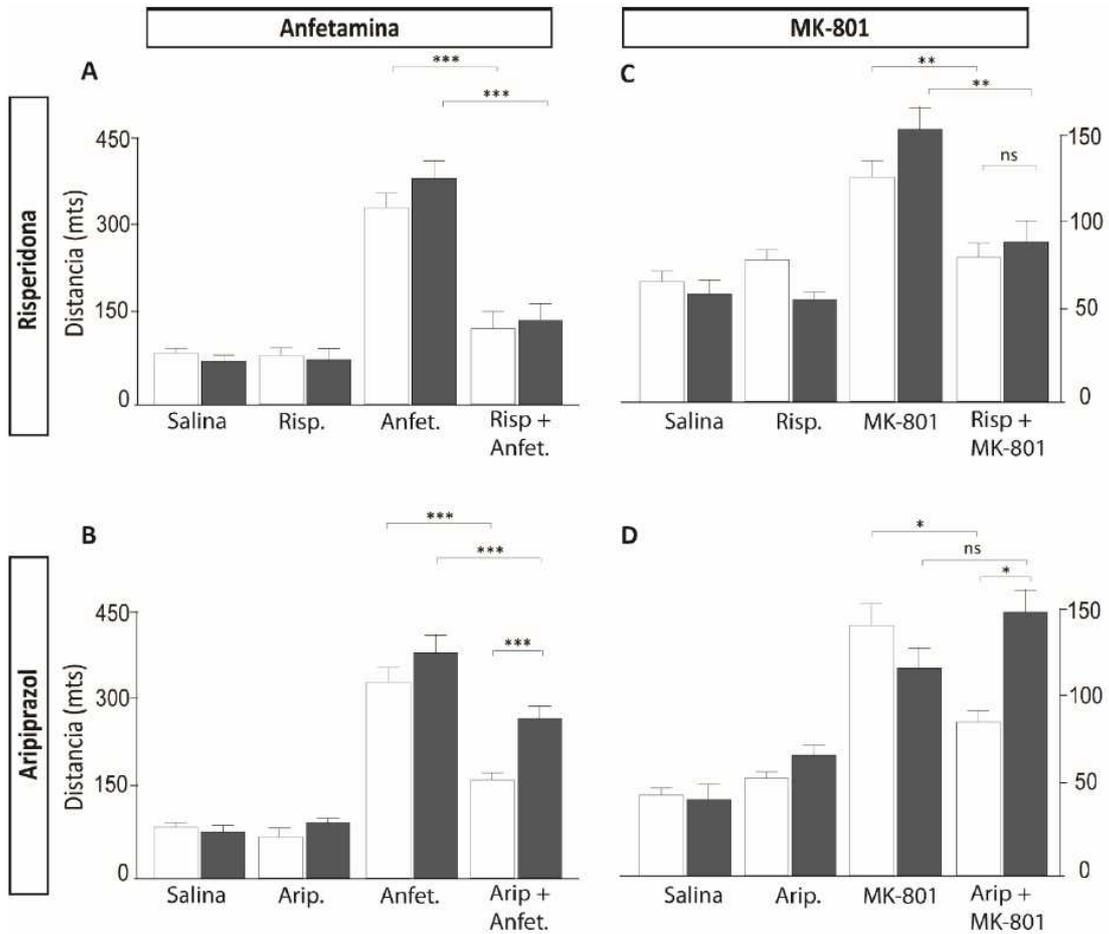


**Figura 28. Tratamiento con litio.** Medición de la locomoción total en el campo abierto luego de la administración de litio (200mg/kg) en combinación con anfetamina (5mg/kg) (A) o MK-801 (0,2mg/kg) (B) En ambos casos se observó una recuperación de la locomoción a estados basales. Anova de una vía con el test Bonferroni como *post hoc*, ns= no significativo. N= 12-15 animales por genotipo.

### **Respuesta al tratamiento agudo con risperidona y aripiprazol**

Con el objetivo de evaluar el requerimiento del receptor D2 expresado en las IPV por parte de los antipsicóticos, diseñamos un experimento similar al realizado con Litio (ver figura 28), pero en este caso fueron utilizados dos antipsicóticos de amplio uso en la clínica actual: la risperidona, un antagonista del DRD2 y, el aripiprazol, un agonista parcial del DRD2. Para ello, se trataron a los animales de ambos genotipos con amfetamina o MK-801, en donde cada psicotrópico fue utilizado solo o en combinación con uno u otro de los antipsicóticos para este estudio, buscando restaurar una locomoción normal en los animales.

Cuando la risperidona fue administrada en combinación con MK-801 como con amfetamina, la locomoción total fue reducida a los niveles basales en ambos genotipos, indicando así que la expresión del DRD2 en las interneuronas de PV no sería requerido para que la risperidona pueda ejercer sus efectos. Posteriormente, los animales fueron tratados con aripiprazol, que, al ser combinado con amfetamina, generó una reducción significativa de la locomoción en los ratones controles. Por el contrario, los ratones mutantes condicionales mostraron solamente una reducción parcial en la locomoción total. Más aun, la administración de aripiprazol en combinación con MK-801 en ratones controles generó una reducción significativa de la locomoción, mientras que los mutantes condicionales fueron completamente refractarios al tratamiento con aripiprazol (**figura 29**).

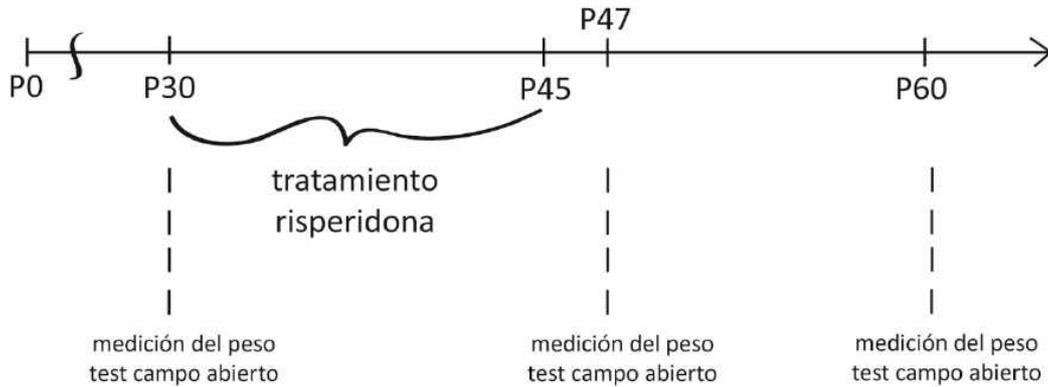


**Figura 29. Respuesta diferencial al aripiprazol de los mutantes condicionales.** Locomoción en el campo abierto luego de la administración de anfetamina (5mg/kg, IP) (A, B) o MK-801 (0,2mg/kg) (C, D), y el efecto de risperidona (0,025mg/kg) (A, C) o aripiprazol (0,6mg/kg) (B, D). Efecto combinado de risperidona y anfetamina (A), risperidona y MK-801 (C), aripiprazol y anfetamina (B) y aripiprazol y MK-801 (D) en animales controles y mutantes condicionales. \*  $P \leq 0.05$ , \*\*  $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , ns, no significativo. ANOVA de una vía con el test *post hoc* de Bonferroni,  $n = 12-14$  animales por grupo (A-D).

**Utilización del modelo animal carente del DRD2 para el diseño de un tratamiento farmacológico durante la etapa periadolescente**

Uno de los grandes impedimentos para el desarrollo de nuevas terapias es la falta de entendimiento de los mecanismos que subyacen a la patología de la esquizofrenia, lo que resulta en una carencia de blancos moleculares para prevenirla o eventualmente tratarla (Jones, Watson, and Fone 2011).

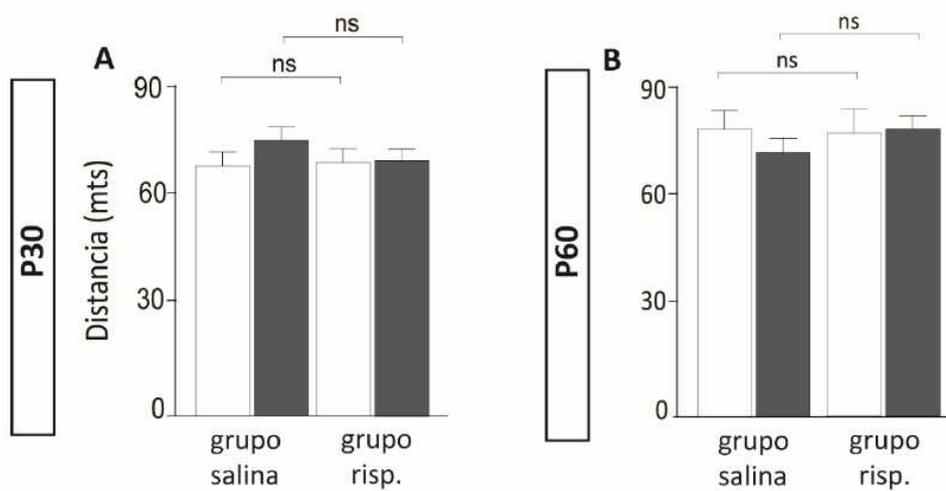
La transición entre la adolescencia y la adultez resulta un período crítico y vulnerable durante el neurodesarrollo para la aparición de enfermedades psiquiátricas. Parte de los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los mutantes condicionales del receptor D2 despliegan un sistema dopaminérgico hiperactivo. Por ello, se diseñó un experimento para estudiar qué ocurriría en los ratones mutantes condicionales tras el tratamiento crónico con risperidona, muy utilizada como tratamiento para pacientes con esquizofrenia, durante un período ventana de la pubertad. Por consiguiente, se trataron a los animales controles y mutantes condicionales durante 15 días con risperidona (**figura 30**), en donde se controló el normal crecimiento de los animales por la edad e independientemente del tratamiento (risperidona o solución salina).



**Figura 30.** Diseño experimental del tratamiento crónico realizado con Risperidona. Administración del antagonista por 15 días, de P30 a P45. A P47 se realizó la medición de la locomoción. En P60 se volvió a realizar la medición.

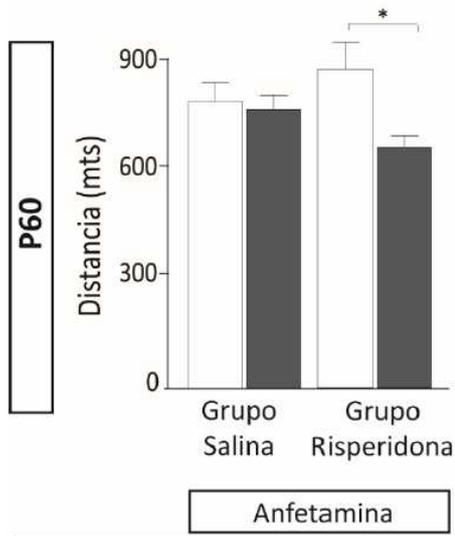
Se realizó la medición de la locomoción total en el campo abierto y se observó que a P30, previo al inicio del tratamiento crónico con risperidona, no se presentaron diferencias entre genotipos y grupos (**figura 31 A**). A continuación, se estudió la locomoción en  $P \geq 60$  y se observó una disminución en la locomoción de los mutantes condicionales adultos tratados con risperidona, los cuales no exhibieron la hiperlocomoción que fue caracterizada previamente en este trabajo en los animales carentes del DRD2 en las IPV (ver **Parte II, figura 9 D, E y F**). Además, se midió el peso de los animales y no se presentaron diferencias entre genotipos, exhibiendo un crecimiento normal tanto en el grupo salina como en el grupo risperidona. Observamos que los animales mutantes condicionales adultos tratados con solución salina no exhibieron la hiperlocomoción caracterizada previamente. Este fue un resultado inesperado y podría ser debido al efecto del estrés que sufrieron los animales durante los 15 días del tratamiento. Dicho tratamiento, podría haber resultado en

adaptaciones que llevaron a que el animal no presente hiperactividad en el estadio adulto, como fuera descrito previamente (**figura 31 B**).



**Figura 31:** Locomoción en campo abierto luego del tratamiento con risperidona. Los animales en P30 no exhibieron diferencias entre grupos y genotipos (A). Los animales mutantes condicionales adultos ( $P \geq 60$ ) no exhibieron la locomoción característica luego del tratamiento con risperidona 0,025mg/kg. ns=no significativo, Anova de una vía con test Bonferroni como *post hoc*. N=7-10 animales por genotipo.

Seguidamente, administramos anfetamina a los animales tratados con risperidona durante la adolescencia para evaluar si presentaban hipersensibilidad (ver Figura 23). En el grupo que fue tratado con solución salina, no se observaron diferencias significativas al tratarlos con anfetamina, es decir, que los mutantes condicionales no fueron hipersensibles a la droga. Por otro lado, en el grupo tratado con risperidona, los animales mutantes condicionales presentaron una locomoción significativamente menor respecto de la de los animales control (**figura 32**). Este efecto fue inesperado y requerirá de una mayor cantidad de experimentos para entender los mecanismos que llevan a este fenómeno.



**Figura 32. Locomoción en campo abierto tras el desafío con anfetamina, posterior al tratamiento crónico con risperidona.** Los animales sin tratamiento (salina) no exhibieron diferencias en la locomoción total tras la dosis simple de anfetamina 5mg/kg. Los animales mutantes condicionales tratados de manera crónica con risperidona 0,025mg/kg exhibieron una locomoción significativamente menor que los controles, luego de la administración de anfetamina, no exhibiendo la hipersensibilidad previamente observada. \* $P \leq 0.05$ , Anova de una vía con el test Bonferroni como *post hoc*. N= 7-8 animales por grupo y genotipo.

Los resultados obtenidos en esta sección demuestran que para el aripiprazol, la expresión del DRD2 específicamente en las IPV resulta crucial para su efectividad. Por otro lado, el tratamiento crónico con risperidona en el período peripubertal provocó la pérdida de la hipersensibilidad a la anfetamina previamente observada. Por ello, será necesario ahondar en más experimentos para acercarnos a algún tipo de intervención que permita paliar los síntomas en la etapa adulta.

## **DISCUSIÓN**

## **Discusión**

La esquizofrenia, al día de hoy, continúa siendo una enfermedad devastadora de origen desconocido, con un impacto social y económico muy importante. Hasta el momento, el diagnóstico se basa principalmente en la aparición de síntomas positivos como alucinaciones y delirios. Para su tratamiento, se utilizan los antipsicóticos, que generalmente son antagonistas del receptor de dopamina D2. Lamentablemente no existen marcadores biológicos certeros que permitan predecir esta enfermedad de forma de comenzar con algún tipo de tratamiento en forma temprana.

Para poder entender cuál es el origen de esta enfermedad, se han desarrollado distintos modelos animales los cuales han sido clasificados como farmacológicos, genéticos o por lesiones. Un modelo clásico farmacológico es la administración crónica de anfetamina, simulando los aspectos psicóticos de la enfermedad (R. Chen et al. 2007a). Dentro de los modelos de lesiones, podemos citar al que resulta de la administración en periodos embrionarios del agente metilante acetato de metilazoximetanol, que presentó una pérdida en el número de IPV y fenotipos reminiscentes a la esquizofrenia en la adultez (Du and Grace 2016). También existe otro modelo muy afianzado por el que se producen lesiones en el hipocampo ventral en ratones neonatos por medio del ácido iboténico, resultando en fenotipos característicos solo en la adultez (Kuei Y Tseng, Chambers, and Lipska 2009). Con el advenimiento de las manipulaciones genéticas, fue posible eliminar genes de forma muy precisa. Por medio de dicha aproximación experimental se logró la delección selectiva de la subunidad NR1 del NMDAR de un 40-50% de las interneuronas del hipocampo, en un estadio temprano del desarrollo, que presentó fenotipos similares a los

observados en la esquizofrenia en edad adulta con interneuronas de PV principalmente afectadas (Belforte et al. 2010). Posteriormente, la eliminación selectiva de la subunidad NR1 de las interneuronas de PV mostraron alteraciones en las oscilaciones gamma y el comportamiento de ratones (Carlén et al. 2012), así como también la delección selectiva del receptor ErbB4 generó características reminiscentes a la fisiopatología de la esquizofrenia (del Pino et al. 2013). Cada uno de estos trabajos sustenta diferentes aspectos de las hipótesis acerca del origen de esta enfermedad, pero el análisis de estos y otros trabajos no mencionados en esta tesis nos permiten concluir que existen aspectos en común que son recurrentes para comenzar a entender esta enfermedad y que hacen posible que nos centremos en: las interneuronas de parvalbúmina, el receptor dopaminérgico D2, el receptor de NMDA, el hipocampo ventral, la corteza prefrontal y el cuerpo estriado, todo surcado por el sistema dopaminérgico.

En este trabajo se generó una línea mutante condicional de ratón que presenta la delección selectiva del receptor de dopamina D2 en las interneuronas de parvalbúmina. El DRD2 resulta el blanco principal de los antipsicóticos, y las interneuronas de PV son las neuronas GABAérgicas que se encuentran mayormente afectadas en pacientes con esquizofrenia.

Los primeros síntomas visibles de la enfermedad se presentan en la adolescencia tardía o adultez temprana. Se comenzó con el análisis comportamental en el modelo animal a estudiar con animales jóvenes de día post natal 30 (P30) y adultos de P60. Los animales jóvenes controles y mutantes condicionales no exhibieron ningún tipo de déficit de comportamiento. Por el contrario, los animales adultos mutantes condicionales exhibieron una actividad locomotora incrementada, una reducción en los niveles de ansiedad, un

incremento en la predisposición al riesgo, déficits de tipo cognitivos, vulnerabilidad al estrés y motivación reducida; siendo en conjunto conductas reminiscentes a la esquizofrenia. La hiperlocomoción suele asociarse con los síntomas psicóticos, las deficiencias en el laberinto en cruz elevado y en el estudio de reconocimiento del objeto novedoso, con déficits cognitivos y los problemas en el anidamiento, con los negativos. Todos ellos se ven atravesados por la vulnerabilidad al stress. Por lo tanto, esta línea mutante reproduce observaciones que pueden emparentarse a aquellas que son comúnmente descritas en pacientes. Además, la aparición de dichos fenotipos solo en etapas adultas refuerza el paralelismo con lo que ocurre en humanos y constituiría una característica distintiva y novedosa de este animal mutante condicional en comparación con otros modelos animales utilizados para estudiar la esquizofrenia.

Está ampliamente aceptado que la corteza prefrontal constituye el centro fundamental de los procesos cognitivos. Estudios post mortem de cerebros humanos de pacientes con esquizofrenia han demostrado una expresión reducida de marcadores GABAérgicos como GAD67 y PV, así como un número reducido de conexiones sinápticas (Le Magueresse and Monyer 2013). En este trabajo se llevó a cabo un estudio exhaustivo de la corteza prefrontal para determinar las alteraciones producidas por la eliminación selectiva del DRD2 de las interneuronas de PV. Mediante el estudio de los niveles de ARNm de varios marcadores moleculares relevantes para la enfermedad se encontró una drástica reducción en los niveles de GAD67, PV, DRD1, DRD2 y NR2B en los mutantes condicionales respecto de los controles. Se observaron reducidos los niveles de la proteína Gsk3 $\beta$ , implicada en la cascada de señalización del DRD2 y como fue reportado en humanos, una reducción en la densidad

de espinas dendríticas, un excesivo acople entre las frecuencias alfa y gamma, indicando una actividad oscilatoria alterada. Todos estos resultados son compatibles con los reportados a partir de estudios realizados en pacientes que padecen esquizofrenia, es decir, que la eliminación selectiva del DRD2, además de reproducir temporalmente la aparición de fenotipos conductuales, reproduce observaciones celulares, moleculares y fisiológicas de la enfermedad en la corteza prefrontal.

El desbalance en la neurotransmisión dopaminérgica entre la corteza prefrontal y el estriado es el sustento de la versión más actual de la hipótesis dopaminérgica, el cual constituye un hallazgo recurrente en pacientes. En este trabajo estudiamos los niveles del neurotransmisor dopamina y sus metabolitos, y determinamos que existe una reducción significativa en la corteza prefrontal de los mutantes condicionales con un concomitante aumento del metabolito DOPAC en el estriado, lo que indicaría un incremento en la neurotransmisión en dicha región. Por lo tanto, esta delección selectiva del DRD2 reproduce también dicho desbalance, reforzando la potencialidad de la línea mutante como un modelo de la enfermedad.

La administración crónica de amfetamina en roedores genera una respuesta hiperlocomotora, generalmente asociada a los aspectos psicóticos de la enfermedad (Angrist et al. 1974; R. Chen et al. 2007a; Janowsky et al. 1973). En este trabajo se trataron a los animales con una dosis única de amfetamina, resultando en un fenotipo hiperlocomotor exacerbado en los mutantes condicionales en relación a los controles. Estos resultados indican que para que se haya dado esa hipersensibilidad debe haberse desarrollado un mecanismo endógeno de sensibilización previo a la administración de la

droga, a lo largo de la transición entre adolescencia y la adultez, que desencadena dicha hipersensibilidad. Este mecanismo debería involucrar a una desregulación e hiperactividad del sistema dopaminérgico.

Ha sido previamente demostrado que el agonismo sobre el receptor D2 produce una activación de las interneuronas de PV, solo en animales adultos. Dicha activación produce un aumento en la actividad inhibitoria que redundaría en una disminución de la excitación de las neuronas piramidales (Kuei Y Tseng and O'Donnell 2007). Por medio de una aproximación electrofisiológica, determinamos que los animales mutantes condicionales presentan una actividad inhibitoria de las IPV del hipocampo ventral significativamente reducida. Asimismo, se encontró que el balance E/I se encuentra incrementado en el vHip de los mutantes condicionales, dado por la mencionada disminución de la inhibición. Estos resultados sugieren que ante una activación de las IPV vía DRD2, la respuesta normal resultaría en la inhibición de las NPi del vHip. En contraste, en los mutantes condicionales esta inhibición está alterada y las NPi podrían encontrarse hiperactivas, lo que podría provocar un incremento en la liberación de dopamina de las neuronas del mesencéfalo en los ratones mutantes. En dicho contexto, la reducción en la expresión del mensajero de GAD67 y PV es concordante con una inhibición atenuada, ya que la expresión de dichos genes depende de la actividad neuronal.

Se ha demostrado previamente que lesiones neonatales en el hipocampo ventral resultan en la expresión de fenotipos reminiscentes a la esquizofrenia en animales adultos y estas alteraciones afectaron principalmente a la población de interneuronas de PV (Du and Grace 2016). También se ha sido ampliamente reportado que las alteraciones en las interneuronas

de PV son centrales en la etiología de la esquizofrenia. Modelos genéticos con deleciones específicas de receptores de las IPV han exhibido características reminiscentes a la patofisiología de la enfermedad (del Pino et al. 2013). Los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis refuerzan esta idea y demuestran que la señalización alterada del DRD2 en las IPV conlleva a fenotipos reminiscentes a la esquizofrenia.

Una neurotransmisión dopaminérgica a niveles fisiológicos en el vHip promovería la actividad inhibitoria de las IPV sobre las NPi. A su vez, una actividad reducida de las NPi podría subsecuentemente limitar el número de neuronas dopaminérgicas reclutadas para disparar y liberar dopamina de la VTA. Debido a que la deleción selectiva del DRD2 de las IPV ocasionó una actividad inhibitoria reducida, como consecuencia, las neuronas piramidales estarían liberadas de la inhibición ejercida por las IPV, incrementando en general su actividad y por lo tanto generando un incremento en el reclutamiento de neuronas dopaminérgicas que se encuentran disparando de manera tónica en la VTA, resultando así en un incremento de la liberación fásica de dopamina por estímulos del entorno. La adolescencia constituye un periodo vulnerable para el desarrollo de numerosas enfermedades psiquiátricas. Las interrupciones que se generen en el mecanismo inhibitorio durante este período podrían llevar a un sistema dopaminérgico hiperactivo que presenta una respuesta dopaminérgica exacerbada como respuesta a los estímulos, teniendo un impacto de magnitud en regiones que presentan elevada inervación dopaminérgica, como la CPF y el estriado. Por ello, creemos que se hay evidencias que indican que en el mutante condicional para el DRD2 existen mecanismos que llevan a una hiperactividad del sistema dopaminérgico a lo largo de la etapa final del desarrollo cerebral. Dicha hiperactividad

produciría los fenotipos observados como consecuencia de compensaciones genéticas tendientes a mitigar dicha hiperactividad. La reducción de la expresión de mensajeros de receptores de dopamina (DRD1 y DRD2) podría ser una muestra del elevado tono dopaminérgico. Una vez alcanzada la adultez, esos mecanismos ya han sido afianzados y el circuito neuronal se estabiliza de manera patológica.

Los antipsicóticos constituyen el tratamiento por excelencia prescrito para los pacientes con esquizofrenia, más allá de que su mecanismo de acción preciso no es completamente comprendido aún. En general, los antipsicóticos exhiben antagonismo sobre los receptores de dopamina D2, quienes acotarían el exceso dopaminérgico, revirtiendo de manera exitosa los síntomas positivos de la enfermedad. El aripiprazol constituye una excepción dentro de la farmacología de los antipsicóticos, ya que es un agonista parcial del DRD2. Por ello, resulta paradójico cómo un agonista del receptor DRD2 puede mejorar la sintomatología de pacientes cuando ellos presentan un exceso dopaminérgico. Los experimentos de farmacología realizados en el presente trabajo demostraron que la acción de la risperidona no requiere la expresión del DRD2 en las IPV. En contraposición, el aripiprazol demostró que para su efectividad es necesaria la presencia y la funcionalidad del DRD2 en este tipo de interneurona GABAérgica, para así poder recuperar el fenotipo hiperlocomotor. De esta manera, se puede inferir que promoviendo la actividad inhibitoria de las IPV a través del agonismo vía DRD2 como con el aripiprazol, se podría reducir la actividad excesiva de las NPi, llevando a la población de neuronas dopaminérgicas de la VTA con patrones de disparo a niveles fisiológicos. De los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral, resulta posible hipotetizar que el tratamiento crónico con un antipsicótico con un perfil antagonista

clásico del DRD2, como la risperidona, podría efectivamente bloquear el exceso de dopamina liberada para aliviar los síntomas psicóticos, pero al mismo tiempo limitaría la actividad inhibitoria de las IPV en el hipocampo, promoviendo la activación de las NPi y reforzando así una liberación anormal de dopamina por parte de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, perpetuando un sistema dopaminérgico desregulado. En contraste, la modulación de la excitación de las NPi en niveles fisiológicos, a través de un fármaco que genere la activación específica de las IPV en el vHip podría ser el blanco para tratar la enfermedad, de forma de limitar la actividad de la población de neuronas dopaminérgicas en el mesencéfalo y, por lo tanto, la liberación de dopamina.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis, creemos que la delección del receptor de dopamina D2 selectivamente de las interneuronas de parvalbúmina podría constituirse como un modelo murino de la esquizofrenia. El mismo presenta la aparición de fenotipos conductuales reminiscentes a dicha enfermedad a partir de la adultez, desinhibición hipocampal, desbalance dopaminérgico, hipersensibilidad a la amfetamina, reducción de marcadores inhibitorios, reducción de los niveles de Gsk3 $\beta$ , entre otros. Por ello, nos propusimos evaluar si la inhibición del tono dopaminérgico en una etapa vulnerable del desarrollo, como lo es la adolescencia, podría incidir en los fenotipos observados en la adultez. El tratamiento crónico con el antagonista clásico del DRD2, la risperidona, durante 15 días de la etapa adolescente, resulto en una pérdida del fenotipo hiperlocomotor observado previamente. Sin embargo, el grupo tratado con solución salina, en donde hubiera sido esperable observar una hiperactividad locomotora, tampoco desarrollo hiperlocomoción. Este fue un resultado inesperado, pero podría ser atribuido a

una adaptación al stress crónico que sufrió el animal durante el tratamiento en la etapa adolescente. Posteriormente, decidimos evaluar si los animales tratados aun presentaban hipersensibilidad a la administración de una dosis única de anfetamina. En el grupo tratado con solución salina, no se vieron diferencias significativas. En contraste, en los animales tratados con risperidona durante la adolescencia, la locomoción total desplegada por los mutantes condicionales fue significativamente menor a la de los controles. Por lo tanto, el tratamiento podría tener algún efecto para compensar uno de los fenotipos observados en dichos animales. Sin lugar a dudas, será necesario abordar una mayor cantidad de experimentos sobre esta línea murina para evaluar alternativas que nos acerquen a un posible tratamiento de forma de paliar esta enfermedad.

# CONCLUSIÓN

## **Conclusión**

La línea mutante condicional que presenta la delección selectiva del receptor de dopamina D2 recapitula aspectos de la hipótesis dopaminérgica, GABAérgica y glutamatérgica de la esquizofrenia.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que la alteración en la señalización del receptor de dopamina D2 de las interneuronas de parvalbúmina genera una desregulación del sistema dopaminérgico, ocasionando así fenotipos reminiscentes a la esquizofrenia, con un inicio de los síntomas desde la adultez, siguiendo el mismo patrón de expresión que en pacientes con esta enfermedad.

Esta línea mutante condicional podría ser utilizada como un nuevo modelo animal para estudiar la esquizofrenia, resultando en una herramienta muy útil para indagar sobre aspectos desconocidos de la desregulación del sistema dopaminérgico en relación a esta y otras enfermedades psiquiátricas. Resulta necesario profundizar la investigación en la señalización río abajo del receptor de dopamina D2 en este tipo particular de interneuronas, con el objetivo de identificar nuevos blancos moleculares para tratar de modular la actividad inhibitoria de las mismas.

## **REFERENCIAS**

## Referencias

- Anden, N E et al. 1964. "DEMONSTRATION AND MAPPING OUT OF NIGRO-NEOSTRIATAL DOPAMINE NEURONS." *Life sciences (1962)* 3: 523–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14187491> (September 27, 2017).
- Anderson, S A, D D Eisenstat, L Shi, and J L Rubenstein. 1997. "Interneuron Migration from Basal Forebrain to Neocortex: Dependence on Dlx Genes." *Science (New York, N.Y.)* 278(5337): 474–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9334308> (October 7, 2017).
- Angrist, B, G Sathananthan, S Wilk, and S Gershon. 1974. "Amphetamine Psychosis: Behavioral and Biochemical Aspects." *Journal of psychiatric research* 11: 13–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4461784> (October 8, 2017).
- Antunes, M, and G Biala. 2012. "The Novel Object Recognition Memory: Neurobiology, Test Procedure, and Its Modifications." *Cognitive processing* 13(2): 93–110. <http://link.springer.com/10.1007/s10339-011-0430-z> (October 11, 2017).
- Asada, H et al. 1996. "Mice Lacking the 65 kDa Isoform of Glutamic Acid Decarboxylase (GAD65) Maintain Normal Levels of GAD67 and GABA in Their Brains but Are Susceptible to Seizures." *Biochemical and biophysical research communications* 229(3): 891–95. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8954991> (October 7, 2017).
- . 1997. "Cleft Palate and Decreased Brain Gamma-Aminobutyric Acid in Mice Lacking the 67-kDa Isoform of Glutamic Acid Decarboxylase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(12): 6496–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177246> (October 7, 2017).
- Baker, S C et al. 1996. "Neural Systems Engaged by Planning: A PET Study of the Tower of London Task." *Neuropsychologia* 34(6): 515–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8736565> (September 27, 2017).
- Basar-Eroglu, Canan et al. 2007. "Working Memory Related Gamma Oscillations in Schizophrenia Patients." *International Journal of Psychophysiology* 64(1): 39–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16962192> (October 7, 2017).
- Baumeister, Alan A, and Jennifer L Francis. 2002. "Historical Development of the Dopamine Hypothesis of Schizophrenia." *Journal of the history of the neurosciences* 11(3): 265–77. <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1076/jhin.11.3.265.10391> (September 27, 2017).
- Beaulieu, Jean-Martin et al. 2004. "Lithium Antagonizes Dopamine-Dependent Behaviors Mediated by an AKT/glycogen Synthase Kinase 3 Signaling Cascade." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(14): 5099–5104. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0307921101> (October 3, 2017).
- Bédard, P, L Larochelle, A Parent, and L J Poirier. 1969. "The Nigrostriatal Pathway: A

- Correlative Study Based on Neuroanatomical and Neurochemical Criteria in the Cat and the Monkey." *Experimental neurology* 25(3): 365–77.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4981857> (September 27, 2017).
- Belforte, Juan E et al. 2010. "Postnatal NMDA Receptor Ablation in Corticolimbic Interneurons Confers Schizophrenia-like Phenotypes." *Nature Neuroscience* 13(1): 76–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915563> (September 27, 2017).
- Bello, Estefanía P et al. 2011. "Cocaine Supersensitivity and Enhanced Motivation for Reward in Mice Lacking Dopamine D2 Autoreceptors." *Nature neuroscience* 14(8): 1033–38. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.2862> (September 28, 2017).
- Benes, F. M. et al. 2007. "Regulation of the GABA Cell Phenotype in Hippocampus of Schizophrenics and Bipolars." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(24): 10164–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17553960> (September 27, 2017).
- Benson, D L, D R Colman, and G W Huntley. 2001. "Molecules, Maps and Synapse Specificity." *Nature reviews. Neuroscience* 2(12): 899–909.  
<http://www.nature.com/doi/10.1038/35104078> (September 27, 2017).
- Berridge, M J, C P Downes, and M R Hanley. 1989. "Neural and Developmental Actions of Lithium: A Unifying Hypothesis." *Cell* 59(3): 411–19.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2553271> (October 3, 2017).
- Bissière, Stephanie, Yann Humeau, and Andreas Lüthi. 2003. "Dopamine Gates LTP Induction in Lateral Amygdala by Suppressing Feedforward Inhibition." *Nature Neuroscience* 6(6): 587–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12740581> (September 27, 2017).
- Bleuler, M. 1988. "[Origin and Significance of Eugen Bleuler's Work: 'Dementia Praecox or the Schizophrenia Group'; A Contribution to the History of Manfred Bleuler's Zurich Psychiatry]." *Schweizerische Rundschau für Medizin Praxis = Revue suisse de médecine Praxis* 77(48): 1322–26.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3064244> (September 27, 2017).
- Brinley-Reed, M, and A J McDonald. 1999. "Evidence That Dopaminergic Axons Provide a Dense Innervation of Specific Neuronal Subpopulations in the Rat Basolateral Amygdala." *Brain research* 850(1–2): 127–35.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10629756> (September 27, 2017).
- Caballero, Adriana, Eden Flores-Barrera, Daryn K Cass, and Kuei Y Tseng. 2014. "Differential Regulation of Parvalbumin and Calretinin Interneurons in the Prefrontal Cortex during Adolescence." *Brain structure & function* 219(1): 395–406.  
<http://link.springer.com/10.1007/s00429-013-0508-8> (September 27, 2017).
- Caballero, Adriana, and Kuei Y. Tseng. 2016. "GABAergic Function as a Limiting Factor for Prefrontal Maturation during Adolescence." *Trends in Neurosciences* 39(7): 441–48.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27233681> (October 3, 2017).
- Cade, J F J. 1949. "Lithium Salts in the Treatment of Psychotic Excitement." *The Medical journal of Australia* 2(10): 349–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18142718> (October 3, 2017).
- Canolty, Ryan T, and Robert T Knight. 2010. "The Functional Role of Cross-Frequency Coupling." *Trends in cognitive sciences* 14(11): 506–15. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364661310002068> (October 8, 2017).
- Carcea, Ioana, and Robert C. Froemke. 2013. "Cortical Plasticity, Excitatory–Inhibitory Balance, and Sensory Perception." In , 65–90. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444633279000035> (September 27, 2017).
- Cardin, Jessica A. et al. 2009. "Driving Fast-Spiking Cells Induces Gamma Rhythm and Controls Sensory Responses." *Nature* 459(7247): 663–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19396156> (September 27, 2017).
- Cardno, A G et al. 1999. "Dimensions of Psychosis in Affected Sibling Pairs." *Schizophrenia bulletin* 25(4): 841–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10667752> (September 27, 2017).
- Carlén, M et al. 2012. "A Critical Role for NMDA Receptors in Parvalbumin Interneurons for Gamma Rhythm Induction and Behavior." *Molecular psychiatry* 17(5): 537–48. <http://www.nature.com/doi/10.1038/mp.2011.31> (October 31, 2017).
- Carlsson, A, and M Lindqvist. 1963. "EFFECT OF CHLORPROMAZINE OR HALOPERIDOL ON FORMATION OF 3METHOXYTYRAMINE AND NORMETANEPHRINE IN MOUSE BRAIN." *Acta pharmacologica et toxicologica* 20: 140–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14060771> (October 7, 2017).
- Cass, D K et al. 2014. "CB1 Cannabinoid Receptor Stimulation during Adolescence Impairs the Maturation of GABA Function in the Adult Rat Prefrontal Cortex." *Molecular Psychiatry* 19(5): 536–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24589887> (September 27, 2017).
- Cass, Daryn K., Daniel R. Thomases, Adriana Caballero, and Kuei Y. Tseng. 2013. "Developmental Disruption of Gamma-Aminobutyric Acid Function in the Medial Prefrontal Cortex by Noncontingent Cocaine Exposure During Early Adolescence." *Biological Psychiatry* 74(7): 490–501. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23558299> (September 27, 2017).
- Chang, Chun-Hui, and Anthony A Grace. 2014. "Amygdala-Ventral Pallidum Pathway Decreases Dopamine Activity after Chronic Mild Stress in Rats." *Biological psychiatry* 76(3): 223–30. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006322313008615> (September 27, 2017).
- Chen, F.-J., and S.J. Sara. 2007. "Locus Coeruleus Activation by Foot Shock or Electrical

- Stimulation Inhibits Amygdala Neurons." *Neuroscience* 144(2): 472–81.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17097235> (September 27, 2017).
- Chen, Rong, Minjia Zhang, Soo Park, and Margaret E Gnegy. 2007a. "C57BL/6J Mice Show Greater Amphetamine-Induced Locomotor Activation and Dopamine Efflux in the Striatum than 129S2/SvHsd Mice." *Pharmacology, biochemistry, and behavior* 87(1): 158–63. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305707001347> (October 8, 2017).
- Chen, Rong, Minjia Zhang, Soo Park, and Margaret E. Gnegy. 2007b. "C57BL/6J Mice Show Greater Amphetamine-Induced Locomotor Activation and Dopamine Efflux in the Striatum than 129S2/SvHsd Mice." *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 87(1): 158–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17524461> (October 3, 2017).
- Chergui, K et al. 1993. "Tonic Activation of NMDA Receptors Causes Spontaneous Burst Discharge of Rat Midbrain Dopamine Neurons in Vivo." *The European journal of neuroscience* 5(2): 137–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8261095> (September 27, 2017).
- Ciceri, Gabriele et al. 2013. "Lineage-Specific Laminar Organization of Cortical GABAergic Interneurons." *Nature Neuroscience* 16(9): 1199–1210.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23933753> (September 27, 2017).
- Cochran, Susan M et al. 2003. "Induction of Metabolic Hypofunction and Neurochemical Deficits after Chronic Intermittent Exposure to Phencyclidine: Differential Modulation by Antipsychotic Drugs." *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 28(2): 265–75.  
<http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.npp.1300031> (September 27, 2017).
- Crone, Eveline A., and Ronald E. Dahl. 2012. "Understanding Adolescence as a Period of Social–affective Engagement and Goal Flexibility." *Nature Reviews Neuroscience* 13(9): 636–50. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22903221> (September 27, 2017).
- Csernansky, John G, Ramy Mahmoud, Ronald Brenner, and Risperidone-USA-79 Study Group. 2002. "A Comparison of Risperidone and Haloperidol for the Prevention of Relapse in Patients with Schizophrenia." *The New England journal of medicine* 346(1): 16–22. <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa002028> (October 3, 2017).
- Curley, Allison A., and David A. Lewis. 2012. "Cortical Basket Cell Dysfunction in Schizophrenia." *The Journal of Physiology* 590(4): 715–24.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22219337> (September 27, 2017).
- Davis, K L, R S Kahn, G Ko, and M Davidson. 1991. "Dopamine in Schizophrenia: A Review and Reconceptualization." *American Journal of Psychiatry* 148(11): 1474–86.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1681750> (October 7, 2017).
- del Pino, Isabel et al. 2013. "ErbB4 Deletion from Fast-Spiking Interneurons Causes

- Schizophrenia-like Phenotypes." *Neuron* 79(6): 1152–68.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24050403> (September 27, 2017).
- Delay, J, P Deniker, and J M Harl. 1952. "[Therapeutic Use in Psychiatry of Phenothiazine of Central Elective Action (4560 RP)]." *Annales medico-psychologiques* 110(2 1): 112–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12986408> (October 7, 2017).
- Dornn, Anja L et al. 2010. "Developmental Sensory Experience Balances Cortical Excitation and Inhibition." *Nature* 465(7300): 932–36.  
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09119> (September 27, 2017).
- Du, Yijuan, and Anthony A. Grace. 2016. "Loss of Parvalbumin in the Hippocampus of MAM Schizophrenia Model Rats Is Attenuated by Peripubertal Diazepam." *International Journal of Neuropsychopharmacology* 19(11): pyw065.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27432008> (September 27, 2017).
- Dymecki, Susan M., and Jun Chul Kim. 2007. "Molecular Neuroanatomy's 'Three Gs': A Primer." *Neuron* 54(1): 17–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17408575> (October 20, 2017).
- Egerton, Alice et al. 2013. "Presynaptic Striatal Dopamine Dysfunction in People at Ultra-High Risk for Psychosis: Findings in a Second Cohort." *Biological Psychiatry* 74(2): 106–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23312565> (September 27, 2017).
- Emamian, Effat S et al. 2004. "Convergent Evidence for Impaired AKT1-GSK3 $\beta$  Signaling in Schizophrenia." *Nature Genetics* 36(2): 131–37.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14745448> (October 12, 2017).
- Fallon, James H., and Robert Y. Moore. 1978a. "Catecholamine Innervation of the Basal Forebrain III. Olfactory Bulb, Anterior Olfactory Nuclei, Olfactory Tubercle and Piriform Cortex." *The Journal of Comparative Neurology* 180(3): 533–44.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/307009> (September 27, 2017).
- . 1978b. "Catecholamine Innervation of the Basal Forebrain IV. Topography of the Dopamine Projection to the Basal Forebrain and Neostriatum." *The Journal of Comparative Neurology* 180(3): 545–79.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/659674> (September 27, 2017).
- Filgueiras, Guilherme Bracarense, Eduardo F. Carvalho-Netto, and Celio Estanislau. 2014. "Aversion in the Elevated plus-Maze: Role of Visual and Tactile Cues." *Behavioural Processes* 107: 106–11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25151938> (October 11, 2017).
- Floresco, Stan B, and Anthony A Grace. 2003. "Gating of Hippocampal-Evoked Activity in Prefrontal Cortical Neurons by Inputs from the Mediodorsal Thalamus and Ventral Tegmental Area." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(9): 3930–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12736363> (September 27, 2017).

- Fond, G. et al. 2015. "The Promise of Biological Markers for Treatment Response in First-Episode Psychosis: A Systematic Review." *Schizophrenia Bulletin* 41(3): 559–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25759473> (September 27, 2017).
- Freund, Tamás F., and István Katona. 2007. "Perisomatic Inhibition." *Neuron* 56(1): 33–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17920013> (October 7, 2017).
- Fries, P et al. 2001. "Rapid Feature Selective Neuronal Synchronization through Correlated Latency Shifting." *Nature neuroscience* 4(2): 194–200. <http://www.nature.com/doi/10.1038/84032> (September 27, 2017).
- Fries, Pascal, Danko Nikolić, and Wolf Singer. 2007. "The Gamma Cycle." *Trends in Neurosciences* 30(7): 309–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17555828> (September 27, 2017).
- Funahashi, S. 2001. "Neuronal Mechanisms of Executive Control by the Prefrontal Cortex." *Neuroscience research* 39(2): 147–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11223461> (September 27, 2017).
- Funahashi, S, M Inoue, and K Kubota. 1993. "Delay-Related Activity in the Primate Prefrontal Cortex during Sequential Reaching Tasks with Delay." *Neuroscience research* 18(2): 171–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8127467> (September 27, 2017).
- Fuster, J M. 1997. "Network Memory." *Trends in neurosciences* 20(10): 451–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9347612> (September 27, 2017).
- Gainetdinov, R. R., A. R. Mohn, L. M. Bohn, and M. G. Caron. 2001. "Glutamatergic Modulation of Hyperactivity in Mice Lacking the Dopamine Transporter." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(20): 11047–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11572967> (September 27, 2017).
- Garner, Joseph P. 2005. "Stereotypies and Other Abnormal Repetitive Behaviors: Potential Impact on Validity, Reliability, and Replicability of Scientific Outcomes." *ILAR journal* 46(2): 106–17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15775020> (October 20, 2017).
- Gelman, D. et al. 2011. "A Wide Diversity of Cortical GABAergic Interneurons Derives from the Embryonic Preoptic Area." *Journal of Neuroscience* 31(46): 16570–80. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22090484> (October 7, 2017).
- Gelman, Diego M., and Oscar Marín. 2010. "Generation of Interneuron Diversity in the Mouse Cerebral Cortex." *European Journal of Neuroscience* 31(12): 2136–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20529125> (October 7, 2017).
- Glausier, J.R., and D.A. Lewis. 2013. "Dendritic Spine Pathology in Schizophrenia." *Neuroscience* 251: 90–107. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22546337> (October 8, 2017).
- Goldman-Rakic, P S. 1995. "Architecture of the Prefrontal Cortex and the Central

- Executive." *Annals of the New York Academy of Sciences* 769: 71–83.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8595045> (September 27, 2017).
- Gonzalez-Burgos, Guillermo, Takanori Hashimoto, and David A. Lewis. 2010. "Alterations of Cortical GABA Neurons and Network Oscillations in Schizophrenia." *Current Psychiatry Reports* 12(4): 335–44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20556669> (October 28, 2017).
- Gorenstein, E E, C A Mammato, and J M Sandy. 1989. "Performance of Inattentive-Overactive Children on Selected Measures of Prefrontal-Type Function." *Journal of clinical psychology* 45(4): 619–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2768502> (September 27, 2017).
- Goto, Y, S Otani, and A Grace. 2007. "The Yin and Yang of Dopamine Release: A New Perspective." *Neuropharmacology* 53(5): 583–87.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17709119> (October 7, 2017).
- Goto, Yukiori, and Anthony A Grace. 2005. "Dopaminergic Modulation of Limbic and Cortical Drive of Nucleus Accumbens in Goal-Directed Behavior." *Nature Neuroscience* 8(6): 805–12. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15908948> (September 27, 2017).
- Goto, Yukiori, and Anthony A. Grace. 2007. "The Dopamine System and the Pathophysiology of Schizophrenia: A Basic Science Perspective." In *International Review of Neurobiology*, , 41–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17349857> (September 27, 2017).
- Grace, A A, and B S Bunney. 1983a. "Intracellular and Extracellular Electrophysiology of Nigral Dopaminergic Neurons--1. Identification and Characterization." *Neuroscience* 10(2): 301–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6633863> (September 27, 2017).
- . 1983b. "Intracellular and Extracellular Electrophysiology of Nigral Dopaminergic Neurons--2. Action Potential Generating Mechanisms and Morphological Correlates." *Neuroscience* 10(2): 317–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6633864> (September 27, 2017).
- . 1984a. "The Control of Firing Pattern in Nigral Dopamine Neurons: Burst Firing." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 4(11): 2877–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6150071> (September 27, 2017).
- . 1984b. "The Control of Firing Pattern in Nigral Dopamine Neurons: Single Spike Firing." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 4(11): 2866–76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6150070> (September 27, 2017).
- Grace, Anthony A. 2012. "Dopamine System Dysregulation by the Hippocampus: Implications for the Pathophysiology and Treatment of Schizophrenia."

- Neuropharmacology* 62(3): 1342–48.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21621548> (September 27, 2017).
- . 2016. “Dysregulation of the Dopamine System in the Pathophysiology of Schizophrenia and Depression.” *Nature Reviews Neuroscience* 17(8): 524–32.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27256556> (September 27, 2017).
- Green, Michael F. 2006. “Cognitive Impairment and Functional Outcome in Schizophrenia and Bipolar Disorder.” *The Journal of clinical psychiatry* 67(10): e12.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17107235> (September 27, 2017).
- Grunze, H C et al. 1996. “NMDA-Dependent Modulation of CA1 Local Circuit Inhibition.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16(6): 2034–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8604048> (September 27, 2017).
- Hashimoto, Takanori et al. 2003. “Gene Expression Deficits in a Subclass of GABA Neurons in the Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23(15): 6315–26.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12867516> (September 27, 2017).
- Heck, A H, P M Haffmans, I W de Groot, and E Hoencamp. 2000. “Risperidone versus Haloperidol in Psychotic Patients with Disturbing Neuroleptic-Induced Extrapyrimal Symptoms: A Double-Blind, Multi-Center Trial.” *Schizophrenia research* 46(2–3): 97–105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11120421> (October 3, 2017).
- Heckers, Stephan. 2001. “Neuroimaging Studies of the Hippocampus in Schizophrenia.” *Hippocampus* 11(5): 520–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11732705> (September 27, 2017).
- Hensch, Takao K, and Michael P Stryker. 2004. “Columnar Architecture Sculpted by GABA Circuits in Developing Cat Visual Cortex.” *Science (New York, N.Y.)* 303(5664): 1678–81. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1091031> (September 27, 2017).
- Herman, J, and N Mueller. 2006. “Role of the Ventral Subiculum in Stress Integration.” *Behavioural Brain Research* 174(2): 215–24.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16876265> (September 27, 2017).
- Hippenmeyer, Simon et al. 2005. “A Developmental Switch in the Response of DRG Neurons to ETS Transcription Factor Signaling.” ed. Joshua R. Sanes. *PLoS biology* 3(5): e159. <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.0030159> (September 28, 2017).
- Hoftman, Gil D, and David A Lewis. 2011. “Postnatal Developmental Trajectories of Neural Circuits in the Primate Prefrontal Cortex: Identifying Sensitive Periods for Vulnerability to Schizophrenia.” *Schizophrenia bulletin* 37(3): 493–503.  
<https://academic.oup.com/schizophreniabulletin/article-lookup/doi/10.1093/schbul/sbr029> (September 27, 2017).
- Hong, S., and O. Hikosaka. 2014. “Pedunculopontine Tegmental Nucleus Neurons Provide

- Reward, Sensorimotor, and Alerting Signals to Midbrain Dopamine Neurons.” *Neuroscience* 282: 139–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25058502> (October 20, 2017).
- Hornykiewicz, O. 1971. “Neurochemical Pathology and Pharmacology of Brain Dopamine and Acetylcholine: Rational Basis for the Current Drug Treatment of Parkinsonism.” *Contemporary neurology series* 8: 33–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5162181> (September 27, 2017).
- Howes, Oliver D et al. 2009. “Elevated Striatal Dopamine Function Linked to Prodromal Signs of Schizophrenia.” *Archives of general psychiatry* 66(1): 13–20. <http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archgenpsychiatry.2008.514> (October 7, 2017).
- Ingvar, D H. 1985. “&quot;Memory of the Future&quot;; An Essay on the Temporal Organization of Conscious Awareness.” *Human neurobiology* 4(3): 127–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3905726> (September 27, 2017).
- Insel, Thomas R. 2010. “Rethinking Schizophrenia.” *Nature* 468(7321): 187–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21068826> (September 27, 2017).
- Jaber, M, S W Robinson, C Missale, and M G Caron. 1996. “Dopamine Receptors and Brain Function.” *Neuropharmacology* 35(11): 1503–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9025098> (October 7, 2017).
- Jackson-Lewis, V et al. 2000. “Developmental Cell Death in Dopaminergic Neurons of the Substantia Nigra of Mice.” *The Journal of comparative neurology* 424(3): 476–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10906714> (September 27, 2017).
- Jackson, D M, and A Westlind-Danielsson. 1994. “Dopamine Receptors: Molecular Biology, Biochemistry and Behavioural Aspects.” *Pharmacology & therapeutics* 64(2): 291–370. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7878079> (September 27, 2017).
- Jackson, M. E., H. Homayoun, and B. Moghaddam. 2004. “NMDA Receptor Hypofunction Produces Concomitant Firing Rate Potentiation and Burst Activity Reduction in the Prefrontal Cortex.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(22): 8467–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15159546> (September 27, 2017).
- Jackson, M E, A S Frost, and B Moghaddam. 2001. “Stimulation of Prefrontal Cortex at Physiologically Relevant Frequencies Inhibits Dopamine Release in the Nucleus Accumbens.” *Journal of neurochemistry* 78(4): 920–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520912> (September 27, 2017).
- Janowsky, D S, M K el-Yousel, J M Davis, and H J Sekerke. 1973. “Provocation of Schizophrenic Symptoms by Intravenous Administration of Methylphenidate.” *Archives of general psychiatry* 28(2): 185–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4630714> (October 8, 2017).
- Jellestad, F K, and I Garcia Cabrera. 1986. “Exploration and Avoidance Learning after

- Ibotenic Acid and Radio Frequency Lesions in the Rat Amygdala." *Behavioral and neural biology* 46(2): 196–215. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3767832> (September 27, 2017).
- Jensen, Ole, and Laura L. Colgin. 2007. "Cross-Frequency Coupling between Neuronal Oscillations." *Trends in Cognitive Sciences* 11(7): 267–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17548233> (October 8, 2017).
- Jia, Jie-Min et al. 2013. "Age-Dependent Regulation of Synaptic Connections by Dopamine D2 Receptors." *Nature Neuroscience* 16(11): 1627–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24121738> (October 3, 2017).
- Jones, C A, D J G Watson, and K C F Fone. 2011. "Animal Models of Schizophrenia." *British journal of pharmacology* 164(4): 1162–94. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x> (October 13, 2017).
- Kane, J M. 1996. "Treatment-Resistant Schizophrenic Patients." *The Journal of clinical psychiatry* 57 Suppl 9: 35–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8823348> (October 3, 2017).
- Kapur, Shitij, and David Mamo. 2003. "Half a Century of Antipsychotics and Still a Central Role for Dopamine D2 Receptors." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 27(7): 1081–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14642968> (September 27, 2017).
- Keefe, Richard S E. 2007. "Cognitive Deficits in Patients with Schizophrenia: Effects and Treatment." *The Journal of clinical psychiatry* 68 Suppl 14: 8–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18284272> (September 27, 2017).
- Kelsom, Corey, and Wange Lu. 2013. "Development and Specification of GABAergic Cortical Interneurons." *Cell & Bioscience* 3(1): 19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23618463> (September 27, 2017).
- Kim, Eun Joo, Blake Pellman, and Jeansok J Kim. 2015. "Stress Effects on the Hippocampus: A Critical Review." *Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)* 22(9): 411–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26286651> (October 11, 2017).
- Klausberger, T., and P. Somogyi. 2008. "Neuronal Diversity and Temporal Dynamics: The Unity of Hippocampal Circuit Operations." *Science* 321(5885): 53–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599766> (September 27, 2017).
- Klein, P S, and D A Melton. 1996. "A Molecular Mechanism for the Effect of Lithium on Development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(16): 8455–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8710892> (October 3, 2017).
- Knight, R T, M F Grabowecky, and D Scabini. 1995. "Role of Human Prefrontal Cortex in Attention Control." *Advances in neurology* 66: 21-34-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7771302> (September 27, 2017).

- Konopaske, Glenn T., Nicholas Lange, Joseph T. Coyle, and Francine M. Benes. 2014. "Prefrontal Cortical Dendritic Spine Pathology in Schizophrenia and Bipolar Disorder." *JAMA Psychiatry* 71(12): 1323. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271938> (October 8, 2017).
- Kozlovsky, N, R H Belmaker, and G Agam. 2000. "Low GSK-3beta Immunoreactivity in Postmortem Frontal Cortex of Schizophrenic Patients." *The American journal of psychiatry* 157(5): 831–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10784483> (October 12, 2017).
- Labrie, Viviane, Tatiana Lipina, and John C Roder. 2008. "Mice with Reduced NMDA Receptor Glycine Affinity Model Some of the Negative and Cognitive Symptoms of Schizophrenia." *Psychopharmacology* 200(2): 217–30. <http://link.springer.com/10.1007/s00213-008-1196-6> (September 27, 2017).
- Lammel, Stephan et al. 2008. "Unique Properties of Mesoprefrontal Neurons within a Dual Mesocorticolimbic Dopamine System." *Neuron* 57(5): 760–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18341995> (September 27, 2017).
- Lauder, J M, and F E Bloom. 1974. "Ontogeny of Monoamine Neurons in the Locus Coeruleus, Raphe Nuclei and Substantia Nigra of the Rat. I. Cell Differentiation." *The Journal of comparative neurology* 155(4): 469–81. <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.901550407> (September 27, 2017).
- Laurence, A. et al. 2015. "Environmental Enrichment Reduces Behavioural Alterations Induced by Chronic Stress in Japanese Quail." *animal* 9(2): 331–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25354525> (October 20, 2017).
- Laurent B.NicolasYeterKolbEric P.M.Prinssen. 2006. "A Combined Marble Burying–locomotor Activity Test in Mice: A Practical Screening Test with Sensitivity to Different Classes of Anxiolytics and Antidepressants." *European Journal of Pharmacology* 547(1–3): 106–15. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299906007655> (October 11, 2017).
- Le Magueresse, Corentin, and Hannah Monyer. 2013. "GABAergic Interneurons Shape the Functional Maturation of the Cortex." *Neuron* 77(3): 388–405. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089662731300055X> (September 27, 2017).
- Leucht, Stefan et al. 2013. "Efficacy of Antipsychotic Drugs for Schizophrenia – Authors' Reply." *The Lancet* 382(9908): 1874–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24315170> (September 27, 2017).
- Levant, B, D E Grigoriadis, and E B DeSouza. 1992. "Characterization of [3H]quinpirole Binding to D2-like Dopamine Receptors in Rat Brain." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 262(3): 929–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1356154> (October 7, 2017).

- Lewis, David A. 2012. "Cortical Circuit Dysfunction and Cognitive Deficits in Schizophrenia-- Implications for Preemptive Interventions." *The European journal of neuroscience* 35(12): 1871–78. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2012.08156.x> (September 27, 2017).
- Lewis, David A., Takanori Hashimoto, and David W. Volk. 2005. "Cortical Inhibitory Neurons and Schizophrenia." *Nature Reviews Neuroscience* 6(4): 312–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15803162> (September 27, 2017).
- Li, Shaomin, William K. Cullen, Roger Anwyl, and Michael J. Rowan. 2003. "Dopamine-Dependent Facilitation of LTP Induction in Hippocampal CA1 by Exposure to Spatial Novelty." *Nature Neuroscience* 6(5): 526–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12704392> (September 27, 2017).
- Lichenstein, Sarah D., Timothy Verstynen, and Erika E. Forbes. 2016. "Adolescent Brain Development and Depression: A Case for the Importance of Connectivity of the Anterior Cingulate Cortex." *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 70: 271–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27461914> (September 27, 2017).
- Liddle, P, W T Carpenter, and T Crow. 1994. "Syndromes of Schizophrenia. Classic Literature." *The British journal of psychiatry : the journal of mental science* 165(6): 721–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7881773> (September 27, 2017).
- Lieberman, J A, J M Kane, and J Alvir. 1987. "Provocative Tests with Psychostimulant Drugs in Schizophrenia." *Psychopharmacology* 91(4): 415–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2884687> (October 7, 2017).
- Lindenmayer, Jean-Pierre et al. 2013. "A Systematic Review of Psychostimulant Treatment of Negative Symptoms of Schizophrenia: Challenges and Therapeutic Opportunities." *Schizophrenia Research* 147(2–3): 241–52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23619055> (September 28, 2017).
- Lisman, John E., and Anthony A. Grace. 2005. "The Hippocampal-VTA Loop: Controlling the Entry of Information into Long-Term Memory." *Neuron* 46(5): 703–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15924857> (September 27, 2017).
- Lloyd, K, and O Hornykiewicz. 1970. "Parkinson's Disease: Activity of L-Dopa Decarboxylase in Discrete Brain Regions." *Science (New York, N. Y.)* 170(3963): 1212–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5478194> (September 27, 2017).
- Lodge, D. J., and A. A. Grace. 2006. "The Laterodorsal Tegmentum Is Essential for Burst Firing of Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(13): 5167–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16549786> (September 27, 2017).
- . 2007. "Aberrant Hippocampal Activity Underlies the Dopamine Dysregulation in an Animal Model of Schizophrenia." *Journal of Neuroscience* 27(42): 11424–30. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17942737> (September 27, 2017).

- Lodge, Daniel J, Margarita M Behrens, and Anthony A Grace. 2009. "A Loss of Parvalbumin-Containing Interneurons Is Associated with Diminished Oscillatory Activity in an Animal Model of Schizophrenia." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29(8): 2344–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19244511> (October 7, 2017).
- Lourenco, Frederico, and B J Casey. 2013. "Adjusting Behavior to Changing Environmental Demands with Development." *Neuroscience and biobehavioral reviews* 37(9 Pt B): 2233–42. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0149763413000638> (September 27, 2017).
- Le Magueresse, Corentin, and Hannah Monyer. 2013. "GABAergic Interneurons Shape the Functional Maturation of the Cortex." *Neuron* 77(3): 388–405. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089662731300055X> (September 27, 2017).
- Marín, Oscar, and Ulrich Müller. 2014. "Lineage Origins of GABAergic versus Glutamatergic Neurons in the Neocortex." *Current opinion in neurobiology* 26: 132–41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24549207> (October 7, 2017).
- Markram, Henry et al. 2004. "Interneurons of the Neocortical Inhibitory System." *Nature Reviews Neuroscience* 5(10): 793–807. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15378039> (October 7, 2017).
- Menegas, William et al. 2015a. "Dopamine Neurons Projecting to the Posterior Striatum Form an Anatomically Distinct Subclass." *eLife* 4. <http://elifesciences.org/lookup/doi/10.7554/eLife.10032> (September 27, 2017).
- . 2015b. "Dopamine Neurons Projecting to the Posterior Striatum Form an Anatomically Distinct Subclass." *eLife* 4: e10032. <http://elifesciences.org/lookup/doi/10.7554/eLife.10032> (September 27, 2017).
- Meyer-Lindenberg, Andreas et al. 2002. "Reduced Prefrontal Activity Predicts Exaggerated Striatal Dopaminergic Function in Schizophrenia." *Nature neuroscience* 5(3): 267–71. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn804> (September 27, 2017).
- Meyer-Lindenberg, Andreas S. et al. 2005. "Regionally Specific Disturbance of Dorsolateral Prefrontal–Hippocampal Functional Connectivity in Schizophrenia." *Archives of General Psychiatry* 62(4): 379. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809405> (September 27, 2017).
- Miller, Del D, James M Eudicone, Andrei Pikalov, and Edward Kim. 2007. "Comparative Assessment of the Incidence and Severity of Tardive Dyskinesia in Patients Receiving Aripiprazole or Haloperidol for the Treatment of Schizophrenia: A Post Hoc Analysis." *The Journal of clinical psychiatry* 68(12): 1901–6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18162021> (October 3, 2017).
- Miller, Earl K., and Jonathan D. Cohen. 2001. "An Integrative Theory of Prefrontal Cortex

- Function." *Annual Review of Neuroscience* 24(1): 167–202.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283309> (September 27, 2017).
- Morrow, Bret A., John D. Elsworth, and Robert H. Roth. 2007. "Repeated Phencyclidine in Monkeys Results in Loss of Parvalbumin-Containing Axo-Axonic Projections in the Prefrontal Cortex." *Psychopharmacology* 192(2): 283–90.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17265073> (September 27, 2017).
- Moskowitz, A., and G. Heim. 2011. "Eugen Bleuler's Dementia Praecox or the Group of Schizophrenias (1911): A Centenary Appreciation and Reconsideration." *Schizophrenia Bulletin* 37(3): 471–79.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21505113> (September 27, 2017).
- Muir, J L. 1996. "Attention and Stimulus Processing in the Rat." *Brain research. Cognitive brain research* 3(3–4): 215–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8806024> (September 27, 2017).
- Nagai, Taku et al. 2009. "Aripiprazole Ameliorates Phencyclidine-Induced Impairment of Recognition Memory through Dopamine D1 and Serotonin 5-HT1A Receptors." *Psychopharmacology* 202(1–3): 315–28. <http://link.springer.com/10.1007/s00213-008-1240-6> (October 3, 2017).
- Nase, G et al. 1999. "Genetic and Epigenetic Regulation of NMDA Receptor Expression in the Rat Visual Cortex." *The European journal of neuroscience* 11(12): 4320–26.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594657> (October 7, 2017).
- Nestler, Eric J, and Steven E Hyman. 2010. "Animal Models of Neuropsychiatric Disorders." *Nature Neuroscience* 13(10): 1161–69.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20877280> (September 27, 2017).
- Owen, A M et al. 1990. "Planning and Spatial Working Memory Following Frontal Lobe Lesions in Man." *Neuropsychologia* 28(10): 1021–34.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2267054> (September 27, 2017).
- Paus, Tomáš, Matcheri Keshavan, and Jay N. Giedd. 2010. "Why Do Many Psychiatric Disorders Emerge during Adolescence?" *Nature Reviews Neuroscience* 9(12): 947–57.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19002191> (September 27, 2017).
- Pesaran, Bijan et al. 2002. "Temporal Structure in Neuronal Activity during Working Memory in Macaque Parietal Cortex." *Nature Neuroscience* 5(8): 805–11.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12134152> (September 27, 2017).
- Philpot, B D, J H Lim, and P C Brunjes. 1997. "Activity-Dependent Regulation of Calcium-Binding Proteins in the Developing Rat Olfactory Bulb." *The Journal of comparative neurology* 387(1): 12–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9331168> (October 3, 2017).
- Picada, Jaqueline Nascimento et al. 2011. "Neurobehavioral and Genotoxic Parameters of Antipsychotic Agent Aripiprazole in Mice." *Acta Pharmacologica Sinica* 32(10): 1225–

32. <http://www.nature.com/doi/10.1038/aps.2011.77> (October 3, 2017).
- Pouille, F, and M Scanziani. 2001. "Enforcement of Temporal Fidelity in Pyramidal Cells by Somatic Feed-Forward Inhibition." *Science (New York, N.Y.)* 293(5532): 1159–63. <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1060342> (October 7, 2017).
- Ranganath, Ajit, and Simon N Jacob. 2016. "Doping the Mind: Dopaminergic Modulation of Prefrontal Cortical Cognition." *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 22(6): 593–603. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1073858415602850> (September 27, 2017).
- Reichenberg, Abraham et al. 2010. "Static and Dynamic Cognitive Deficits in Childhood Preceding Adult Schizophrenia: A 30-Year Study." *American Journal of Psychiatry* 167(2): 160–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20048021> (September 27, 2017).
- Robinson, Delbert G. et al. 2015. "A Randomized Comparison of Aripiprazole and Risperidone for the Acute Treatment of First-Episode Schizophrenia and Related Disorders: 3-Month Outcomes." *Schizophrenia Bulletin* 41(6): 1227–36. <https://academic.oup.com/schizophreniabulletin/article-lookup/doi/10.1093/schbul/sbv125> (October 20, 2017).
- Rosenkranz, J Amiel, and Anthony A Grace. 2002. "Cellular Mechanisms of Infralimbic and Prelimbic Prefrontal Cortical Inhibition and Dopaminergic Modulation of Basolateral Amygdala Neurons in Vivo." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22(1): 324–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11756516> (September 27, 2017).
- Rotaru, Diana C, David A Lewis, and Guillermo Gonzalez-Burgos. 2012. "The Role of Glutamatergic Inputs onto Parvalbumin-Positive Interneurons: Relevance for Schizophrenia." *Reviews in the neurosciences* 23(1): 97–109. <https://www.degruyter.com/view/j/revneuro.2012.23.issue-1/revneuro-2011-0059/revneuro-2011-0059.xml> (September 27, 2017).
- Samara, Myrto T. et al. 2014. "Chlorpromazine versus Every Other Antipsychotic for Schizophrenia: A Systematic Review and Meta-Analysis Challenging the Dogma of Equal Efficacy of Antipsychotic Drugs." *European Neuropsychopharmacology* 24(7): 1046–55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24766970> (September 27, 2017).
- Sartorius, N et al. 1986. "Early Manifestations and First-Contact Incidence of Schizophrenia in Different Cultures. A Preliminary Report on the Initial Evaluation Phase of the WHO Collaborative Study on Determinants of Outcome of Severe Mental Disorders." *Psychological medicine* 16(4): 909–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3493497> (September 27, 2017).
- Saunders, R C, B S Kolachana, J Bachevalier, and D R Weinberger. 1998. "Neonatal Lesions of the Medial Temporal Lobe Disrupt Prefrontal Cortical Regulation of Striatal

- Dopamine." *Nature* 393(6681): 169–71.  
<http://www.nature.com/doi/10.1038/30245> (September 27, 2017).
- Scatton, B, and G Bartholini. 1980. "Increase in Striatal Acetylcholine Levels by GABAergic Agents: Dependence on Corticostriatal Neurons." *Brain research* 200(1): 174–78.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6774796> (September 27, 2017).
- Schou, M, N Juel-Nielsen, E Stromgren, and H Voldby. 1954. "The Treatment of Manic Psychoses by the Administration of Lithium Salts." *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 17(4): 250–60.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13212414> (October 3, 2017).
- Schultz, W et al. 1993. "Reward-Related Activity in the Monkey Striatum and Substantia Nigra." *Progress in brain research* 99: 227–35.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8108550> (September 27, 2017).
- Seeman, P, and T Lee. 1975. "Antipsychotic Drugs: Direct Correlation between Clinical Potency and Presynaptic Action on Dopamine Neurons." *Science (New York, N.Y.)* 188(4194): 1217–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1145194> (October 7, 2017).
- Seeman, P, T Lee, M Chau-Wong, and K Wong. 1976. "Antipsychotic Drug Doses and Neuroleptic/dopamine Receptors." *Nature* 261(5562): 717–19.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/945467> (October 7, 2017).
- Seeman, Philip, Hong-Chang Guan, and Hubert H. M. Van Tol. 1993. "Dopamine D4 Receptors Elevated in Schizophrenia." *Nature* 365(6445): 441–45.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8413587> (September 27, 2017).
- Shimamura, Arthur P. 2000. "Toward a Cognitive Neuroscience of Metacognition." *Consciousness and Cognition* 9(2): 313–23.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924251> (September 27, 2017).
- Silbersweig, D. A. et al. 1995. "A Functional Neuroanatomy of Hallucinations in Schizophrenia." *Nature* 378(6553): 176–79.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7477318> (September 27, 2017).
- Sirota, Anton et al. 2008. "Entrainment of Neocortical Neurons and Gamma Oscillations by the Hippocampal Theta Rhythm." *Neuron* 60(4): 683–97.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19038224> (September 27, 2017).
- Slifstein, Mark et al. 2015. "Deficits in Prefrontal Cortical and Extrastriatal Dopamine Release in Schizophrenia: A Positron Emission Tomographic Functional Magnetic Resonance Imaging Study." *JAMA psychiatry* 72(4): 316–24.  
<http://archpsyc.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jamapsychiatry.2014.2414> (September 27, 2017).
- Somogyi, P, G Tamás, R Lujan, and E H Buhl. 1998. "Salient Features of Synaptic Organisation in the Cerebral Cortex." *Brain research. Brain research reviews* 26(2–3):

- 113–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9651498> (October 7, 2017).
- Sousa, Vitor H et al. 2009. "Characterization of Nkx6-2-Derived Neocortical Interneuron Lineages." *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 19 Suppl 1(suppl\_1): i1-10. <https://academic.oup.com/cercor/article-lookup/doi/10.1093/cercor/bhp038> (September 28, 2017).
- Spear, L. 2000. "Modeling Adolescent Development and Alcohol Use in Animals." *Alcohol research & health : the journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* 24(2): 115–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11199278> (September 27, 2017).
- Stambolic, V, L Ruel, and J R Woodgett. 1996. "Lithium Inhibits Glycogen Synthase Kinase-3 Activity and Mimics Wingless Signalling in Intact Cells." *Current biology : CB* 6(12): 1664–68. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8994831> (October 3, 2017).
- Stefansson, Hreinn et al. 2002. "Neuregulin 1 and Susceptibility to Schizophrenia." *The American Journal of Human Genetics* 71(4): 877–92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12145742> (September 27, 2017).
- Suddath, R L et al. 1990. "Anatomical Abnormalities in the Brains of Monozygotic Twins Discordant for Schizophrenia." *The New England journal of medicine* 322(12): 789–94. <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199003223221201> (September 27, 2017).
- Suzuki, Takefumi et al. 2011. "Treatment Resistant Schizophrenia and Response to Antipsychotics: A Review." *Schizophrenia Research* 133(1–3): 54–62. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22000940> (September 28, 2017).
- Swanson, L W. "The Projections of the Ventral Tegmental Area and Adjacent Regions: A Combined Fluorescent Retrograde Tracer and Immunofluorescence Study in the Rat." *Brain research bulletin* 9(1–6): 321–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6816390> (September 27, 2017).
- Szechtman, H, W Sulis, and D Eilam. 1998. "Quinpirole Induces Compulsive Checking Behavior in Rats: A Potential Animal Model of Obsessive-Compulsive Disorder (OCD)." *Behavioral neuroscience* 112(6): 1475–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9926830> (October 7, 2017).
- Tandon, Rajiv. 2011. "Antipsychotics in the Treatment of Schizophrenia." *The Journal of Clinical Psychiatry* 72(suppl 1): 4–8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22217436> (October 7, 2017).
- Taniguchi, Hiroki et al. 2011. "A Resource of Cre Driver Lines for Genetic Targeting of GABAergic Neurons in Cerebral Cortex." *Neuron* 71(6): 995–1013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21943598> (October 20, 2017).
- Telonis, Aristeidis G., and Marigoula Margarity. 2015. "Phobos: A Novel Software for Recording Rodents' Behavior during the Thigmotaxis and the Elevated plus-Maze

- Test." *Neuroscience Letters* 599: 81–85.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26007702> (October 20, 2017).
- Thierry, A M et al. 1973. "Dopaminergic Terminals in the Rat Cortex." *Science (New York, N.Y.)* 182(4111): 499–501. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4744179> (September 27, 2017).
- Thomases, D. R. et al. 2014. "Early Adolescent MK-801 Exposure Impairs the Maturation of Ventral Hippocampal Control of Basolateral Amygdala Drive in the Adult Prefrontal Cortex." *Journal of Neuroscience* 34(27): 9059–66.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24990926> (September 27, 2017).
- Thomases, D. R., D. K. Cass, and K. Y. Tseng. 2013. "Periadolescent Exposure to the NMDA Receptor Antagonist MK-801 Impairs the Functional Maturation of Local GABAergic Circuits in the Adult Prefrontal Cortex." *Journal of Neuroscience* 33(1): 26–34.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23283319> (September 27, 2017).
- Traub, Roger D. et al. 2004. "CELLULAR MECHANISMS OF NEURONAL POPULATION OSCILLATIONS IN THE HIPPOCAMPUS IN VITRO." *Annual Review of Neuroscience* 27(1): 247–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15217333> (September 27, 2017).
- Tseng, K. Y., and Patricio O'Donnell. 2004. "Dopamine-Glutamate Interactions Controlling Prefrontal Cortical Pyramidal Cell Excitability Involve Multiple Signaling Mechanisms." *Journal of Neuroscience* 24(22): 5131–39.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15175382> (October 7, 2017).
- Tseng, Kuei Y, R Andrew Chambers, and Barbara K Lipska. 2009. "The Neonatal Ventral Hippocampal Lesion as a Heuristic Neurodevelopmental Model of Schizophrenia." *Behavioural brain research* 204(2): 295–305.  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166432808006578> (November 1, 2017).
- Tseng, Kuei Y, and Patricio O'Donnell. 2004. "Dopamine-Glutamate Interactions Controlling Prefrontal Cortical Pyramidal Cell Excitability Involve Multiple Signaling Mechanisms." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24(22): 5131–39.  
<http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.1021-04.2004> (September 27, 2017).
- . 2007. "D2 Dopamine Receptors Recruit a GABA Component for Their Attenuation of Excitatory Synaptic Transmission in the Adult Rat Prefrontal Cortex." *Synapse (New York, N.Y.)* 61(10): 843–50. <http://doi.wiley.com/10.1002/syn.20432> (October 3, 2017).
- Tsuang, D W et al. 2001. "Examination of Genetic Linkage of Chromosome 15 to Schizophrenia in a Large Veterans Affairs Cooperative Study Sample." *American journal of medical genetics* 105(8): 662–68.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11803512> (September 27, 2017).
- Uhlhaas, P. J., and W. Singer. 2011. "The Development of Neural Synchrony and Large-Scale Cortical Networks During Adolescence: Relevance for the Pathophysiology of Schizophrenia and Neurodevelopmental Hypothesis." *Schizophrenia Bulletin* 37(3): 514–23. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21505118> (September 27, 2017).
- Uhlhaas, Peter J, Corinna Haenschel, Danko Nikolić, and Wolf Singer. 2008. "The Role of Oscillations and Synchrony in Cortical Networks and Their Putative Relevance for the Pathophysiology of Schizophrenia." *Schizophrenia bulletin* 34(5): 927–43. <https://academic.oup.com/schizophreniabulletin/article-lookup/doi/10.1093/schbul/sbn062> (October 7, 2017).
- Volk, D W et al. 2000. "Decreased Glutamic Acid decarboxylase67 Messenger RNA Expression in a Subset of Prefrontal Cortical Gamma-Aminobutyric Acid Neurons in Subjects with Schizophrenia." *Archives of general psychiatry* 57(3): 237–45. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10711910> (September 27, 2017).
- Voorn, P., B. Jorritsma-Byham, C. Van Dijk, and R. M. Buijs. 1986. "The Dopaminergic Innervation of the Ventral Striatum in the Rat: A Light- and Electron-Microscopical Study with Antibodies against Dopamine." *The Journal of Comparative Neurology* 251(1): 84–99. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3760260> (September 27, 2017).
- Weinberger, D R, K F Berman, and B P Illowsky. 1988. "Physiological Dysfunction of Dorsolateral Prefrontal Cortex in Schizophrenia. III. A New Cohort and Evidence for a Monoaminergic Mechanism." *Archives of general psychiatry* 45(7): 609–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3382320> (September 27, 2017).
- Weinberger, D R, K F Berman, and R F Zec. 1986. "Physiologic Dysfunction of Dorsolateral Prefrontal Cortex in Schizophrenia. I. Regional Cerebral Blood Flow Evidence." *Archives of general psychiatry* 43(2): 114–24. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3947207> (September 27, 2017).
- Whittington, Miles A., Roger D. Traub, and John G. R. Jefferys. 1995. "Synchronized Oscillations in Interneuron Networks Driven by Metabotropic Glutamate Receptor Activation." *Nature* 373(6515): 612–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7854418> (October 7, 2017).
- Womelsdorf, Thilo, and Pascal Fries. 2006. "Neuronal Coherence during Selective Attentional Processing and Sensory–motor Integration." *Journal of Physiology-Paris* 100(4): 182–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17317118> (September 27, 2017).
- Xing, Qinghe et al. 2007. "The Relationship between the Therapeutic Response to Risperidone and the Dopamine D2 Receptor Polymorphism in Chinese Schizophrenia Patients." *The International Journal of Neuropsychopharmacology* 10(5): 631–37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17105675> (October 3, 2017).

