



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

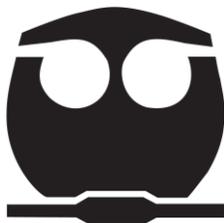
**ANÁLISIS DE MICROARREGLOS
EN UN MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

ROSA ILEANA GALLEGOS SILVA



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Herminia de Jesús Loza Tavera**

VOCAL: **Profesor: Martha Leticia Jiménez Pardo**

SECRETARIO: **Profesor: Alma Delia Genis Mendoza**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez**

2do. SUPLENTE: **Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Universidad Autónoma de la Ciudad de México (UACM)
Campus del Valle**

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Alma Delia Genis Mendoza

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. Patricia Mendoza Lorenzo

SUSTENTANTE:

Rosa Ileana Gallegos Silva

AGRADECIMIENTOS

A mis padres José Antonio y Guadalupe, por su cariño, su apoyo, su comprensión y su ejemplo.

A mis hermanos Toño y Gonzalo, por aguantarme y porque sé que siempre podré contar con ustedes.

A la M. en C. Alma Delia Genis, por su confianza en mí y por su guía en la realización de este trabajo.

A la Dra. Patricia Mendoza, por sus consejos, el apoyo y el ánimo que me brindó.

Al Dr. Nicolini y a la Dra. Mavil, por recibirme en su laboratorio.

Al Dr. Jorge Ramírez y su equipo de trabajo de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, por su asistencia técnica en la determinación de los microarreglos y el software genArise.

A mis profesores de la Facultad de Química, por compartir sus conocimientos y su ejemplo de profesionalidad.

A mis amigos de la Facultad de Química: Cintia, Diana, Erick, Erick físico, Gerardo, Jonathan, José Carlos, Mónica, Polett, Rafa, Yesica por su paciencia y por permitirme estar a su lado.

A mis amigos Claudia y Héctor, por su amistad incondicional y por enriquecer mi vida con los buenos momentos.

Y finalmente, a todas aquellas personas que comparten este triunfo conmigo.

ÍNDICE

	PÁGINA
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Definición de esquizofrenia	1
1.2 Costo económico y social de la esquizofrenia	1
1.3 Síntomas, presentación y patrones	2
1.4 Diagnóstico	4
1.5 Tratamiento	5
1.5.1 Farmacología de la esquizofrenia	5
1.6 Bases biológicas de la esquizofrenia	7
1.6.1 Genes y entorno	7
1.6.2 Hipótesis del neurodesarrollo	8
1.6.3 Hipótesis de la dopamina	9
1.6.4 Hipótesis del glutamato	10
1.6.5 Hipótesis del ácido gamma-aminobutírico	10
1.6.6 Hipótesis de la serotonina	10
1.7 Sistema dopaminérgico	11
1.8 Modelos animales	13
1.8.1 Modelo de la lesión neonatal en hipocampo ventral (LNHV)	14
1.8.2 Pruebas conductuales evaluadas en el modelo LNHV en ratas juveniles y adultas	16
1.9 Microarreglos de DNA	18
1.9.1 Microarreglos de expresión génica	18
1.9.2 Uso de microarreglos de expresión génica en esquizofrenia	20
1.10 Justificación del estudio	22
CAPÍTULO II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
2.1 Hipótesis	24
2.2 Objetivo general	24
2.2.1 Objetivos particulares	24
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	

3.1	Animales	25
3.2	Lesión neonatal en hipocampo ventral (LNHV)	25
3.3	Extracción de RNA	26
3.4	Impresión de las matrices	27
3.5	Marcaje del cDNA e hibridación de los microarreglos de DNA	28
3.6	Lectura del microarreglo	28
CAPÍTULO IV. RESULTADOS		
4.1	Resultados	30
CAPÍTULO V. DISCUSIÓN		
5.1	Discusión	45
5.2	Vía de señalización de calcio y genes modulados por la LNHV	50
CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS		
6.1	Conclusiones	54
6.2	Perspectivas	55
REFERENCIAS		56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
1	Síntomas positivos de la esquizofrenia	2
2	Síntomas negativos de la esquizofrenia	3
3	Medicamentos antipsicóticos	6
4	Cuadro comparativo entre el modelo LNHV y síntomas relacionados con esquizofrenia	16
5	Genes candidatos para esquizofrenia derivados de microarreglos de cDNA	21
6	Características de los microarreglos de expresión	28
7	Número de genes con valores de z-score mayor a 1.5 y menor a -1.5 después de la normalización de los datos en el grupo de ratas juveniles y adultas	33
8	Total de rutas metabólicas que podrían verse afectadas en cada tratamiento	33
9	Genes sub-expresados de acuerdo a la base de datos Rat Genome Database	35
10	Genes sobre-expresados de acuerdo a la base de datos Rat Genome Database	37
11	Rutas metabólicas y genes diferencialmente expresados que fueron asociados a trastornos mentales	39
12	Genes diferencialmente expresados e identificados en más de una región cerebral evaluada, para cada grupo experimental	43
13	Lista de genes altamente relacionados con esquizofrenia	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1	Sistema regulador de dopamina	12
2	Microarreglo de expresión génica	19
3	Representación gráfica de la expresión de genes obtenida a partir de datos no ajustados derivados de los microarreglos	30
4	Representación gráfica de la expresión génica obtenida a partir de datos ajustados derivados de los microarreglos	31
5	Representación gráfica de la expresión génica obtenida a partir de datos ajustados y agrupados en categorías de acuerdo con su nivel de expresión	32
6	Rutas metabólicas con mayor número de genes diferencialmente expresados en las tres áreas cerebrales evaluadas	34
7	Rutas metabólicas de interés diferencialmente expresadas en el grupo de ratas juveniles	40
8	Rutas metabólicas de interés diferencialmente expresadas en el grupo de ratas adultas	41
9	Genes diferencialmente expresados en las rutas de interés.	42
10	Vía de señalización de calcio	51

ABREVIATURAS

A	núcleo accumbens
ADC	adenilato ciclase
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
CALM	calmodulina
cDNA	DNA complementario
CN	calcineurina
DAG	diacilglicerol
DE	sub-expresión
DEPC	dietil policarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DSM	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales
EH	enfermedad de Huntington
ELA	esclerosis lateral amiotrófica
F344	cepa de ratas Fisher-344
GABA	ácido gamma-aminobutírico
GTP	adenosín trifosfato
H	hipocampo
IFC	Instituto de Fisiología Celular
IIB	Instituto de Investigaciones Biomédicas
IP ₃	inositol trifosfato
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LNHV	lesión neonatal en hipocampo ventral
LSD	ácido lisérgico
mRNA	RNA mensajero
NMDA	N-metil-D-aspartato
OE	sobre-expresión
P	corteza prefrontal
PCP	fenciclidina
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PIP ₂	fosfatidil inositol difosfato
PLC	fosfolipasa C
PTKA	proteína cinasa A
RGD	Rat Genome Database
RM	resonancia magnética nuclear
RNA	ácido ribonucleico
ROC	canales activados por receptor
VOCs	canales dependientes de voltaje
VTA	área tegmental ventral

I. INTRODUCCIÓN

1.1 DEFINICIÓN DE ESQUIZOFRENIA

La esquizofrenia es una enfermedad mental que se caracteriza principalmente por síntomas psicóticos, síntomas negativos y daño cognitivo. Los síntomas psicóticos se relacionan con la pérdida de contacto con la realidad, lo cual se manifiesta con creencias falsas (delirios) y experiencias perceptuales no experimentadas por otros (alucinaciones). Los síntomas negativos corresponden a un estado de déficit en la conducta del paciente, en relación a un comportamiento hipotéticamente “normal”, es decir, las emociones básicas y los procesos conductuales están disminuidos o ausentes. El deterioro cognitivo altera las funciones mentales, como memoria, orientación y lenguaje, interfiriendo con las actividades diarias y sociales de la persona afectada [1].

En realidad, no está claro si lo que se denomina esquizofrenia es una sola enfermedad o varias. Cada paciente tiene su propia combinación de síntomas y experiencias, lo que se verá influido por sus circunstancias particulares. Quien la padece comienza a sentir, pensar y hablar de forma diferente a como lo hacía antes, dicha persona puede manifestar: problemas de memoria y concentración, aislamiento social, comportamiento inusual, distorsión de la comunicación y afecto, ideas extrañas y experiencias perceptivas, mala higiene personal e intereses y motivación reducidos para las actividades del día a día. Estos cambios también pueden afectar la capacidad de la persona para mantener un trabajo, estudiar o relacionarse con familiares y amigos [2].

1.2 COSTO ECONÓMICO Y SOCIAL DE LA ESQUIZOFRENIA

En 2005 Wu y colaboradores, reportaron un costo total de la esquizofrenia en los Estados Unidos de 62.7 millones de dólares. Más del 50% de este costo fue atribuido a la reducción de la productividad laboral ocasionada por la mortalidad prematura por suicidio y el cuidado de la familia.

En nuestro país cerca de un millón de mexicanos padece esquizofrenia. Cada año son internadas 250 mil personas en los hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por trastornos mentales, donde el 50% de los pacientes son esquizofrénicos. De cada 100 pacientes con esquizofrenia, sólo el 40% son atendidos adecuadamente, el 60% restante de los casos está confinado en un cuarto o permanece oculto por sus familiares sin ningún tratamiento (<http://www.imss.gob.mx/>).

Esta enfermedad afecta actualmente a una de cada cien personas en el mundo y ha demostrado ser una carga económica sustancial, tanto para las familias de los pacientes, como para el sistema de salud y la sociedad en general [3].

1.3 SÍNTOMAS, PRESENTACIÓN Y PATRONES

Los síntomas de la esquizofrenia se incluyen dentro de dos categorías; positivos y negativos. Los síntomas positivos reflejan la presencia de pensamientos y conductas anormales como los que se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Síntomas positivos de la esquizofrenia

Delirios	Convicción errónea de origen patológico firmemente sostenida pero con fundamentos lógicos inadecuados. Pueden ser de varios tipos: persecución, de culpa, de grandeza, religioso, etc.
Alucinaciones	Son engaños de los sentidos, percepciones interiores que se producen sin un estímulo externo, pueden ser de tipo auditivas, táctiles, visuales, gustativas y olfativas.
Haba desorganizada	Indica que se ha perdido el control sobre sus pensamientos.
Conducta desorganizada o catatónica	Conducta repetitiva, comportamiento, agresivo y/o agitado, inquietud corporal, movimientos extraños y absurdos.
Trastornos del comportamiento	Agitación y angustia.

Los síntomas negativos reflejan deficiencias en las conductas que suelen estar presentes en una persona normal, se suelen confundir con signos de pereza o de mal

comportamiento, como por ejemplo; apatía, falta de placer, insociabilidad, etc. Estos síntomas pueden estar presentes en algún grado, desde la infancia de los pacientes, décadas antes de que se manifiesten las alucinaciones y los delirios. Hay que subrayar que no todos los pacientes tienen estos síntomas negativos (Tabla 2).

Tabla 2. Síntomas negativos de la esquizofrenia

Disminución en la expresión de emociones	Se manifiesta en aspectos del comportamiento como: expresión facial inmutable, mirada extraviada, sonríe cuando se habla de temas serios, etc.
Alogia	Se refiere al empobrecimiento del pensamiento y de la cognición, se manifiesta con pobreza verbal. El lenguaje es vago y repetitivo, se interrumpe antes de que una idea haya sido completada.
Abulia – apatía	La abulia se refiere a la falta de voluntad o iniciativa. La apatía es la falta de interés. Se manifiesta en problemas con el aseo y la higiene, falta de persistencia en el trabajo o cualquier otra tarea.
Anhedonia – insociabilidad	La anhedonia es la dificultad para experimentar interés o placer por las actividades que antes le gustaba realizar. Las relaciones sociales se restringen.
Problemas cognitivos de la atención	El paciente sólo es capaz de concentrarse esporádicamente.

Este trastorno se manifiesta típicamente en la adolescencia o al comienzo de la edad adulta y suele persistir durante toda la vida. Por lo general, los síntomas de la esquizofrenia son precedidos por un período "prodrómico", caracterizado por un deterioro en el funcionamiento personal, seguido de una fase aguda caracterizada por síntomas positivos típicos. Tras la resolución de la fase aguda, por lo general debido a algún tratamiento, los síntomas positivos disminuyen o desaparecen para muchas personas, en ocasiones dejando una serie de síntomas negativos en los que no hay diferencia con el período prodrómico inicial. Esta tercera fase que puede durar muchos años y es a menudo interrumpida por exacerbaciones agudas o "recaídas", que pueden necesitar intervenciones adicionales.

1.4 DIAGNÓSTICO

El manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-IV) [1] distingue cinco variables o subtipos dentro de la esquizofrenia que están definidos por la sintomatología predominante en el momento de la evaluación:

Esquizofrenia paranoide. Es la más frecuente, suele iniciarse entre los 20 y 30 años, es el tipo que mejor evoluciona a pesar de la aparatosidad del cuadro. Los pacientes que presentan el tipo paranoide son los que tienen más posibilidades de recuperarse. Se caracteriza por presentar delirios que se organizan alrededor de un tema; por ejemplo, los pacientes creen que enemigos poderosos pretenden capturarles. Suele ir acompañada por alucinaciones auditivas (voces imaginarias), relacionadas con el mismo tema delirante [1].

Esquizofrenia desorganizada ó hebefrénica. Las características principales de este tipo de esquizofrenia son el lenguaje y el comportamiento desorganizado y la falta de expresión emocional (denominada “afecto plano”). Los indicios suelen ser el descuido personal, junto con una conducta desorganizada. El habla suele ir acompañada por tonterías y risas que no parecen tener relación con lo que se está diciendo. Hay casos en los que se manifiestan alucinaciones y delirios, aunque esto no es una condición inherente en este tipo de esquizofrenia. Este tipo empeora progresivamente, sin que se observen remisiones significativas [1].

Esquizofrenia catatónica. Se caracterizada por trastornos del movimiento como, inmovilidad y estupor (catatonía), actividad motora excesiva, movimientos estereotipados, muecas y posturas extrañas. Puede haber un negativismo extremo que se manifiesta por el mantenimiento de una postura rígida. A pesar de estar consciente, el enfermo no reacciona frente a estímulos fuertes, incluso un dolor intenso puede no provocar reacción alguna. En los casos más graves pueden llegar a no hablar, ni comer, o beber durante largos periodos que pueden poner en peligro su vida. El pronóstico para este tipo de esquizofrenia suele ser malo [1].

Esquizofrenia indiferenciada. Es un tipo de esquizofrenia en la cual no predomina un síntoma concreto para el diagnóstico, hay síntomas psicóticos, pero no cumplen criterios para los tipos paranoide, desorganizado o catatónico [1].

Esquizofrenia residual. En este tipo de esquizofrenia predominan los síntomas negativos y puede presentarse como un cuadro permanente o como un cuadro de transición a una remisión completa. En este caso el paciente ya experimentó, por lo menos un episodio agudo de la enfermedad, pero en el momento en que está siendo examinado no presenta síntomas positivos o, si los presenta, éstos no son muy llamativos [1].

1.5 TRATAMIENTO

Históricamente, muchos psiquiatras y otros profesionales sanitarios han tenido una visión pesimista del pronóstico de la esquizofrenia, considerándola como una enfermedad grave e intratable durante toda la vida. Esta visión negativa no ha podido encontrar la confirmación a largo plazo en los estudios de seguimiento, que han demostrado variaciones considerables.

El tratamiento de la esquizofrenia se basa fundamentalmente en fármacos llamados antipsicóticos, los cuales controlan los síntomas positivos, pero es necesario y a la vez complementario que el enfermo reciba un tratamiento psicosocial, es decir, que la persona recupere sus hábitos de vida y se integre nuevamente a la sociedad. Cabe señalar que algunas personas nunca experimentan una recuperación completa de sus experiencias, sin embargo, logran mantener una calidad de vida aceptable si se les da el apoyo y ayuda adecuados [4].

1.5.1 Farmacología de la esquizofrenia

La mayor parte de los antipsicóticos son liposolubles y tienen una elevada afinidad a ciertas proteínas (92 a 99 %). Es probable que debido a que estos medicamentos son secuestrados en compartimentos lipídicos, tengan una duración de acción clínica

mayor a la estimada por sus vidas medias plasmáticas. Estos medicamentos pueden clasificarse en varios grupos dependiendo de su estructura química (Tabla 3).

Tabla 3. Medicamentos antipsicóticos.

Compuesto	Miembro representativo
Derivados fenotiacínicos	Clorpromacina Tioridacina Trifluoperacina Perfenacina
Derivado del tioxanteno	Tiotixeno
Butiferas	Haloperidol
Dihidroindolona	Molindona
Dibenzodiazepina	Lozapina
Dibenzoxacepina	Clozapina
Benzamida	Remoxiprida
Difenilbutilpiperidina	Piomicina

Aunque todos los antipsicóticos eficaces bloquean a los receptores D2 de dopamina, la intensidad de este bloqueo, en relación a otras acciones sobre receptores, varía en forma considerable entre diferentes medicamentos. Por ejemplo la clorpromacina y tioridacina bloquean los receptores alfa1 con mayor potencia que los receptores D2.

Los fármacos como la perfenacina y el haloperidol actúan de manera predominante sobre los receptores D2; tienen cierto efecto sobre los receptores 5-HT₂ y alfa1, y un bajo efecto sobre los receptores D1. La risperidona tiene una potencia aproximadamente igual en bloqueo de receptores D2 y 5-HT₂. [5]

A continuación se resumen las afinidades relativas de fijación al receptor en tres fármacos claves:

Clorpromacina: $\alpha_1 = 5\text{-HT}_2 \geq D2 > D1$

Haloperidol: $D2 > D1 = \alpha_1 > 5\text{-HT}_2$

Clozapina: $D4 = \alpha_1 > 5\text{-HT}_2 > D2 = D1$

Los antipsicóticos convencionales como la clorpromacina y el haloperidol, reducen los síntomas positivos en la mayoría de los pacientes; desafortunadamente tienen

numerosos efectos adversos que se relacionan con sus acciones en las aferencias dopaminérgicas. Además la clorpromacina disminuye la liberación neuronal de noradrenalina, causando un efecto antiadrenérgico. El bloqueo de receptores dopaminérgicos en el núcleo caudado y putamen, denominados en conjunto “estriado”, puede generar rigidez, temblor y alteraciones en los movimientos corporales parecidos a los de la enfermedad de Parkinson [6].

Muchos de estos efectos secundarios se evitan utilizando neurolépticos atípicos como la clozapina y la risperidona que no actúan directamente sobre los receptores dopaminérgicos del estriado, cuyo mecanismo de acción posiblemente involucre otros receptores como los de serotonina. Estos fármacos también son más efectivos frente a los síntomas negativos de la esquizofrenia. La investigación actual esta dirigida al descubrimiento de antipsicóticos atípicos que sean más selectivos para el sistema mesolímbico o tengan un mayor espectro de acción sobre los receptores de neurotransmisores centrales [5, 6].

1.6 BASES BIOLÓGICAS DE LA ESQUIZOFRENIA

Las causas de la esquizofrenia permanecen desconocidas. Y comprender la base neurobiológica de esta enfermedad representa uno de los mayores retos en neurociencia, sobre todo al tener un efecto directo sobre el pensamiento, la percepción y la conciencia de uno mismo. Una combinación de factores genéticos, biológicos, culturales y psicológicos, contribuyen al desarrollo de la enfermedad, por lo que varias teorías sobre su origen han sido propuestas.

1.6.1 Genes y entorno

La esquizofrenia tiene una incidencia familiar y las probabilidades de desarrollar la enfermedad disminuyen conforme se alejan de la línea directa, existe un incremento del 10% en los parientes de primer grado de sujetos con esquizofrenia [7]. Existe evidencia de la heredabilidad de la esquizofrenia hasta en un 80%. De acuerdo con estos datos la esquizofrenia podría ser fundamentalmente un trastorno genético altamente heredable, relacionado con cambios en la morfología del cerebro,

(reducción volumétrica en una serie de regiones corticales), sobre todo en las regiones frontal y temporal, así como varias regiones subcorticales, especialmente el hipocampo [8, 9].

Se ha logrado examinar *in vivo* los cerebros de pacientes con esquizofrenia mediante imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN). En ellos se han observado diferencias estructurales como el aumento en el tamaño de los ventrículos laterales, lo que refleja la reducción del tejido cerebral que los rodea, como son: la corteza frontal, corteza medial, amígdala, hipocampo y tálamo. Esta reducción en el volumen de la materia gris produce importantes cambios físicos cerebrales en la estructura microscópica y la función de las conexiones corticales, debido principalmente a una disminución en el neuropilo (red compleja y ordenada de prolongaciones dendríticas, axónicas y gliales) más que a una disminución en el número de neuronas [10].

Recientemente se han identificado varios genes específicos que parecen aumentar el riesgo de desarrollar la enfermedad, sobre todo aquellos involucrados en la transmisión sináptica, su plasticidad o el crecimiento de la sinapsis [2].

1.6.2 Hipótesis del neurodesarrollo

Esta teoría propone que la predisposición genética en combinación con factores ambientales durante el periodo prenatal como las infecciones virales durante el desarrollo fetal y la lactancia o una mala nutrición materna, producen alteraciones en la conectividad del cerebro durante su desarrollo, con síntomas observables en la adolescencia y en la edad adulta [11].

Los eventos adversos durante el desarrollo incluyen arresto neuronal durante el segundo trimestre de gestación, diferenciación y migración de precursores neuronales, proliferación de dendritas y axones, muerte celular programada (apoptosis), poda sináptica, anormalidades en el lóbulo temporal y otras regiones límbicas, principalmente en el control cortical mediado por el sistema dopaminérgico [11].

1.6.3 Hipótesis de la dopamina

Se basa en dos observaciones principales: 1) se refiere a los efectos de las anfetaminas en personas sanas. Las anfetaminas aumentan la neurotransmisión en las sinapsis que usan catecolaminas y producen la liberación de dopamina, la sobredosis de estas drogas sintéticas puede conducir a un episodio psicótico con síntomas positivos prácticamente indistinguibles de los de la esquizofrenia, lo que indica que la psicosis está de algún modo relacionada con el exceso de catecolaminas en el cerebro. 2) Se relaciona a los efectos terapéuticos de los antipsicóticos sobre el sistema nervioso central, ya que disminuyen los síntomas positivos de la afección.

En la década de 1950 los investigadores descubrieron que el fármaco *clorpromacina*, desarrollado inicialmente como antihistamínico evitaba los síntomas positivos de la esquizofrenia. Posteriormente se observó que éste y otros antipsicóticos relacionados, eran potentes bloqueantes de los receptores dopaminérgicos, específicamente de los receptores D2. Estos mismos fármacos son eficaces en el tratamiento de psicosis por anfetaminas y cocaína [2]. Según la hipótesis de la dopamina en la esquizofrenia, los episodios psicóticos de esta enfermedad se desencadenan específicamente por la activación de receptores dopaminérgicos.

Actualmente se sabe que pacientes con esquizofrenia presentan hiperdopaminergia en la región mesolímbica relacionada con la presencia de los síntomas positivos de la enfermedad y una hipodopamiérgia en la corteza prefrontal relacionada con los síntomas negativos y el daño cognitivo [12]. También se ha observado una baja expresión de receptores D2 en la corteza prefrontal [13]. No obstante, la hipótesis de la dopamina está lejos de estar completa a pesar del tentador vínculo entre los síntomas positivos de la esquizofrenia y la dopamina. Si un sistema dopaminérgico hiperactivo fuera totalmente causante de la patogénesis, los antipsicóticos darían mucho mejores resultados en el tratamiento, pero son parcialmente eficaces en la mayor parte de los casos e ineficaces en algunos pacientes [5].

1.6.4 Hipótesis del glutamato

En este caso, se observó que compuestos alucinógenos como la fenciclidina (PCP, por sus siglas en inglés) y la ketamina inducían un estado mental similar a la esquizofrenia, reproduciendo tanto síntomas positivos como negativos, afectando las sinapsis que usan el glutamato como neurotransmisor [14].

El glutamato es un neurotransmisor considerado un excitador cerebral rápido, mientras que la PCP actúa inhibiendo los receptores de *N*-metil *D*-aspartato (NMDA). Según la hipótesis del glutamato en la esquizofrenia, el trastorno refleja la disminución de la activación de estos receptores cerebrales. En estudios postmortem de pacientes con esquizofrenia se encontró una disminución en la expresión de los receptores a NMDA en corteza prefrontal, la cual se relaciona con el deterioro cognitivo que presentan los pacientes [15].

1.6.5 Hipótesis del ácido gamma-aminobutírico

Estudios postmortem indican que la esquizofrenia está asociada con un déficit en la transmisión sináptica mediada por el ácido gamma-aminobutírico (GABA). Las hipótesis actuales de los sistemas de neurofisiología indican que un importante papel de la transmisión mediada por GABA es producir oscilaciones sincronizadas de las redes neurales que facilitan el procesamiento y el flujo de información dentro y entre regiones del cerebro que son esenciales para la función cognitiva normal. Por lo tanto, los déficits cognitivos en la esquizofrenia pueden resultar de una disfunción de la sinapsis GABA que perturba la sincronía neural [16].

Se ha reportado que el alelo T del gen GABRB1 (que codifica la subunidad beta-1 del receptor GABA-A) está fuertemente asociado con la enfermedad, por lo que ha sido propuesto como marcador molecular [17].

1.6.6 Hipótesis de la serotonina

El papel de la serotonina en la esquizofrenia fue propuesto basándose sobre la base de los efectos alucinógenos del ácido lisérgico (LSD), ya que este compuesto activa

los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A}. Existen antipsicóticos atípicos como la clozapina, olanzapina y risperidona que son antagonistas de diferentes receptores a serotonina. En modelos animales se ha observado que tras la administración crónica de antipsicóticos atípicos se regula a la baja a los receptores 5-HT_{2A} corticales. Aunque aún existe debate sobre las alteraciones en el sistema serotoninérgico en la esquizofrenia, recientemente estudios post mortem de pacientes con esquizofrenia mostraron que la densidad de receptores 5-HT_{1A} era elevada en la corteza prefrontal, mientras que la densidad de receptores 5-HT_{2A} estaba disminuida [18].

1.7 SISTEMA DOPAMINÉRGICO

La dopamina es una catecolamina que cumple funciones de neurotransmisor en el sistema nervioso central, desempeñando un papel importante en el comportamiento y la cognición, la actividad motora, la motivación, la recompensa, el sueño, el humor, la atención y el aprendizaje. Las neuronas dopaminérgicas se sitúan en varias regiones cerebrales y transmiten información de una región a otra, mediante los axones que corren todo el trayecto de la vía hasta los distintos destinos sinápticos (Figura 1) [19, 20].

Las principales vías dopaminérgicas son:

<i>Vía mesolímbica</i>	Transmite desde el área tegmental ventral (VTA) hasta el núcleo accumbens.
<i>Vía mesocortical</i>	Transmite desde el VTA hasta la corteza prefrontal.
<i>Vía nigroestriada</i>	Se proyecta desde la sustancia negra hasta el núcleo caudado y putamen (estriado) y participa en el control motor.
<i>Vía tuberoinfundibular</i>	Transmite desde el hipotálamo hasta la glándula pineal y ejerce influencia sobre ciertas hormonas, como la prolactina.

Gran cantidad de evidencia indica que anomalías en las vías mesolímbica y mesocortical son el origen de la aparición de algunos síntomas de la esquizofrenia.

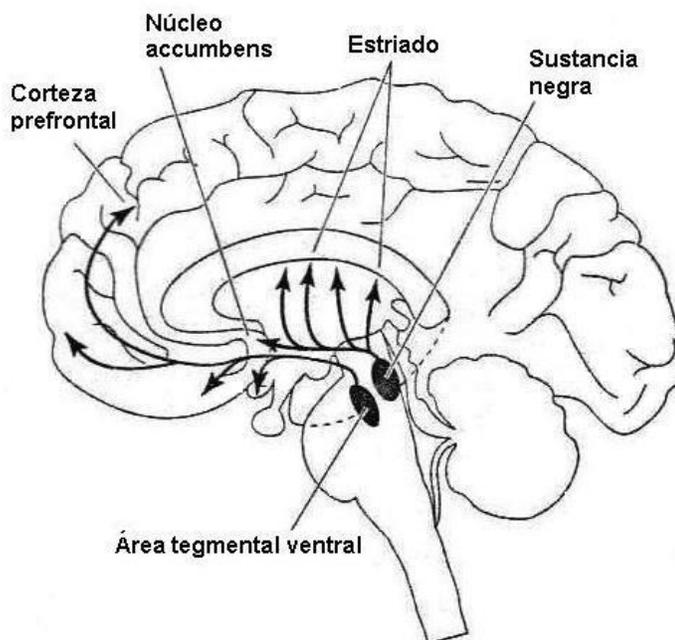


Figura 1. Sistema regulador de dopamina

Vía mesolímbica.

La ruta comienza en el área tegmental ventral y se conecta con el sistema límbico. Participa en el comportamiento de recompensa, es decir, con la respuesta de la conducta frente a estímulos de gratificación emocional y motivación. Trastornos en la vía mesolímbica pueden causar los síntomas positivos de la esquizofrenia [19].

Vía mesocortical.

Surge sobre todo de la región tegmental ventral. Es esencial en la función cognitiva, participa en el comportamiento de recompensa y la adicción. Trastornos en esta vía producen psicosis tales como las que se ven en el deterioro cognitivo de la esquizofrenia como cambios en la personalidad y pensamiento desorganizado [19].

El **área ventral tegmental** (VTA) es parte del cerebro medio y está compuesta por neuronas dopaminérgicas, GABA y de glutamato [21].

El **núcleo accumbens** es un componente del estriado ventral y está conectado al núcleo caudado y putamen. Se compone de neuronas espinosas medianas que

reciben información tanto de las neuronas dopaminérgicas del VTA, como las neuronas glutamatérgicas del hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal. Cuando son activadas por estos estímulos, las proyecciones de las neuronas espinosas medianas liberan GABA en el núcleo palidum ventral. La liberación de dopamina en esta estructura regula al sistema mesolímbico [20, 21].

La **región prefrontal** es la parte más anterior de la corteza cerebral, ubicada en la parte inmediatamente anterior a la corteza motora y premotora, ocupando la porción más grande de los lóbulos frontales. La corteza prefrontal se puede distinguir de las restantes regiones frontales atendiendo a diversos indicadores tales como su composición celular, su inervación dopaminérgica o sus aferencias talámicas. Los daños en esta estructura cerebral ocasionan dificultad para llevar a cabo conductas complejas que son temporal, espacial e incluso socialmente adecuadas [19, 21].

El **hipocampo** está ubicado en la porción medial del lóbulo temporal, se extiende anterior a la amígdala y luego se estrecha conforme cruza de manera posterior la superficie inferior del cuerpo calloso. El hipocampo (y las estructuras contiguas del lóbulo temporal, denominadas en conjunto *formación hipocámpica*) posee numerosas conexiones con muchas porciones de la corteza cerebral, así como las estructuras basales del sistema límbico. Es conocido también por su asociación con la memoria y el aprendizaje [20, 21].

1.8 MODELOS ANIMALES

Se han desarrollado diversos modelos animales que han ayudado a los investigadores a entender un poco más sobre esta enfermedad. Los animales pueden ser sometidos a eventos estresantes, químicos o quirúrgicos, para generar respuestas bioquímicas y conductuales semejantes a las de los individuos afectados con esquizofrenia.

Los modelos animales usados para trastornos psiquiátricos deben cumplir con los siguientes criterios:

1. Criterio de validez predictiva que implica que los fármacos que modifican el estado patológico en los humanos también deben de hacerlo en el modelo animal, cubriendo los requisitos de sensibilidad, selectividad y potencia relativa.
2. Criterio de validez de apariencia, el cual se refiere a la similitud fenomenológica entre el modelo y el desorden estudiado, se propone que el modelo debe de mostrar los síntomas más representativos del desorden.
3. Criterio de validez hipotética, este criterio establece que la hipótesis que explica el trastorno psiquiátrico también debe servir como fundamento del modelo.

Para el estudio de la esquizofrenia se han propuesto varios modelos animales los cuales pueden ser divididos en tres categorías:

Modelos farmacológicos, inducidos por la administración de fármacos para representar síntomas positivos en esquizofrenia, como la fenciclidina, molécula no competitiva del receptor NMDA.

Modelos genéticos, inducidos por mutaciones o deleciones genéticas, relacionados con las vías de neurotransmisión involucradas en la enfermedad como la dopaminérgica y la glutamatérgica, entre otras.

Modelos de neurodesarrollo, inducidos por una lesión física o neurotóxica o por factores ambientales durante el neurodesarrollo.

Los modelos psiquiátricos son muy imperfectos y tienen sus limitaciones, por lo general, la similitud con el hombre es lejana y únicamente relativa a algunos aspectos concretos de la enfermedad, debido a que tratan de reproducir en un animal sano, conductas humanas muy complejas. A pesar de todo, se utilizan para comprender las bases biológicas de los trastornos psicológicos, los mecanismos de acción de los antipsicóticos y han sido muy útiles para proponer nuevas terapias o tratamientos.

1.8.1 Modelo de la lesión neonatal en hipocampo ventral (LNHV)

El modelo LNHV fue propuesto por Lipska y colaboradores en 1992 [24], en él se reproducen algunos de los síntomas positivos y negativos que presentan los pacientes con esquizofrenia. Está basado en la hipótesis del neurodesarrollo, la

cual postula que la migración neuronal es alterada desde el segundo trimestre de gestación, afectando el sistema dopaminérgico, además de varios de los sistemas de neurotransmisión y expresión de proteínas y receptores, también alterados en esquizofrenia.

Este modelo es ideal para comprender los mecanismos etiológicos de la enfermedad y la reversibilidad de los síntomas a través de tratamientos farmacológicos, pues se tiene la ventaja de no utilizar fármacos para su inducción como en la mayoría de los modelos validados para el estudio de la psicosis. Por el contrario, se induce con una pequeña lesión excitotóxica que consiste en la inyección bilateral de ácido iboténico en el cerebro inmaduro de los animales neonatos, dando oportunidad a su posterior maduración y reacomodo de este. Para realizar la lesión primero se hace una incisión en la piel que cubre el cráneo de los animales. Con ayuda de un aparato estereotáxico se localizan las coordenadas de la región del hipocampo ventral y posteriormente se inyecta el ácido iboténico o una solución de PBS para los animales del grupo control.

En la etapa adulta, los animales lesionados presentan conductas relacionadas con los síntomas positivos y negativos de la enfermedad [22]. En la Tabla 4 se hace un cuadro comparativo entre las conductas observadas en el modelo y los síntomas presentes en la esquizofrenia por lo que se considera que este modelo cumple con los tres criterios de validez:

- 1) Validez predictiva: Los antipsicóticos responden de manera dosis dependiente en el modelo y se ha comprobado la irreversibilidad del mismo.
- 2) Validez de apariencia: Se pueden observar algunos síntomas positivos (hiperlocomoción) y negativos como el decremento en la interacción social, disminución en la respuesta de inhibición por prepulso y deterioro en la memoria.
- 3) Validez hipotética: El modelo está sustentado sobre la hipótesis del neurodesarrollo, mostrando que el daño provocado en las primeras etapas de desarrollo (estado neonato) puede afectar la conducta del individuo a largo plazo [23].

Tabla 4. Cuadro comparativo entre el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral (LNHV) y síntomas relacionados a esquizofrenia.*

	Conductas en el Modelo LNHV	Síntomas de la Esquizofrenia
Cambios conductuales	Decremento inhibición del prepulso	Decremento inhibición del prepulso
	Decremento en memoria de trabajo	Decremento en memoria de trabajo
	Decremento del tiempo de socialización	Reducción de contacto social
	Hiperlocomoción	Susceptibilidad al estrés y síntomas positivos
Respuesta farmacológica	Las anfetaminas exacerbaban la hiperlocomoción	Las anfetaminas incrementan los síntomas positivos
	MK-801, PCP y ketamina exacerbaban la hiperlocomoción	Ketamina incrementa síntomas positivos
	Los antipsicóticos reducen las conductas tipo esquizofrenia en el modelo	Los antipsicóticos controlan los síntomas de la esquizofrenia
Desarrollo	Las conductas tipo esquizofrenia se presentan en animales adultos	La enfermedad se desarrolla en el inicio de la etapa adulta
Cambios moleculares	Decremento en los niveles de N-acetil aspartato, descarboxilasa-GAD67 y del factor neurotrófico cerebral	Decremento en los niveles de N-acetil aspartato, descarboxilasa-GAD67 y del factor neurotrófico cerebral
	Cambios en la expresión receptores dopaminérgicos (D1, D2 y D3)	Cambios en la expresión de receptores dopaminérgicos

*Modificado de Genis, López-Rubalcava, 2011 [23].

1.8.2 Pruebas conductuales evaluadas en el modelo LNHV en ratas juveniles y adultas.

Los animales lesionados se someten a varias pruebas conductuales que permiten determinar la presencia de esquizofrenia a partir de síntomas positivos y negativos que nos permitan validar el modelo. Las pruebas realizadas fueron las siguientes.

1.- Interacción social: el deterioro de la sociabilidad es uno de los síntomas negativos más representativos en la esquizofrenia. En esta prueba se coloca un animal lesionado y otro falsamente lesionado (que no han interactuado

previamente) en un cilindro transparente con luz blanca directa y se gravan sus actividades durante 10 minutos. Se mide el tiempo acumulado de interacción, es decir, el tiempo que el animal busca la atención del otro. Se ha reportado reducción de la interacción social en animales lesionados de 35 (pre-pubertad) y 65 (post-pubertad) días de edad, realizando la prueba en una arena con luz roja durante 10 min [22].

2.- Actividad locomotora: para esta prueba se mide el número de cruces que realiza el animal en la caja durante 5 minutos. En los animales lesionados se espera una hiperlocomoción, derivada probablemente del exceso de dopamina en la región mesolímbica, producida por la lesión. La actividad locomotora es el parámetro que más se ha evaluado en el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral, ha sido medida en varias edades (35, 56, 70, 86 y 150 días) donde algunos autores han observan hiperlocomoción únicamente a los 56 días [24].

3.- Prueba de memoria: para esta prueba se utiliza un laberinto en "T" donde se ha demostrado la deficiencia de memoria en los animales con lesión neonatal en hipocampo ventral de 35 y 56 días, debido a que los animales incrementaron el tiempo de exploración en el laberinto, al igual que la latencia. Con esta prueba se ha observado una reducción significativa del tiempo de exploración de los animales con LNHV a las 6 semanas post operación, previo estrés por restricción de comida. En otro trabajo a los 56 días y midiendo la memoria de trabajo mediante esta prueba se encontró una reducción de latencia en el grupo de animales adultos lesionados [25,26].

4.- Inhibición del prepulso sensorial: esta prueba evalúa la capacidad de respuesta ante un estímulo auditivo. En pacientes con esquizofrenia, se establece que presentan reducción del prepulso sensorial posiblemente derivado de la dificultad de filtrar sonidos. En los animales adultos con lesión neonatal en hipocampo ventral, posiblemente también se pierda esta capacidad de filtrar sonidos, por lo tanto, la prueba mide el procesamiento auditivo y la capacidad de filtración de sonidos en los animales. El animal se somete a dos estímulos auditivos; uno suave (prepusos) que

precede a otro de mayor intensidad (pulso). En un animal normal se ha observado que la respuesta al segundo estímulo es menor al primero cuando ya fue expuesto al prepulso. En animales lesionados al igual que en pacientes, la respuesta a ambos estímulos es igual, ya que su capacidad de filtración auditiva está alterada.

1.9 MICROARREGLOS DE DNA

Los “microarreglos de DNA” o “chips de DNA” o “Biochips de DNA” (del inglés *DNA Microarray*) constituyen uno de los mayores avances en biología molecular al facilitar el análisis simultáneo de miles de genes en un solo experimento. Un microarreglo de DNA representa una superficie sólida sobre la cual se depositan pequeños fragmentos de DNA de forma ordenada de manera que formen una matriz de secuencias en dos dimensiones [27]. La superficie empleada para fijar el material genético varía entre vidrio, plástico y silicio. Su funcionamiento se basa en medir los niveles de hibridación entre una sonda específica (del inglés, *probe*) y una molécula diana o, molécula blanco (conocida como *target*) mediante el uso de fluorescencia y un análisis de imagen la cual nos indicara el nivel de expresión de un gen en particular. Esta técnica se fundamenta en la capacidad que tienen las moléculas de DNA de hibridar con su secuencia complementaria en solución [27].

Este tipo de herramienta genómica es usada principalmente para analizar la expresión diferencial de genes bajo diferentes condiciones (salud y enfermedad), aunque sus aplicaciones pueden ser muy diversas como el diagnóstico molecular, la clasificación molecular de enfermedades complejas, la genotipificación de patógenos, la identificación de perfiles genéticos y dianas terapéuticas, la predicción de respuesta a determinados tratamientos, la detección de mutaciones y polimorfismos, ensayos de secuenciación masiva, medicina preventiva y toxicología de fármacos, entre otras [28].

1.9.1 Microarreglos de expresión génica

En este tipo de chips de DNA se suele someter a hibridación moléculas de DNA complementario (cDNA) o fragmentos derivados de PCR convencional que corresponden a fragmentos de RNA mensajero (mRNA). Estos fragmentos

generalmente provienen de dos condiciones o tratamientos, una considerada como sana y otra que representa alguna “enfermedad o patología”. Cada una de estas condiciones es marcada con fluoróforos distintos como el Cy3 (verde) y el Cy5 (rojo) mediante ensayos de transcripción reversa. Ambas condiciones son mezcladas y sometidas a hibridación sobre un mismo chip de DNA bajo condiciones controladas de astringencia y temperatura, después de lo cual se procede al escaneo del dispositivo y al análisis de resultados [27-28].

En este caso el uso de diferentes fluoróforos (Cy3 y Cy5) requiere la toma de al menos dos imágenes, una para cada uno de los marcadores. La intensidad de la fluorescencia emitida al excitar estas moléculas con diferentes longitudes de onda es captada por sistemas computarizados que la transforman en un código de colores a los cuales se les asigna un valor cuyo significado se traduce en la expresión relativa de los genes presentes en el microarreglo [29]. Estas imágenes generalmente son analizadas de forma independiente, pero también sobreponiendo ambas imágenes de forma que es posible visualizar genes que se activan (sobreexpresan, del inglés *overexpression*) o se reprimen (subexpresan, del inglés *downexpression*) bajo distintas condiciones. De esta manera se obtiene una imagen como la que se muestra en la Figura 2.

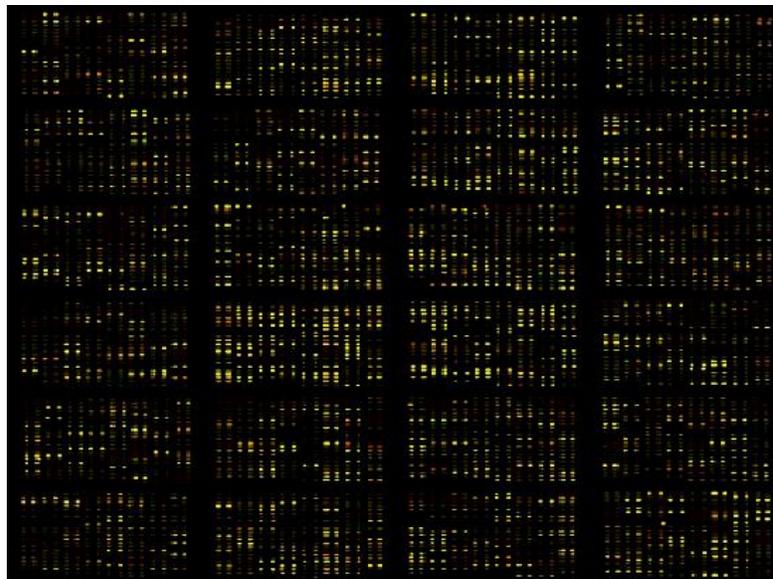


Figura 2. Microarreglo de expresión génica.

Los datos que se obtienen de los microarreglos de DNA generalmente son considerados como datos crudos los cuales tienen que pasar por una serie de normalizaciones las cuales permiten incrementar la confiabilidad de los resultados obtenidos, aunque siempre será necesario confirmar los niveles de expresión de los genes de interés mediante otras técnicas moleculares como PCR cuantitativa en tiempo real.

La normalización de los resultados siempre requerirá el uso de paquetes estadísticos que permitan identificar entre los miles de datos que se obtienen, aquellos genes que realmente presenten un cambio significativo que se pueda traducir en un “cambio verdadero y real” dentro de un proceso biológico. La gran ventaja de estas herramientas bioinformáticas es que permiten agrupar a los genes en función de sus niveles de expresión, su función o su estructura, generando grandes bases de datos donde es más sencillo inferir la función y participación de uno o varios genes dentro de los diferentes procesos celulares. Con el uso adecuado de estas herramientas es posible incrementar nuestro potencial de conocimiento sobre la etiología de muchas enfermedades.

1.9.2 Uso de microarreglos de expresión génica en esquizofrenia

En el 2005, Lipska y colaboradores [30] evaluaron diferencias en la expresión del mRNA asociados con la LNHV y el tratamiento con haloperidol en la corteza frontal y temporal de dos cepas de ratas con diferente sensibilidad a los efectos de la lesión; ratas Fisher 344 (en estudios anteriores se demostró que esta cepa de ratas es más sensible a los efectos de la lesión) y ratas Lewis mediante el uso de microarreglos de cDNA. Se compararon los perfiles de expresión de genes entre los siguientes grupos:

- Adultos lesionado vs adultos falsamente lesionado de ratas F344.
- Adultos F344 lesionados, tratados con haloperidol vs tratados con solución salina
- Adultos normales F344 vs adultos normales ratas Lewis
- Neonatos normales de 6 días F344 vs adultos normales F344

Las comparaciones entre los neonatos de días 6 y las ratas adultas F344 no se realizaron por que los datos obtenidos fueron insuficientes. En este estudio, los autores seleccionaron genes con niveles de expresión alterados a consecuencia de la lesión y que después del tratamiento con haloperidol se normalizaron. A estos genes los llamaron genes “contrarrestados”.

La lista de los genes contrarrestados fue comparada después con los transcritos alterados entre las cepas F344 y Lewis y sólo 6 de los genes contrarrestados difirieron significativamente entre las dos cepas: adeniliclasa asociada a proteína 1 (CAP1), canales de potasio activados por conductos de calcio, subfamilia M, miembro beta 1 (KCNMB1), doublecortex (DCX), adenosina monofosfato deaminasa 2, isoforma L (AMPD2), enzima málico 3 mitocondrial dependiente de NADP+ (ME3) y aspartilglucosaminidasa (AGA). De estos genes, sólo el gen KCNMB1 coincidió en las dos regiones evaluadas, corteza frontal y temporal, mientras que los otros cinco genes se generaron sólo a partir del análisis de la corteza temporal (Tabla 5).

Tabla 5. Genes candidatos para esquizofrenia derivados de microarreglos de cDNA.*

Nombre del gen	Efectos de la lesión	Efectos de la Haloperidol	del Tipo de tejido
Kcnmb1	4.1	0.21	Frontal
Kcnmb1	8.7	0.23	Temporal
Dbx	0.29	3.4	Temporal
Me3	0.26	4.4	Temporal
CAP1	0.35	2.6	Temporal
AMPD2	0.16	4.2	Temporal
AGA	0.35	2.8	Temporal

*Los genes candidatos reunieron tres criterios: (1) expresión diferencial significativa entre los neonatos lesionados-VH y los controles, (2) diferencias significativas de la transcripción inducida por el haloperidol en dirección contraria a la inducida por la lesión-VH y (3) expresión diferencial entre cepas de ratas F344 y Lewis. Unidades relativas de expresión.

En la tabla 5 se muestran los niveles relativos de expresión de los genes candidatos. En la corteza temporal, la lesión parece disminuir el nivel de expresión de los genes candidatos, mientras que el haloperidol contrarresta los efectos de la lesión aumentando la expresión de estos genes. Excepto para el gen *Kcnmb1* que en la corteza frontal la lesión eleva los niveles del mRNA y el fármaco disminuye los niveles de expresión [30].

Dentro de la lista de genes candidatos que ellos proponen, no se encuentra ninguno que haya sido recientemente reportado con asociación genética con esquizofrenia, por lo que concluyen que algunas características de estos genes candidatos podrían tener una relevancia funcional en el trastorno. Además, que es poco probable que un sólo modelo animal sea capaz de captar toda la complejidad de la esquizofrenia, pero es posible que una variedad de modelos individuales juntos puedan ayudar a entender mejor la etiología de los síntomas psicóticos [30].

1.10 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La esquizofrenia es una enfermedad de etiología desconocida cuyos tratamientos actuales son parcialmente efectivos. Se ha reportado un numeroso grupo de pacientes con fenotipos 'resistentes' de la enfermedad, es decir, casos en los que no se obtiene un grado mínimo de remisión con los tratamientos convencionales. Estos casos son una evidencia más de que aún carecemos de un modelo de tratamiento integrador a consecuencia del desconocimiento de las causas exactas que originan la enfermedad.

A pesar de que existe una fuerte evidencia de que la esquizofrenia es un trastorno altamente heredable, los estudios genéticos no han proporcionado resultados definitivos. De igual manera se han realizado estudios bioquímicos de genes candidatos basados en los sistemas fisiológicos teóricamente relevantes en la enfermedad, sin generar resultados concluyentes.

Los avances en investigación han llevado a la generación de modelos animales que reproducen síntomas de esquizofrenia con la finalidad de usarlos como herramientas

metodológicas en el estudio de este trastorno. Por otra parte los avances en biología molecular están facilitando la identificación de marcadores moleculares de riesgo para un gran número de enfermedades cuya aplicación en investigación podría facilitar el estudio de la fisiopatología de muchas enfermedades.

En este trabajo se propone el uso del modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral (LNHV) en combinación con microarreglos de cDNA para la búsqueda de marcadores moleculares que puedan ser relevantes en el desarrollo de esquizofrenia. Nuestro objetivo es identificar mediante la expresión diferencial de genes, genes candidatos que pudieran estar relacionados con alteraciones biológicas que representen un riesgo potencial para el desarrollo de esquizofrenia y que además puedan ser usados en investigación para el estudio de su fisiopatología y para mejorar las herramientas pronósticas, diagnósticas y de tratamiento de la enfermedad.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS

La lesión neonatal en hipocampo ventral alterará el transcriptoma de ratas Wistar juveniles (45 días) y adultas (90 días) generando conductas tipo esquizofrenia.

2.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar mediante el modelo de lesión neonatal de hipocampo ventral, cambios en la transcripción de genes en ratas macho Wistar de 45 y 90 días de edad, que puedan ser relevantes en la aparición de los síntomas psicóticos posteriores a la pubertad.

2.2.1 Objetivos particulares

- Evaluar los perfiles de expresión transcripcional en el modelo animal de lesión neonatal en hipocampo ventral en diferentes áreas cerebrales (hipocampo, núcleo accumbens y corteza prefrontal).
- Evaluar los perfiles de expresión de ratas lesionadas contra ratas falsamente lesionadas.
- Comparar los perfiles de expresión transcripcional de genes entre las ratas juveniles de 45 días y las ratas adultas de 90 días.
- Identificar posibles genes candidatos asociados a esquizofrenia en el modelo animal propuesto.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES

En este estudio se usaron cuarenta ratas macho Wistar obtenidas a partir de ratas preñadas en el laboratorio, el promedio de las crías osciló entre cuatro y ocho por camada. Esta población fue dividida en cuatro grupos experimentales:

- I. 10 ratas LHV-juveniles (lesionadas)
- II. 10 ratas juveniles falsamente lesionadas
- III. 10 ratas LHV-adulto (lesionadas)
- IV. 10 ratas adulto falsamente lesionadas

Todos los animales fueron aislados en una caja con un ciclo de luz-oscuridad invertida de 12 horas debido a que estos animales son más activos durante la noche, por lo tanto las luces se apagaban las 10:00 am y se encendían a las 10 pm. La temperatura promedio de la pruebas fue de 22.2°C. Durante todo el experimento, los animales tuvieron acceso libre a agua y alimento. Las pruebas conductuales se realizaron rutinariamente entre 10:00 am y 3:00 pm.

Cada uno de los protocolos experimentales realizados durante el proyecto fue aprobado por el comité local de ética sobre experimentación animal siguiendo las regulaciones establecidas en la norma oficial mexicana para el uso y el cuidado de los animales de laboratorio “NOM-062-ZOO-1999” y las regulaciones del comité de ética de la asociación internacional para el estudio del dolor [31]. Todas las sesiones experimentales fueron grabadas y analizadas por un observador sin tener conocimiento de las condiciones del tratamiento.

3.2 LESIÓN NEONATAL EN HIPOCAMPO VENTRAL (LNHV)

Las lesiones en hipocampo ventral en neonatos fueron realizadas según lo descrito por Lipska y colaboradores (1992) [24]. Inicialmente, un grupo de machos neonatos con un peso entre 10-13 g fueron seleccionados para realizar la lesión entre los días 5 y 7. Las crías lesionadas-LNHV y las falsamente lesionadas (control) fueron

seleccionadas al azar. Durante el procedimiento los animales fueron anestesiados por hipotermia, para ello fueron colocados sobre hielo durante un tiempo máximo de 15 min. Posteriormente cada uno de los animales fue asegurado sobre la plataforma fija al instrumento estereotáxico de Kopf, se les realizó una incisión en la piel que cubre el cráneo y se procedió a realizar las lesiones bilaterales mediante la inyección de ácido iboténico (0.15 μ l/min durante 2 min) (Sigma, Toluca Méx.) en el caso de las crías lesionadas-LNHV (Grupos I y III) y sólo con PBS (0.15 μ l/min durante 2 min) para las ratas falsamente lesionadas (Grupos II y IV). Las coordenadas para realizar la inyección se localizan con ayuda de un estereotáxico y fueron las siguientes: -3.0 mm anteroposterior (AP), \pm 3.5 mm mediolateral (ML) y -5.0 mm dorsoventral (DV) respecto a bregma.

Los animales de los grupos I y II fueron sacrificados por decapitación a los 45 días, mientras que los animales de los grupos III y IV fueron sacrificados por decapitación a los 90 días. Las tres regiones cerebrales de interés (hipocampo, corteza prefrontal y núcleo accumbens) fueron extraídas y conservadas a -80 °C hasta la extracción del RNA total.

3.3 EXTRACCIÓN DE RNA

El RNA total fue extraído a partir de hipocampo, corteza prefrontal y núcleo accumbens de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1) El tejido congelado fue disgregado manualmente y las células fueron resuspendidas mediante un vigoroso vortex de 35 segundos en 1 mL de TRIZOL (Trizol® Reagent, Total RNA isolation reagent Life technologies). Posteriormente se les adicionó 200 μ l de cloroformo frío (-20 °C), se les dio un vórtex por 15 segundos y se les dejó reposar en hielo durante 5 minutos.
- 2) Transcurrido este tiempo las muestras se centrifugaron a 12 000 x g por 15 minutos a 4 °C, se extrajo la fase acuosa de cada muestra y se transfirió a otro tubo eppendorf al cual se le adicionaron 600 μ L de isopropanol. En esta etapa fue necesario invertir los tubos de 10 a 15 veces y se dejaron reposar en hielo durante 10 minutos.

- 3) Todos los tubos fueron centrifugados a 1200 x *g* por 10 minutos a 4 °C, el isopropanol fue decantado, se les adicionó 1 mL de etanol frío (-20 °C) al 75% preparado con agua-DEPC y se les dió un ligero vórtex por 10 segundos.
- 4) Finalmente fueron centrifugados a 7000 x *g* por 5 minutos a 4 °C. Se eliminó el exceso de alcohol y el botón de RNA presente en el fondo de los tubos fue resuspendido en 10µl de agua-DEPC.
- 5) La calidad del RNA extraído fue visualizada en geles de agarosa desnaturalizantes teñidos con bromuro de etidio. La concentración del RNA fue determinada mediante fluorometría y el uso de Ribogreen Quany-iT Assay (Invitrogen).

La síntesis de cDNA, la impresión de las matrices y los microarreglos en general se realizaron en colaboración con el Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) y el Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM. Los procedimientos se describen a continuación.

3.4 IMPRESIÓN DE LAS MATRICES

Se utilizaron cinco mil oligos de *Rattus norvegicus* (70-mer) de la biblioteca Operon oligo sets (http://www.operon.com/arrays/oligosets_overview.php) resuspendidos en una solución Micro spotting 50 µM (ArrayIt Brand Products).

Los portaobjetos de 25x75 mm (SuperAmine TeleChem Internacional INC), fueron impresos por duplicado y fijados a 80 ° C durante 4 horas. Para la pre-hibridación los portaobjetos se rehidrataron con vapor de agua a 60 °C y se fijaron con dos ciclos de luz UV (1200J). Después de hervirlos durante dos minutos a 92 °C, los portaobjetos se lavaron con etanol al 95% durante un minuto y se pre-hibridaron en soluciones de SSC 5X, SDS 0,1% y 1% de BSA durante una hora a 42 °C. Las láminas fueron lavadas y secadas antes del proceso de hibridación (procedimientos estándar del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM).

3.5 MARCAJE DEL cDNA E HIBRIDACIÓN DE LOS MICROARREGLOS DE DNA

En la misma reacción se sintetizó y se marcó el cDNA con los fluoróforos dUTP-Cy3 o dUTP-Cy5, mediante el kit CyScribe First-Strand cDNA (Amersham). Para ello se utilizó un total de 10 µg de RNA total (no se requiere aislar el mRNA). La incorporación de fluoróforo se analizó mediante el uso de la absorbancia a 555 nm para Cy3 y 655 nm para Cy5. Cantidades iguales de cDNA marcado fueron sometidas a hibridación en una solución UniHyb (TeleChem Internacional INC) sobre la matriz del microarreglo durante 14 horas a 42 °C.

Tabla 6. Características de los microarreglos de expresión.*

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

*Oligos fabricados por compañía Operon technologies USA.

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

3.6 LECTURA DEL MICROARREGLO

Los grupos experimentales I y III (ratas lesionadas LNHV) fueron marcadas con Cy5, mientras que los grupos experimentales II y IV o muestras control (ratas falsamente lesionadas) fueron marcadas con Cy3. Cada laminilla fue escaneada bajo 2 longitudes de onda (532 y 635 nm) en un escáner con microscopía confocal. En este equipo las moléculas Cy3 y Cy5 son excitadas mediante el uso de un láser, donde la fluorescencia emitida es capturada y transformada en una imagen que muestra los sitios de hibridación o reconocimiento específico de secuencias. Por cada uno de los microarreglos de expresión fueron obtenidas 2 imágenes, una para el fluoróforo Cy3 y

otra para el fluoróforo Cy5, en esta etapa se debe ajustar la intensidad del láser y la sensibilidad de los fotomultiplicadores de tal forma que ambas imágenes muestren valores de fluorescencia total similares.

Las imágenes escaneadas fueron procesadas en el lector Virtek Chip mediante el uso del Array Pro Analyzer software (Media Cybernetics). Este programa localiza a cada spot o punto sobre el microarreglo con ayuda de una trama programada (o retícula) y calcula la densidad promedio de cada una de estas señales, así como del área que rodea a cada spot. Una vez obtenida la imagen se debe considerar la aplicación de un filtro para depurar las pequeñas imperfecciones o señales no deseadas, posteriormente se genera una retícula en la que se definen las áreas que se van a cuantificar. Definida la retícula, se determina la zona de inclusión o exclusión y el área para calcular la señal de fondo de cada una de las imágenes tratando de eliminar los puntos que no mostraron una hibridación adecuada.

Definidos estos parámetros el programa calcula las intensidades medias (densidad de los pixeles en el área definida), dando como resultado una tabla con las coordenadas y los valores de las densidad tanto del fondo como de cada uno de los spots sobre el microarreglo. Todos los puntos y sus replicados técnicos son individualmente evaluados de acuerdo a algunos parámetros matemáticos que permiten discriminar niveles de variabilidad inaceptable. Los puntos que no cumplen con estos criterios son excluidos durante el análisis estadístico. La razón entre los niveles de fluorescencia emitida por Cy3 y Cy5 en cada spot o punto representa la expresión relativa de los transcritos de RNA que son comparados de manera competitiva sobre el microarreglo que está siendo analizado.

Después de realizar todas las operaciones, se agrega la descripción que existe para cada uno de los genes y se puede generar una base de datos que nos permita conocer la función, el proceso biológico y la localización celular, de cada uno de los genes que identificados en nuestro microarreglo que tienen un cambio en su expresión.

IV. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS

El análisis de la expresión de genes fue realizado mediante el uso de genArise (programa estadístico), desarrollado en la Unidad de Informática del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>). GenArise es una herramienta para el análisis de los datos de microarreglos de doble color, su objetivo es identificar cuáles genes se expresan de manera diferencial mediante el cálculo de una intensidad definida como puntuación z-score. Por medio de ecuaciones sencillas se obtienen valores que pueden ser visualizados en gráficas como la que se muestra a continuación (Figura 3).

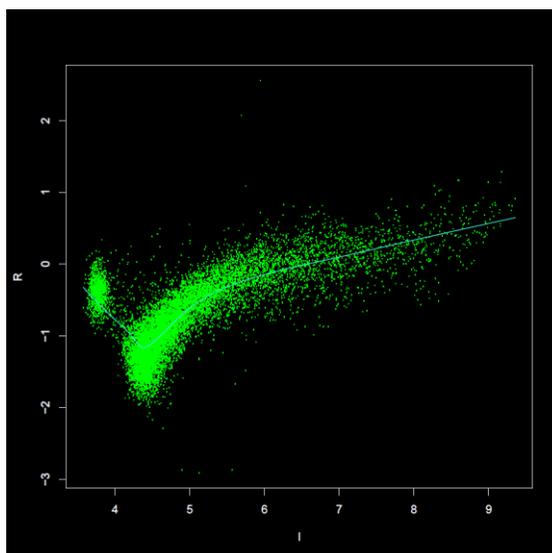


Figura 3. Representación gráfica de la expresión de genes obtenida a partir de datos no ajustados derivados de los microarreglos. Los valores se presentan sin ningún tipo de normalización o corrección, donde R es la diferencia de los logaritmos en base 2 (\log_2) de la intensidad luminosa entre Cy3 y Cy5, mientras que I es la suma en logaritmo base 10 (\log_{10}) de Cy3 y Cy5. La línea muestra la tendencia de expresión de los genes sobre el microarreglo.

Para la normalización y corrección de los resultados (figura 4), genArise lleva a cabo una serie de transformaciones como: corrección de ruido de fondo, filtro de intensidad, análisis y la selección de genes repetidos y expresados diferencialmente. Este programa utiliza un algoritmo para evaluar el grado de variación en la expresión génica (z_i), donde:

$$z_i = (R_i - \text{media}(R)) / \text{sd}(R)$$

z_i = número de desviaciones estándar por punto a partir de la media.

R_i = log-ratio para cada punto.

$\text{sd}(R)$ = desviación estándar del logaritmo de la razón.

En la ecuación anterior, z_i es el z-score para cada punto. Bajo este criterio los genes con un valor de z-score mayor a 2 desviaciones estándar fueron considerados como diferencialmente expresados. A partir del valor de z_i fue posible clasificar a los genes en dos categorías: 1) sin variación en su expresión (valores entre 1.5 y -1.5) y 2) con variación en su expresión (valores mayores a 1.5 y menores a -1.5).

Por lo tanto, los genes con valores de z_i mayores a 1.5 se consideraron sobre-expresados (aumentaron su expresión) y los genes con valores de z_i menores a -1.5 se consideraron sub-expresados (disminuyeron su expresión) (Figura 5).

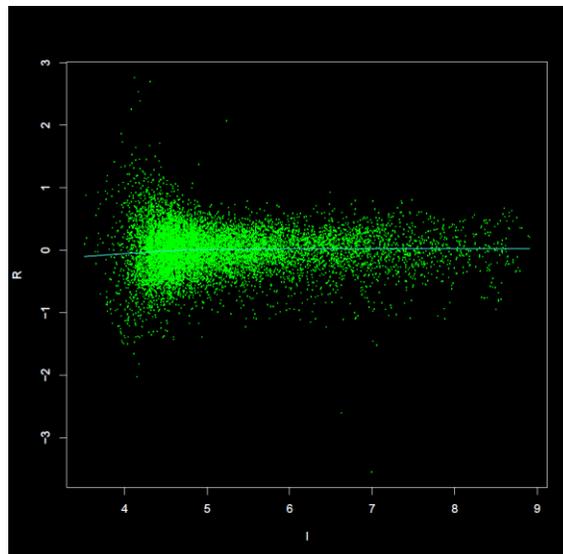


Figura 4. Representación gráfica de la expresión génica obtenida a partir de datos ajustados derivados de los microarreglos. Los valores se presentan normalizados y corregidos. La línea muestra la tendencia de la expresión de los genes sobre el microarreglo.

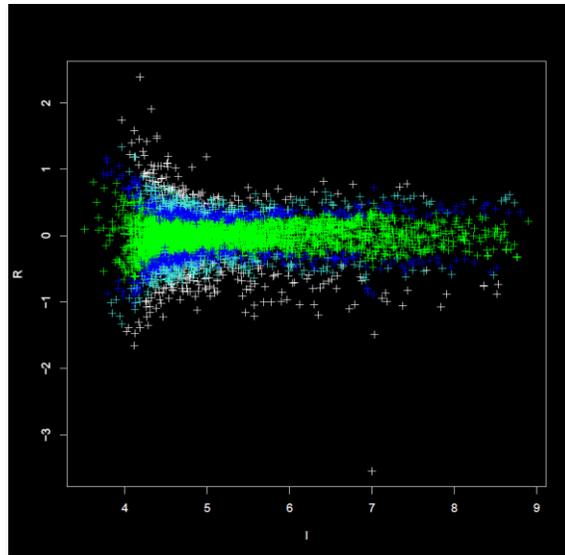


Figura 5. Representación gráfica de la expresión génica obtenida a partir de datos ajustados y agrupados en categorías de acuerdo con su nivel de expresión. Los puntos centrales (verdes) incluyen genes con un z-score entre 1 y -1. Los puntos en azul muestran genes con un z-score entre 1 a 1.5 ó -1 a -1.5. Los puntos en azul claro muestran genes con un z-score entre 1.5 a 2 ó -1.5 a -2. Los puntos blancos son genes con un nivel de expresión mayor a 2 o menor a -2.

Un total de 5000 genes fueron analizados mediante el software genArise, una vez que se normalizaron los datos, se identificaron un total de 652 genes que mostraron cambios significativos en su expresión (valores de $z_i > 1.5$ y < -1.5). De ellos un total de 316 se encuentran sobreexpresados (OE) y 336 subexpresados (DE).

En la tabla 7 se muestra el total de genes que mostraron cambios en su expresión en cada tratamiento, así como su respectivo porcentaje. Al comparar los porcentajes obtenidos entre los genes OE y DE en el grupo de ratas juveniles podemos apreciar que son muy similares, mientras que en el caso de las ratas adultas el porcentaje de genes DE es mayor que el porcentaje de genes OE. En general el porcentaje de genes que modificaron su expresión para cada área cerebral fue de $13\% \pm 0.38$.

Tabla 7. Número de genes con valores de z-score mayor a 1.5 y menor a -1.5 después de la normalización de los datos en el grupo de ratas juveniles y adultas.

	JUVENILES					ADULTOS				
	DE (n)	%	OE (n)	%	Total (%)	DE (n)	%	OE (n)	%	Total (%)
NÚCLEO ACCUMBENS	326	6.52	317	6.34	12.86	351	7.02	291	5.82	12.83
CORTEZA PREFRONTAL	362	7.24	302	6.04	13.28	372	7.44	310	6.20	13.64
HIPOCAMPO	321	6.42	329	6.58	13.00	351	7.02	333	6.66	13.68
SIN CAMBIO	3991	79.82	4052	81.04	60.86	3926	78.42	4066	81.32	59.84

Con la finalidad de evaluar las posibles rutas metabólicas que se podrían ver afectadas por la lesión, los genes que mostraron una expresión diferencial (valores de $z_i > 1.5$ y < -1.5) fueron identificados en la base de datos KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>). La base de datos KEGG es una herramienta muy útil en el mapeo de interacciones moleculares de genes, transcritos, proteínas y metabolitos involucrados principalmente en metabolismo y enfermedades humanas, entre otros procesos celulares, genéticos, etc. Con la información obtenida se realizó una lista con todas las rutas metabólicas afectadas. Los resultados se muestran en la Tabla 8. De manera muy general podemos ver que en el grupo de ratas adultas, un mayor número de rutas fueron afectadas por lesión en comparación con el grupo de ratas juveniles.

Tabla 8. Total de rutas metabólicas que podrían verse afectadas en cada tratamiento.*

	NÚCLEO ACCUMBENS		HIPOCAMPO		CORTEZA PREFRONTAL	
	JOVEN (n)	ADULTO (n)	JOVEN (n)	ADULTO (n)	JOVEN (n)	ADULTO (n)
Sobre-expresión	135	131	135	149	129	145
Sub-expresión	134	132	143	165	143	160

* n = número de rutas metabólicas afectadas por la lesión.

Entre las rutas con mayor número de alteraciones se encuentran: las interacciones neuroactivas ligando-receptor (> 10 genes), señalización de calcio (> 7 genes), vías de cáncer (> 7 genes) y las vías implicadas en procesos inmunológicos (> 7 genes). Cabe mencionar que hay genes que participan en 2 o más rutas. Las vías en las que participan un mayor número de genes (mayor a 5 genes) se muestran en la Figura 6.

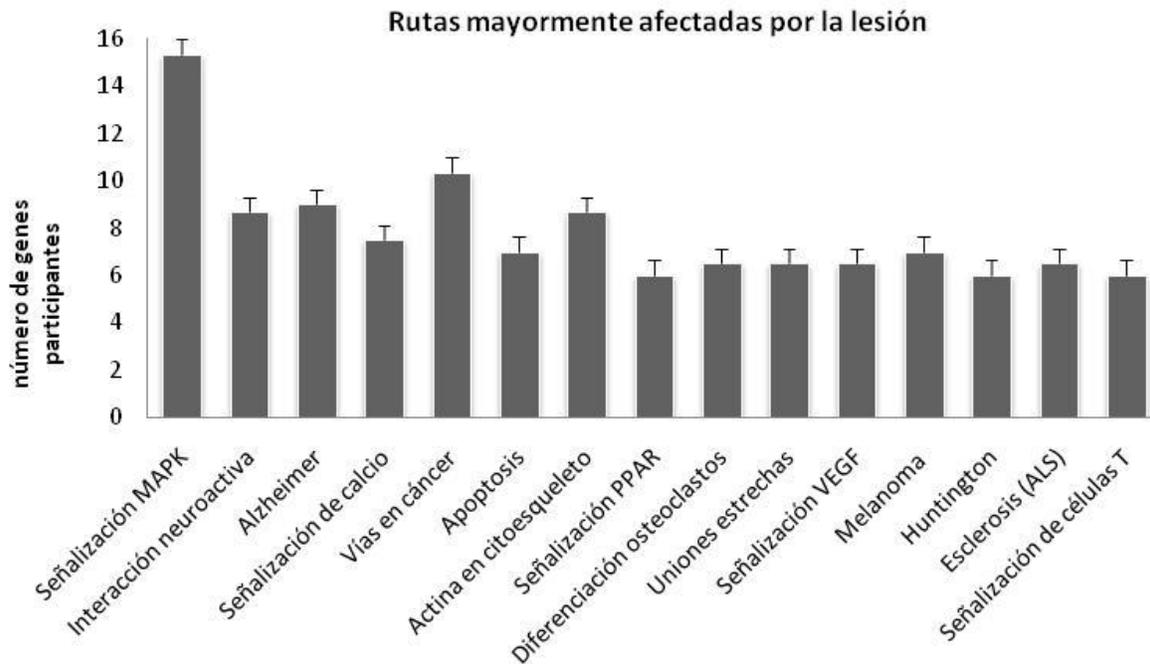


Figura 6. Rutas metabólicas con mayor número de genes diferencialmente expresados en las tres áreas cerebrales evaluadas (núcleo accumbens, corteza prefrontal e hipocampo).

Para un análisis más robusto de la expresión de los genes en cada tejido, se realizó un nuevo corte. Se trabajó con los genes con valores de z-score mayor a dos y menor a menos 2. Siguiendo el link de cada gen en la base de datos Rat Genome Database (RGD) se obtuvo el nombre y la descripción de cada uno de ellos. A continuación se enlista sólo un pequeño grupo de estos genes, ya que a pesar del nuevo corte el número de genes en el análisis sigue siendo elevado (Tablas 9 y 10).

Tabla 9. Genes sub-expresados de acuerdo a la base de datos Rat Genome Database

Id	Símbolo	Nombre del gen	Descripción	Ruta metabólica	z-score	Área cerebral
M80545	Cacnb2	Canal de calcio dependiente de voltaje, subunidad beta 2	Subunidad auxiliar en los canales de Ca(2+) tipo-L	Contracción de músculo cardiaco	-4.315	Hipocampo
NM_024358	Notch2	Notch homólogo 2 (Drosophila)	Proteína involucrada en las interacciones celulares que especifican el destino celular	Formación del eje dorso-ventral, señalización Notch	-4.159	Prefrontal
X15836	Ocm	Onco-modulina	Proteína de unión a calcio, expresión activa en una variedad de tumores	Vías de cáncer	-4.155	Accumbens e hipocampo
D26178	Ick	Cianina de células intestinales	Puede estar involucrada en la promoción de la meiosis durante la espermatogénesis	Proliferación de células epiteliales intestinales	-4.029	Accumbens y prefrontal
X72757	Cox6a1	Citocromo oxidasa C, subunidad VIa, polipéptido 1	Cataliza la transferencia de electrones del citocromo C, al oxígeno.	Huntington, Parkinson, Fosforilación oxidativa, Alzheimer	-3.954	Accumbens
NM_031656	Stx8	Sintaxina 8	Esencial para la fusión de membranas intracelulares	Interacción en transporte vesicular	-3.293	Accumbens y prefrontal
U03407	Pro1	Lacrima 1, rico en prolina	Apomucina de la glándula submandibular	Secreción salival humanos	-3.281	Hipocampo
NM_012816	Amacr	Alfa-metilacil-CoA racemasa	Enzima que convierte pristanoil-CoA y el ácido biliar C27-CoA al estereoisómero-(S)	Biosíntesis primaria de ácidos biliares, peroxisoma	-3.234	Prefrontal
D30666	FacI3	Acil-CoA sintetasa cadena larga, miembro de la familia 3	Cataliza la reacción inicial del metabolismo de los ácidos grasos para producir acil-CoA	Metabolismo de ácidos grasos, señalización de adiponectina	-3.170	Accumbens y prefrontal
NM_012598	Lpl	Lipoproteína lipasa	Lipasa que hidroliza triglicéridos; puede estar involucrada en el desarrollo de hipertrigliceridemias	Metabolismo triglicero-lípidos, Alzheimer, señalización PPAR	-3.136	Accumbens

Tabla 9. Continuación....

U40652	Ptprn	Proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo N	Involucrada en las vías de señalización mediadas por citocinas	Diabetes Mellitus tipo I	-3.101	Accumbens y prefrontal
NM_017019	Il1a	Interleucina alfa 1	Participa en la cicatrización de heridas, y en la biosíntesis de IL-6	Artritis reumatoide, interacción citocina-citocina	-2.887	Hipocampo
X13016	Cd48	Molécula Cd48	Participa en la activación de los mastocitos y la respuesta a <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Citotoxicidad mediada por células NK	-2.877	Accumbens y prefrontal
NM_080783	Gale	UDP-galactosa-4-epimerasa	Enzima con actividad de galactose-4 epimerasa	Metabolismo de galactosa, amino-azúcares y nucleótidos	-2.778	Hipocampo
	Chrna5	Receptor colinérgico nicotínico alfa 5	Receptor neuronal activado por acetilcolina; media la liberación de catecolaminas	Interacción neuroactiva ligando-receptor	-2.777	Accumbens
NM_017250	Htr2b	Receptor 2b para serotonina	Receptor de serotonina acoplado a proteínas G	Interacción neuroactiva ligando-receptor	-2.618	Prefrontal
NM_031007	Adcy2	Adenilato ciclasa 2 (cerebro)	Enzima que cataliza la formación del segundo mensajero AMP	Señalización de calcio	-2.451	Accumbens y prefrontal
NM_017069	Gabra3	Ácido gamma-aminobutírico (GABA) receptor A, alfa 3	Puede mediar respuestas inhibitorias GABA	Sinapsis gabaérgica	-2.241	Hipocampo y prefrontal
NM_012950	F2r	Receptor de factor de coagulación II (trombina)	Participa en la coagulación de la sangre, la respuesta inflamatoria y la proliferación celular.	Complemento y cascadas de coagulación	-2.122	Prefrontal
L11007	Cdk4	Cinasa dependiente de ciclina, 4	Regulador positivo del ciclo celular	Cáncer de páncreas	-2.100	Prefrontal

Tabla 10. Genes sobre-expresados de acuerdo a la base de datos Rat Genome Database

Id	Símbolo	Nombre del gen	Descripción	Ruta metabólica	z-score	Área cerebral
NM_031539	Cd8b	Molécula CD8b	Marcador para células T citotóxicas; participa en las interacciones célula-célula	Procesamiento y presentación de antígeno, moléculas de adhesión (CAMs)	4.393	Prefrontal
NM_017058	Vdr	Receptor de vitamina D	Envejecimiento, regulación del transporte de calcio	Apoptosis, reabsorción de calcio	3.918	Hipocampo
NM_012664	Syp	Sinaptofisina	Puede participar en la organización de las vesículas sinápticas	Plasticidad sináptica	3.799	Accumbens y prefrontal
NM_024359	Hif1a	Factor 1 inducible por hipoxia, subunidad alfa (factor de transcripción)	Regula la transcripción en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno	Vías de cáncer, carcinoma renal, señalización mTOR	3.774	Accumbens y prefrontal
NM_013222	Gfer	Factor de crecimiento aumentador de la regeneración hepática	Proteína que aumenta la regeneración del hígado	Ciclo celular, fosforilación oxidativa	3.681	Accumbens y prefrontal
NM_024130	Dctn1	Dinactina 1	Proteína con actividad de ATPasa que actúa como un motor de microtúbulos	Huntington, reabsorción de agua por ADH	3.378	Accumbens, prefrontal, e hipocampo
NM_012840	Cyct	Citocromo C, testículos	Citocromo C, expresado durante la espermatogénesis	Huntington, Parkinson, Alzheimer, apoptosis, señalización de p53	3.370	Hipocampo
NM_031152	Rab11a	RAB11a, miembro RAS de la familia de oncogenes	Proteína de unión a GTP	Reabsorción de agua por ADH, secreción pancreática	3.341	Accumbens y prefrontal
X54467	Ctsd	Catepsina D	Endopeptidasa lisosomal	Lisosoma	3.204	Accumbens
NM_012678	Tpm4	Tropomiosina 4	Participa en la estabilización de los filamentos de actina en el citoesqueleto	Contracción de músculo cardíaco, cardiomiopatía hipertrófica	3.175	Accumbens y prefrontal

Tabla 10. Continuación....

D50580	Loc192257	Carboxil-esterasa 2E	Hidroliza los ésteres de retinol, regula el suministro de los retinoides	Metabolismo de retinol	3.113	Accumbens e hipocampo
NM_130753	Fgf15	Factor de crecimiento fibroblástico 15	Implicado en el desarrollo embrionario, crecimiento celular, etc.	Vías de cáncer, melanoma, señalización MAPK	3.085	Hipocampo
NM_022525	Gpx3	Glutación peroxidasa 3	Proceso catabólico del peróxido de hidrógeno	Metabolismo de glutación y de ácido araquidónico	2.860	Prefrontal
U53184	Lifaf	Factor TNF inducido por lipo-polisacárido	Proteína de unión a ADN que puede mediar la expresión de TNF-alfa	Apoptosis	2.859	Hipocampo
NM_019157	Aqp7	Acuaporina 7	Transporte de fluidos durante espermato-génesis	Señalización PPAR	2.852	Hipocampo
L29232	Igf1r	Receptor 1, factor de crecimiento similar a insulina	Receptor de IGF-1, implicado en la inducción de la progresión del ciclo celular	Vías de cáncer, endocitosis, depresión a largo plazo	2.719	Accumbens y prefrontal
AF333983	Apb1	Proteína de unión a I precursor del beta-amiloide familia B, miembro 1	Proteína adaptadora localizada en el núcleo, que interactúa con la proteína precursora del beta amiloide (APP)	Alzheimer	2.715	Accumbens
X98234	Smstr2	Receptor de somatostatina 2	Media la señalización en respuesta al dolor térmico	Secresión gástrica, interacción neuroactiva ligando-receptor	2.708	Accumbens e hipocampo
NM_017325	Runx1	Factor de transcripción 1	Factor de transcripción, implicado en la regulación del gen muscular esquelético	Vías de cáncer, leucemia mieloide crónica	2.671	Accumbens e hipocampo
NM_022185	Pik3r2	Fosfoinositol cinasa 3, subunidad reguladora 2 (beta)	Subunidad reguladora de la enzima fostatidilinositol 3	Señalización de quimocinas, regulación de actina en el citoesqueleto	2.242	Hipocampo

Debido a que las bases de datos muestran diversas rutas metabólicas que podrían ser afectadas por la lesión y a que no todas están relacionadas directamente con el trastorno, sino que están asociadas con procesos metabólicos y comunicación celular, sólo se seleccionaron 15 rutas que posiblemente estén asociadas a trastornos mentales (Tabla 11). Las rutas de señalización de calcio e interacción neuroactiva ligando-receptor parecen tener una activa participación, al identificar frecuentemente genes involucrados en estas rutas.

Tabla 11. Rutas metabólicas y genes diferencialmente expresados que fueron asociados a trastornos mentales.

RUTA METABÓLICA	NÚCLEO ACCUMBENS		HIPOCAMPO		CORTEZA PREFRONTAL	
	JOVEN (n)	ADULTO (n)	JOVEN (n)	ADULTO (n)	JOVEN (n)	ADULTO (n)
Apoptosis	1	6	5	2	3	2
Ciclo celular	-	3	2	3	1	2
Citotoxicidad por NK	4	6	3	2	6	5
Depresión	1	3	1	2	-	3
Alzheimer	5	8	4	6	3	8
Huntington	2	5	4	6	2	4
Parkinson	1	1	3	2	3	4
Interacción neuroactiva*	11	9	6	11	5	12
Metabolismo Cyt-P450**	3	5	-	1	3	3
X. p/Cyt-P450***	1	3	-	1	1	1
Orientación de axón	4	4	3	3	3	4
Señalización Notch	1	2	1	1	1	2
Señalización de Ca ²⁺	5	6	6	7	7	14
Señalización de neurotrofina	3	4	2	2	4	1
Sinapsis glutamatérgica.	4	6	3	2	2	6

(n) = número de genes diferencialmente expresados

* Interacción neuroactiva ligando-receptor

** Metabolismo de drogas por Cyt-P450

*** Metabolismo de xenobióticos por Cyt-P450

Los genes sobre-expresados y sub-expresados se muestran en las Figuras 7 y 8. En estas gráficas podemos observar que mientras en la mayoría de las rutas hay genes OE y DE, en aquellas rutas involucradas en el metabolismo de drogas y xenobióticos por Cyt-P450 (grupos I y J) sólo se pudieron identificar genes DE en los tejidos de núcleo accumbens y corteza prefrontal, tanto en ratas juveniles como en ratas adultas. En el grupo juvenil el hipocampo fue la región con mayor número de genes sobre-expresados mientras que la presencia de genes sub-expresados fue escasa. En el caso de las rutas involucradas en el metabolismo de drogas y xenobióticos por Cyt-P450 no hubo cambio en los niveles de expresión (Figura 7).

JUVENILES (z-score >2y <-2)

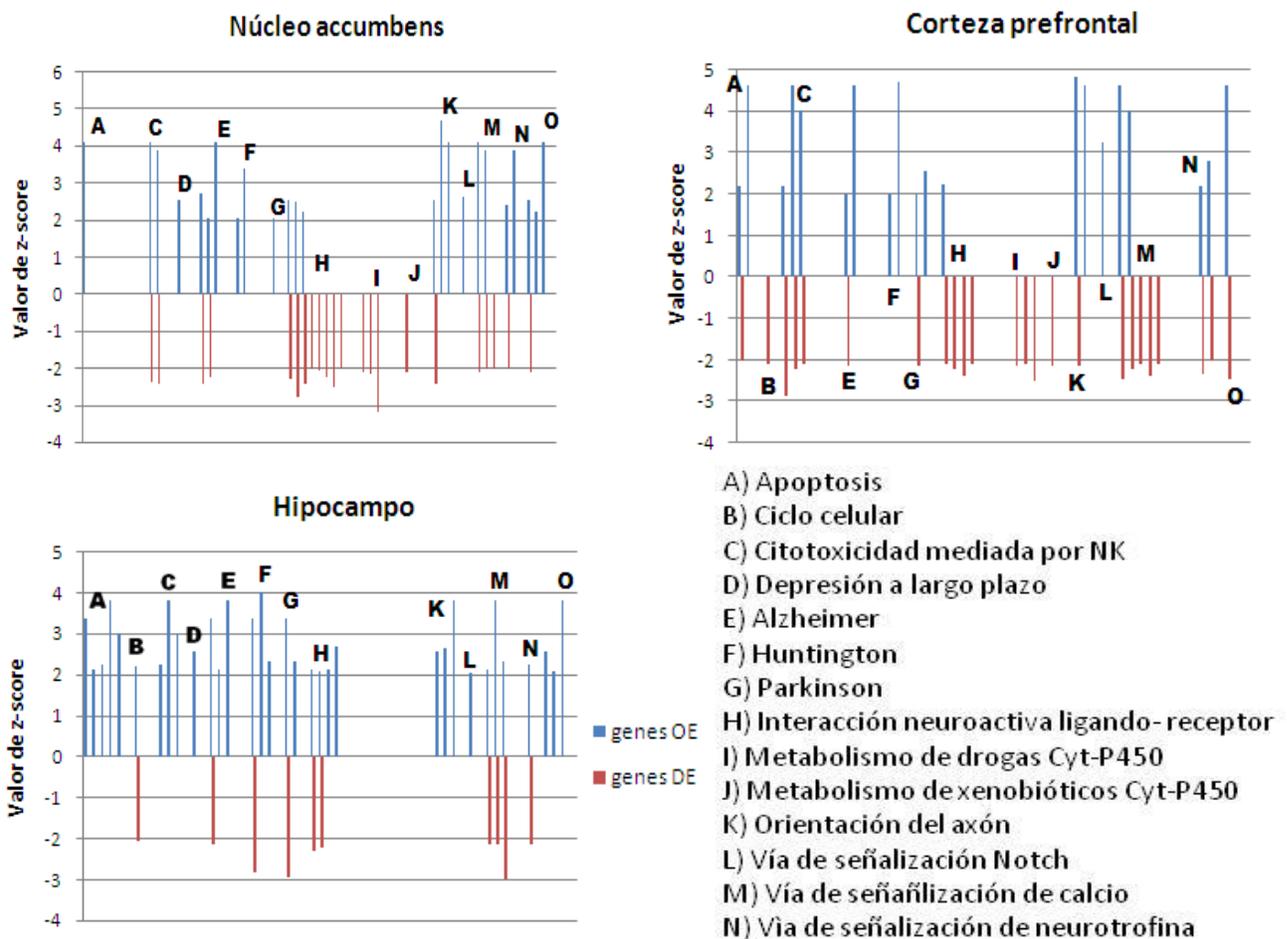


Figura 7. Rutas metabólicas de interés diferencialmente expresadas en el grupo de ratas juveniles. En azul se muestran los genes OE y en rojo los genes DE

Por otro lado en el grupo de ratas adultas un mayor número de genes se encuentran sub-expresados en las tres áreas de estudio, sobre todo en las rutas involucradas en el metabolismo de drogas y xenobióticos por Cyt-P450 e interacción neuroactiva ligando-receptor. Mientras la ruta de apoptosis presentó mayor número de genes DE en el núcleo accumbens, en comparación con la corteza prefrontal donde sólo hay un gen DE y en hipocampo donde no hay genes DE (Figura 8).

ADULTOS (z-score >2 y <-2)

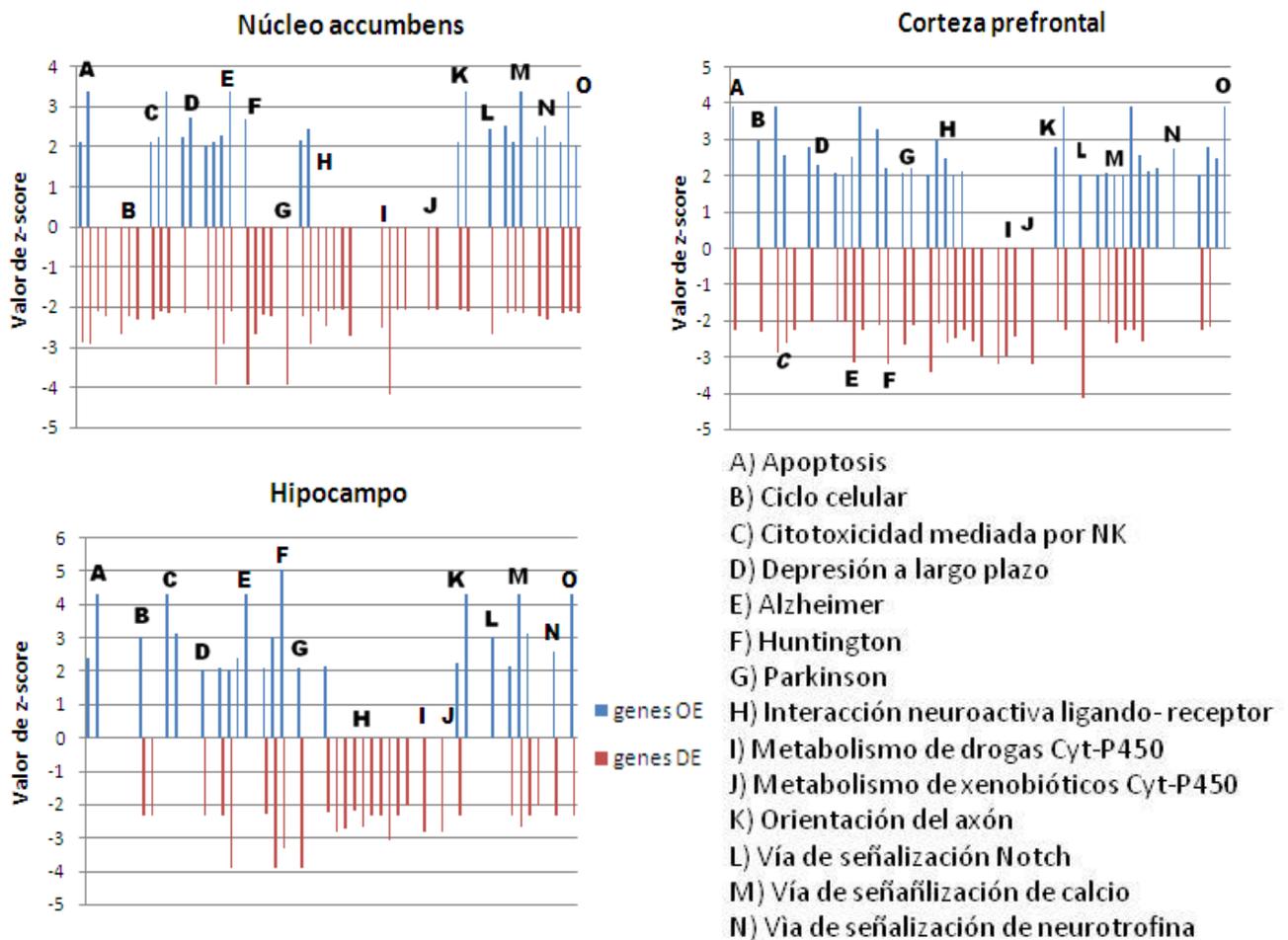


Figura 8. Rutas metabólicas de interés diferencialmente expresadas en el grupo de ratas adultas. Los genes OE se muestran en azul y los genes DE se muestran en rojo.

Debido a que un gen puede estar expresado en dos o más tejidos, los genes que cambiaron su expresión en más de una de las áreas cerebrales de estudio fueron

seleccionados. Este nuevo enfoque redujo significativamente el número de genes en nuestro análisis. En la Figura 9 se muestran los genes diferencialmente expresados en las rutas de interés y que coinciden en más de una de las áreas cerebrales de estudio.

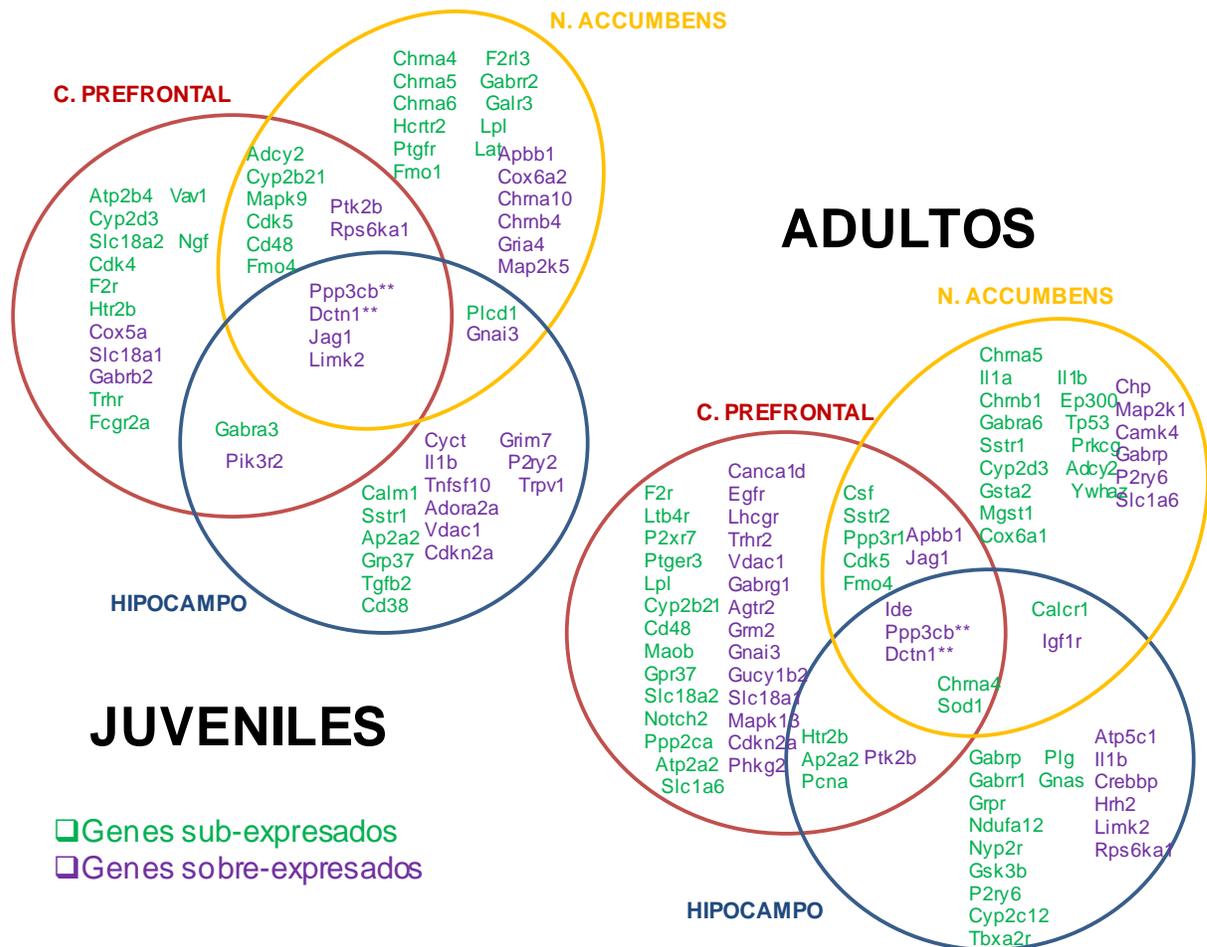


Figura 9. Genes diferencialmente expresados en las rutas de interés. Las intersecciones contienen los genes que cambiaron su expresión en más de una de las regiones evaluadas. En verde se muestran los genes sub-expresados y en morado los genes sobre-expresados.

En la Tabla 12 se incluyen sólo aquellos genes identificados en las intersecciones de la Figura 9 por grupo y región cerebral. En la columna NP (núcleo accumbens/corteza prefrontal) se observa un mayor número de genes DE que genes OE. Dos genes de esta columna; Fmo4 y Cdk5 se encuentran sub-expresados en ambos tejidos, tanto en el grupo juvenil como en adultos, mientras que para el grupo juveniles/DE no hay un gen común que se exprese en los tres tejidos (columna NPH). En las ratas adultas el

número de genes OE es menor que el número de genes DE. En ambos casos se identificaron genes que coinciden en más de un tejido. En la columna NPH (núcleo accumbens/corteza prefrontal/hipocampo) se encuentran dos genes comunes a las tres áreas cerebrales: Ppp3cb y Dctn1.

Tabla 12. Genes diferencialmente expresados e identificados en más de una región cerebral evaluada, para cada grupo experimental.

	NP	NH	PH	NPH
Juveniles / sub-expresados	Adcy2 Cyp2b21 Fmo4 Mapk9 Cdk5 Cd48	Plcd1	Gabra3	
Adultos /DE	Csf2 Sstr2 Ppp3r1 Cdk5 Fmo4	Calcr1	Htr2b Ap2a2 Pcna	Chrna4 Sod1
Juveniles/OE	Ptk2b Rps6ka1	Gnai3	Pik3r2	Ppp3cb Dctn1 Jag1 Limk2
Adultos /OE	Apbb1 Jag1	Igf1r	Ptk2b	Ide Ppp3cb Dctn1

Abreviaciones: núcleo accumbens (N), corteza prefrontal (P), hipocampo (H)

De acuerdo a los valores de z-score, su nivel de expresión en más de un tejido y su participación en las rutas de interés, este trabajo propone 7 genes cuyos cambios de expresión parecen estar altamente correlacionados con la esquizofrenia (Tabla 13).

Tabla 13. Lista de genes altamente relacionados con esquizofrenia.

Símbolo	Nombre	Descripción	Score A	Score P	Score H
Limk2	Cinasa 2 con dominio LIM	Las proteínas con dominios LIM están involucradas en diversos procesos de señalización celular como; la organización del citoesqueleto, la organogénesis, el ciclo celular	4.710	4.834	2.659
Ppp3cb	Proteína fosfatasa 3, subunidad catalítica, isoforma beta	Proteína fosfatasa dependiente de calmodulina; desfosforila factores nucleares de células T activadas, puede jugar un papel durante la atrofia del músculo esquelético.	4.130	4.600	3.846
Dctn1	Dinactina 1	Componente de los microtúbulos de dineína activada por ATPasa, que actúa como un motor de microtúbulos.	3.378	4.717	4.042
Jag1	Jagged 1	Ligando responsable de la activación del receptor Notch1. La señalización por medio de <i>notch</i> está involucrada en el desarrollo de la mayoría de los tejidos,	2.625	3.254	2.036
Ide	Enzima degradadora de insulina	Enzima involucrada en la degradación de péptidos bioactivos incluyendo insulina, beta-endorfina, péptido natriurético auricular y beta-amiloide.	2.292	2.531	2.052
Sod1	Superóxido dismutasa 1, soluble	Cataliza la conversión de superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, implicados en la respuesta al estrés oxidativo.	-2.193	-3.187	-3.301
Chrna4	Receptor colinérgico, nicotínico alfa-4	Pertenece a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando que juegan un papel en la transmisión rápida de las señales en las sinapsis	-2.909	-3.420	-2.814

Abreviaciones: Score-A, valor de z-score en núcleo accumbens, Score-P, valor de z-score en corteza prefrontal, Score-H, valor de z-score en hipocampo

V. DISCUSIÓN

5.1 DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó el transcriptoma de un modelo animal de esquizofrenia inducido por la lesión neonatal en hipocampo ventral en cuatro condiciones: jóvenes lesionados (LNHV), jóvenes falsamente lesionados, adultos lesionados (LNHV), adultos falsamente lesionados. Se identificaron 7 genes mediante sus valores de z-score, su nivel de expresión en más de una de las áreas cerebrales evaluadas y su participación en las rutas relacionadas a trastornos mentales. Estas características sugieren que dichos genes pudieran tener una potencial relevancia funcional en la esquizofrenia.

Debido a la gran cantidad de datos derivados de los microarreglos gran parte del análisis se limitó a genes con valores de z-score mayor a dos, y a un grupo de rutas metabólicas relacionadas con trastornos mentales. Dos de las rutas metabólicas más afectadas fueron, la vía de señalización de calcio e interacción neuroactiva ligando-receptor, por lo que, éstas vías podrían ser afectadas directamente por la lesión en el modelo animal de esquizofrenia. Por otro lado, en el grupo de ratas jóvenes se registro un mayor número de genes sobre-expresados, mientras que en las ratas adultas hubo un mayor número de genes sub-expresados, esto sugiere que posiblemente la lesión provocó apoptosis neuronal que no logra regenerarse y que está suprimiendo la expresión de muchos genes.

De los 7 genes candidatos, 5 de ellos se han asociado previamente con esquizofrenia, mientras que los dos genes restantes no han sido relacionados directamente con la enfermedad, de aquí la importancia de realizar estudios futuros en enfermedades complejas y en especial en la esquizofrenia, donde no han demostrado genes responsables. Con respecto a los genes previamente asociados con esquizofrenia, podemos sugerir que el modelo de la lesión neonatal en hipocampo ventral es un buen candidato como modelo animal para el estudio genómico de la enfermedad.

A continuación se hace una breve descripción de estos genes candidatos y su posible participación en la esquizofrenia.

La proteína codificada por el gen ***superóxido dismutasa 1 (Sod1)*** es una proteína mitocondrial responsable de la destrucción de los radicales libres superóxido en el cuerpo. Actúa como homodímero para convertir los radicales superóxido en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. Las mutaciones en este gen se han propuesto como causas de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), una enfermedad neurológica progresiva caracterizada por la degeneración gradual y muerte de las neuronas motoras (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6647>).

En algunos pacientes con esquizofrenia se han encontrado anomalías de membrana causadas por estrés oxidativo [11]. En nuestros resultados este gen se encuentra sub-expresado en adultos, por lo que una disminución de la enzima superóxido dismutasa puede aumentar la vulnerabilidad al daño neuronal por radicales libres, causando el estrés oxidativo que se presenta en los pacientes con esquizofrenia.

El gen ***Chrna4*** codifica al receptor ***colinérgico nicotínico alfa 4***, que se activa por el neurotransmisor acetilcolina y su agonista específico es la nicotina [32]. Pertenece a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando que juegan un papel importante en la transmisión rápida de las señales nerviosas en las sinapsis. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1137>).

Se ha sugerido que la disfunción colinérgica nicotínica puede contribuir al deterioro cognitivo en la esquizofrenia, mediando la liberación de dopamina. Por otro lado, los déficits neurocognitivos de la esquizofrenia pueden ser remediados temporalmente por la nicotina, por lo que se ha considerado a los genes de dos subtipos de receptores nicotínicos como candidatos asociados con esta enfermedad, el CHRNA4 y el CHRNB2. Estos dos subtipos de receptores nicotínicos han sido evaluados en población japonesa, aunque, no se encontró una asociación significativa de estos

genes en la esquizofrenia. En población canadiense se sugiere que la combinación de estos dos receptores puede tener relación con la enfermedad [33,34].

Otro de los genes es **Limk2**. Hasta la fecha se han descrito aproximadamente 40 proteínas eucariotas con dominios LIM, que se caracterizan por su alta conservación estructural abundante en cisteínas y por poseer dos estructuras tipo dedos de zinc. A pesar de que los dedos de zinc suelen funcionar mediante la unión a DNA o RNA, el motivo LIM probablemente media interacciones proteína-proteína (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3985>). Se ha visto que las proteínas con dominios LIM están involucradas en diversos procesos de señalización celular como; la organización del citoesqueleto, la organogénesis, el ciclo celular, la guía de los axones y que las mutaciones en los genes que codifican estos dominios contribuyen al desarrollo de diversas enfermedades [36].

No hay estudios previos que relacionen este gen con esquizofrenia. Sin embargo, se ha reportado que dos isoformas de esta proteína: LIMK2a y LIMK2b, participan en la regulación de actina en el citoesqueleto durante la diferenciación neuronal [46]. Por otro lado, se cree que LIMK2 es fosforilada y activada por las cinasas ROCK, activadas a su vez por las GTPasas Rho. De esta manera LIMK2 fosforila a la cofilina, proteína que evita la polimerización de actina y favorece la despolimerización necesarias para la motilidad celular [47]. El cambio en la expresión de Limk2 podría estar modificando la dinámica del citoesqueleto por fallas en la regulación de actina, lo que podría tener implicaciones en la migración neuronal durante el desarrollo temprano de las ratas del modelo.

El gen ***jagged 1*** codifica la proteína JAG1, homóloga humana de la proteína jagged de *Drosophila*. En humanos esta proteína es el ligando de Notch 1, un receptor transmembranal. Los miembros de la familia Notch son responsables de una variedad de procesos que tienen que ver con el desarrollo y el destino celular, pero ha sido mayormente estudiada en la producción de células nerviosas en *Drosophila*. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/182>). Específicamente, Notch 1, se activa antes de

nacer e induce la diferenciación glía-radial [22], pero después del nacimiento promueve la diferenciación de células progenitoras a células de sostén de tipo astroglia [22,23].

Kerns y colaboradores [35] analizaron varios genes asociados a ciclo celular, replicación de DNA y señalización notch (entre ellos *JAG1*) relacionados con un déficit de oligodendrocitos en el limbo posterior de la cápsula interna, en pacientes con esquizofrenia. La expresión de *JAG1* fue significativamente mayor y exhibió una correlación positiva con los mediadores canónicos de la vía Notch (esta vía tiene influencia sobre los precursores de los oligodendrocitos en proliferación y ciclo celular) [35]. En nuestros resultados, este gen también se encuentra sobre-expresado, pero sólo en las ratas jóvenes por lo que la vía Notch se activa posiblemente para promover la neurogénesis en respuesta al daño causado por la lesión neonatal, reactivándose de esta manera el desarrollo neuronal de los animales.

El gen que codifica la enzima degradadora de insulina (**IDE**) se encuentra en el cromosoma 10q23-q25, un locus del gen relacionado con la esquizofrenia. Este gen codifica una metalopeptidasa de zinc que degrada la insulina intracelular por lo que inhibe su actividad. Participa también en la señalización intercelular para degradar diversos péptidos como el glucagón, el beta-amilode, IGF-I e IGF-II y beta endorfina [37]. Las deficiencias en la función de esta proteína se asocian con la enfermedad de Alzheimer y la diabetes mellitus tipo 2, pero las mutaciones en este gen no han demostrado ser causantes de estas enfermedades. Mediante splicing alternativo se pueden generar varias isoformas de esta proteína (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3416>).

Berstenin y colaboradores [38] estudiaron la expresión de la proteína IDE en cerebros *postmortem* de pacientes con esquizofrenia tratados con haloperidol. Encontraron una reducción significativa en su expresión en comparación con los controles, por lo que sugieren que el haloperidol podría ejercer algún efecto a través de cambios en los niveles de expresión de sus sustratos, IGF-I y II, insulina y beta-endorfina [38]. En

nuestro modelo el gen se encuentra sobre-expresado, esta diferencia podría deberse al tratamiento con haloperidol. Además, el estudio anterior se realizó en pacientes *postmortem* y en este trabajo se utilizó un modelo animal. Lo cierto es que el cambio en la expresión este gen, puede estar alterando las cascadas de señalización de insulina observadas en la esquizofrenia.

El gen de dinactina (***Dctn1***) codifica la subunidad mayor de dinactina (p150), un complejo macromolecular que consta de 10 polipéptidos. El transporte relacionado con la dineína requiere la presencia del complejo de dinactina y la unión a microtúbulos. El complejo macromolecular de dinactina está involucrado en una gran variedad de funciones celulares, incluido el transporte de RE-a-Golgi, el movimiento centrípeto de los lisosomas y los endosomas, la formación del huso, el movimiento de los cromosomas y la axonogénesis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1639>).

Se ha reportado la participación de esta proteína en enfermedades neurodegenerativas como: la enfermedad de Huntington y (EH) y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA). La EH es una enfermedad hereditaria causada por la expansión de una repetición de poliglutaminas en la proteína huntingtina (Htt). La HAP1 es una proteína que se asocia a la Htt e interactúa además, con la subunidad p150 de dinactina formando un complejo macromolecular que se une a microtúbulos [43]. Se ha visto que la interrupción de esta función podría contribuir a la disfunción y muerte neuronal observada en la EH [44]. Por otro lado, en la ELA varios estudios apuntan a que las deficiencias en el transporte axonal mediado por el complejo dineína/dinactina-1 en las neuronas motoras pueden jugar un papel importante en la degeneración de dichas neuronas [45].

Más recientemente, se ha mostrado que la expresión del gen de la *dinactina* aumenta en sujetos que sufren episodios de delirios y alucinaciones, por lo que se ha propuesto como un biomarcador de síntomas psicóticos [41]. En nuestro modelo el gen de la dinactina se encuentra sobre-expresado, por lo que podría estar interfiriendo con el transporte vesicular sobre los microtúbulos, sobre todo en el transporte axonal

retrógrado mediado por dineína, ocasionando una secreción y endocitosis anormal de las neuronas, lo que podría conducir a apoptosis.

Finalmente, el gen **proteína fosfatasa 3, subunidad catalítica, isoforma beta (*Ppp3cb*)** codifica una fosfatasa dependiente de calmodulina (CALM). La calcineurina (CN) PPP3CB, también llamada proteína fosfatasa 2B, es un heterodímero dependiente de Ca^{2+} y calmodulina, la función catalítica esta dada por la subunidad A (CNA) y la función reguladora de unión a calcio esta dada por la subunidad B (CNB). Un experimento con ratas genéticamente modificadas incapaces de producir calcineurina mostraron síntomas similares a los humanos con esquizofrenia: deterioro en la memoria de trabajo, déficit de atención, conducta social anómala y otras anomalías severas características de esta enfermedad [39]. En nuestros resultados este gen se encuentra sobre-expresado, sin embargo, la calmodulina se encuentra sub-expresada por lo que la CN no puede ser activada ya que depende de calmodulina, esto de algún modo es similar a lo que ocurre en los animales knockout para CN.

La calcineurina también es responsable de la activación de la transcripción de la interleucina-2 (IL-2), una proteína responsable de la estimulación del crecimiento y diferenciación de los linfocitos T. En un modelo animal, se ha encontrado que el haloperidol aumenta la inducción de IL-2, por lo que este trabajo plantea la posibilidad de que los fármacos antipsicóticos pueden ejercer sus efectos, al menos en parte, mediante la modulación de la señalización de la calcineurina [39]. Por otra parte un estudio del genoma en familias taiwanesas con esquizofrenia sugirió la vinculación del locus 10q22.3 con la enfermedad. Entre los genes propuestos como candidatos para esquizofrenia en esta región se encuentran; ANXA7, DNAJC9, ZMYND17 y PPP3CB, esta asociación es relevante especialmente en pacientes con esquizofrenia que presentaron déficit de atención [40].

5.2 VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE CALCIO Y GENES MODULADOS POR LA LNHV.

A continuación se muestra la vía de señalización de calcio que fue una de las más afectadas por la lesión, con algunos de los genes alterados, incluido Ppp3cb que codifica la subunidad catalítica CNA. También se explica más a detalle la posible interacción de estos genes alterados en el desarrollo de la esquizofrenia (Figura 10). Los genes marcados en color rosa, presentaron cambios en la expresión aunque el gen Ppp3cb fue el más significativo, por lo que se marca en color rojo.

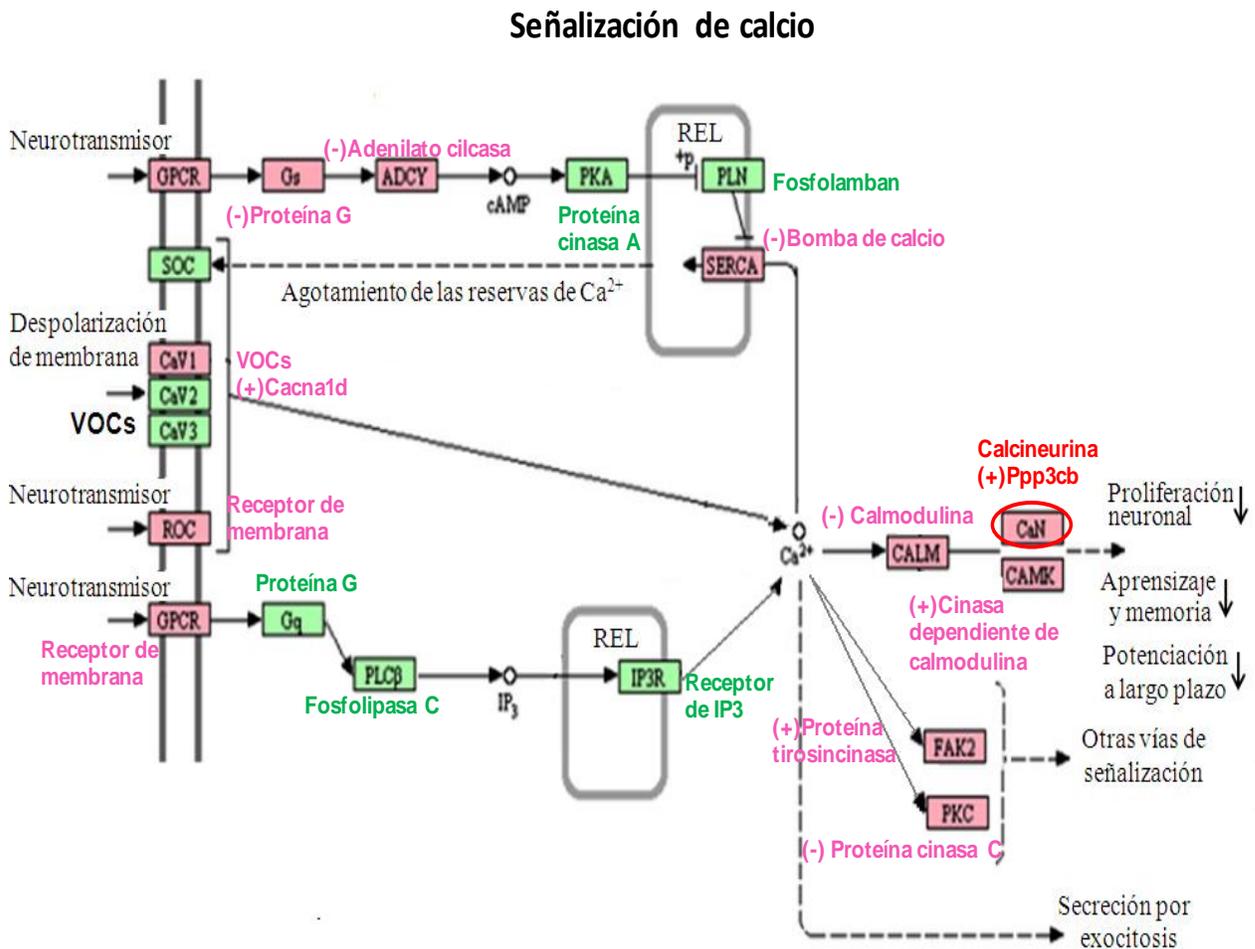


Figura 10. Vía de señalización de calcio. Posible interacción de genes afectados por la lesión. En verde se muestran los genes que NO modificaron su expresión. En rosa se marcan los genes que SI modificaron su expresión. El símbolo (+) indica que ese gen se esta sobre-expresando. El símbolo (-) indica que ese gen se esta sub-expresando. Esquema modificado de http://www.genome.jp/keggbin/show_pathway?13328-9304216599/rno-04020.args.

La entrada de Ca^{2+} exterior a la célula, es impulsada por la activación de diversos canales de calcio. Los canales dependientes de voltaje (VOCs) se encuentran en las células excitables y generan el flujo rápido de Ca^{2+} al interior de las células, impulsado por la presencia de un gradiente electroquímico. Por ejemplo, la elevación de la concentración de Ca^{2+} en una neurona presináptica permite que las vesículas que contienen los neurotransmisores se fusionen con la membrana plasmática. La fusión de las vesículas sinápticas hace que su contenido sea liberado en la hendidura sináptica mediante un proceso llamado exocitosis. Un canal de este tipo es codificado por el gen *Cacna1d* (Figura 10). Luego de la exocitosis, los neurotransmisores difunden en toda la hendidura sináptica y se unen a receptores específicos sobre la membrana de la neurona postsináptica activando otro tipo de canales, los canales activados por receptor (ROC) como el NMDA que responde al glutamato.

Otra fuente de calcio son las reservas internas que se encuentran principalmente en el retículo endoplasmático liso (REL). Varios segundos mensajero o moduladores controlan la liberación de este ion mediante una cascada de señalización. En este caso el receptor de membrana transmite la información a través de la membrana plasmática hacia el interior de la célula, por medio de una proteína transductora, la proteína G. Estas proteínas G (Gs y Gq) activadas por la unión de guanosa trifosfato (GTP) provocan la activación de una enzima amplificadora.

Existen dos rutas principales de transmisión por medio de segundos mensajeros. La primera vía utiliza como segundo mensajero al adenosin monofosfato cíclico (AMPC). El AMPC es generado por la enzima amplificadora adenilato ciclasa (ADC) que convierte el ATP en AMPC. Este AMPC puede unirse a un sitio regulador de una proteincinasa específica denominada proteincinasa A (PKA). La proteincinasa inicia una cascada de fosforilaciones que determinan las respuestas celulares específicas de cada tipo celular. La segunda vía utiliza la enzima amplificadora fosfolipasa C (PLC) que genera el inositol trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG) a partir del fosfolípido de membrana el fosfatidil inositol difosfato (PIP₂). El IP_3 provoca la liberación del Ca^{2+} del REL hacia el citosol activando los receptores IP_3R (Figura 10).

Cualquiera de las vías mencionadas anteriormente provoca un aumento en la concentración de Ca^{2+} citoplasmático y los genes que controlan el aumento de este ion intracelularmente están alterados en nuestro modelo. Por un lado, uno de los VOCs se está sobre-expresando permitiendo la constante entrada de calcio. Por otro lado, aunque la vía del AMPc no contribuye de manera importante al aumento de Ca^{2+} intracelular puesto dos genes involucrados se están sub-expresando (Gs y ADCY), la vía del IP3 si contribuye al aumento de este ion en el citosol, además las reservas de Ca^{2+} del REL no pueden ser renovadas puesto que la bomba de calcio SERCA que permite la entrada de este ion nuevamente al REL está sub-expresada, por lo que el Ca^{2+} que sale del REL no puede regenerarse. Esto aumenta considerablemente la concentración de Ca^{2+} intracelular incrementando también la actividad de las proteínas dependientes de calcio como la proteincinasa C (PKC) o a la proteína tirosincinasa 2 (FAK2) que actúan sobre varias vías de señalización.

El calcio puede también unirse a CALM, provocando un cambio conformacional en esta proteína y activándola, de esta manera el complejo calcio-calmodulina se une a otras proteínas como CAMK y CN para activarlas y desencadenar otras vías de señalización. La calcineurina por ejemplo, está implicada en las vías de señalización de los receptores NMDA y dopamina. En nuestro caso, aunque existe un exceso de Ca^{2+} y un exceso de la forma activa de la CN (Ppp3cb), la calmodulina se esta regulando a la baja, por lo que su unión a CN y la consecuente activación de esta última podría también estar disminuida. Ocasionando la disminución en la proliferación neuronal, en el aprendizaje y la memoria y en la potenciación a largo plazo, como los que se han observado en pacientes con esquizofrenia.

VI. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSIONES

- A partir de los cambios en el transcriptoma de tres áreas cerebrales, inducidos por la lesión neonatal en hipocampo ventral en un modelo animal de esquizofrenia, se identificaron 7 genes candidatos que podrían estar relacionados con la etología de la esquizofrenia. Dos de ellos, *Sod1* y *Chrna4* están sub-expresados. Los 5 restantes: *Ppp3cb*, *Dctn1*, *Ide*, *Limk2* y *Jag1*, se encontraron sobre-expresados.
- La comparación entre las ratas del grupo juvenil de 45 días y las ratas adultas de 90 días, permitió evaluar los cambios en el perfil de expresión de genes, que pueden ser relevantes en la aparición los primeros síntomas psicóticos de la enfermedad, que se presentan posterior a la pubertad.
- Cuatro de los genes propuestos como candidatos, podrían ser de utilidad como marcadores genéticos. Los genes ***Ppp3cb* y *Dctn1*** que se sobre-expresaron tanto en jóvenes como en adultos, serían de gran utilidad como marcadores moleculares predictivos en etapas tempranas durante el desarrollo de la esquizofrenia, sobre todo en familias con antecedentes de enfermedades psiquiátricas. Los genes ***Sod1* y *Chrna4*** que se encuentran sub-expresados sólo en adultos. En combinación con los dos anteriores pudieran funcionar como marcadores genéticos en el diagnóstico, para cuando comienzan a manifestarse los primeros síntomas de la esquizofrenia.
- De acuerdo con la correlación positiva entre los genes previamente relacionados con esquizofrenia y los obtenidos en este trabajo mediante microarreglos podemos concluir que el modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral es un buen candidato para el estudio genómico de la enfermedad.

- Dada la alta relación de los genes aquí propuestos con la esquizofrenia, es necesario investigar más a fondo la posible implicación en el desarrollo de este trastorno.

6.2 PERSPECTIVAS

- Validar los resultados de la expresión (mRNA) de estos genes, mediante la técnica de PCR en tiempo real.
- Analizar la expresión de las proteínas de los genes candidatos propuestos.

REFERENCIAS

1. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, cuarta edición (DSM-IV). Asociación Americana de Psiquiatría 1994, pp 486-493
2. Schizophrenia. Core interventions in the treatment and management of schizophrenia in primary and secondary care. National Clinical Practice Guideline No. 82. London 2009, pp 17-22, 25-29.
3. Quintero J, Barbudo del Cura E, López-Ibor MI, López-Ibor JJ, (2011). La evolución del concepto de esquizofrenia resistente al tratamiento. *Actas Esp Psiquiatr*, 39(4):236-50.
4. Enfermería de salud mental y psiquiátrica. Assumpta Rigol Cuadra, Mercedes Ugalde Apalategui, María Dolores Miguel. Elsevier, España, 2ª edición, 2007, pp. 374-385.
5. Farmacología básica y clínica. Katzung Bertram G. Editorial El Manual Moderno. México D.F. 1996, pp. 510, 511, 525-531.
6. Principios de Farmacología. Conn Michael, Gebharth G. F. Editorial El Manual Moderno. México D.F. 1991, pp. 350-362.
7. Cardno AG, Marshall J, Coid B, Macdonald A, Ribchester T, Davies N, Venturi P, Jones LA, Lewis SW, Sham PC, Gottesman II, Farmer AE, McGuffin P, Reveley AM, Murray RM. (1999). Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Arch Gen Psychiatry*, 56(2):162-168.
8. O'Donovan MC, Williams NM, Owen MJ, (2003). Recent advances in the genetics of schizophrenia. *Hum Mol Genet*, 12(2):125–133
9. Goldman AL, Pezawas L, Doz P, Mattay VS, Fischl B, Verchinski BA, Chen Q, Weinberger DR, Meyer-Lindenberg A, (2009). Widespread reductions of cortical thickness in schizophrenia and spectrum disorders and evidence of heritability. *Arch Gen Psychiatry*, 66(5): 467–477
10. Khaitovich P, Lockstone HE, Wayland MT, Tsang TM, Jayatilaka SD, Guo AJ, Zhou J, Somel M, Harris LW, Holmes E, (2008). Metabolic changes in schizophrenia and human brain evolution. *Genome Biol*, 9(8):R124.
11. García-Valencia J, Miranda AL, López-Jaramillo CA, Palacio-Acosta CA, Gómez-Franco J, Opsina-Duque J, (2005). Esquizofrenia y neurodesarrollo. *Revista colombiana de psiquiatría*, 34(01), 63-76.
12. Howes OD, Kapur S, (2009). The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. *Schizophr Bull*, 35(3):549-562.

13. Sakumoto N, Kondo T, Mihara K, Suzuki A, Yasui-Furukori N, (2007). Dopamine D2 receptor gene polymorphisms predict well the response to dopamine antagonists at therapeutic dosages in patients with schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci*, 61(2):174-180.
14. Lin CH, Lane HY, Tsai GE, (2011). Glutamate signaling in the pathophysiology and therapy of schizophrenia. *Pharmacol Biochem Behav.*, 100(4):665-77
15. Guo X, Hamilton PJ, Reish NJ, Sweatt JD, Miller CA, Rumbaugh G, (2009). Reduced expression of the NMDA receptor-interacting protein SynGAP causes behavioral abnormalities that model symptoms of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 34(7):1659-1672.
16. Gonzalez-Burgos G, Lewis DA, (2008). GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull*, 34(5):944–961.
17. Charych EI, Liu F, Moss SJ, Brandon NJ, (2009). GABA(A) receptors and their associated proteins: implications in the etiology and treatment of schizophrenia and related disorders. *Neuropharmacology*, 57(5-6):481-495.
18. Adams W, van den Buuse M, (2011). Hippocampal serotonin depletion facilitates the enhancement of prepulse inhibition by risperidone: Possible role of 5-HT(2C) receptors in the dorsal hippocampus. *Neuropharmacology*, 61(3):458-467.
19. Neurociencia: la exploración del cerebro. Bear Mark F., Barry W. Connors, Michael Paradiso. Editorial Lippincott Williams and Wilkins. 2a edición, Barcelona, España 2002, pp 647-658.
20. Tratado de Fisiología Médica. Guyton Arthur, Hall John. Mc Graw Hill Interamericana, décima edición, 2001. pp:820-827, 838-839
21. Neuroanatomía Clínica. Mario A. Patestas, Leslie P. Gartner. Editorial El manual moderno, primera edición 2008. pp:195, 341-350
22. Sams-Dodd F, Lipska BK, Weinberger DR, (1997). Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. *Psychopharmacology*, 132:303-310
23. Genis AD, Lopéz-Rubalcava C, (2011). ¿Es posible modelar esquizofrenia en un modelo animal? *El residente*, 6(2):120-126
24. Lipska BK, Jaskiw GE, Chrapusta S, Karoum F, Weinberger DR, (1992). Ibotenic acid lesion of the ventral hippocampus differentially affects dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens and prefrontal cortex in the rat. *Brain Res*, 585(1-2):1-6.

25. Chambers RA, Moore J, McEvoy JP, Levin ED, (1996). Cognitive effects of neonatal hippocampal lesions in a rat model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 15(6):587-594.
26. Wood GK, Lipska BK, Weinberger DR, (1997). Behavioral changes in rats with early ventral hippocampal damage vary with age at damage. *Brain Res Dev Brain Res*, 101(1-2):17-25.
27. López M, Mallorquín P, Vega M, (2002). Microarrays y biochips de ADN, Informe de Vigilancia Tecnológica. Genoma España. pp 8-21, 31-33.
28. Cano-Gutiérrez C. (2010). Extracción de conocimiento de microarrays y literatura biomédica para el estudio de la regulación genética. Tesis de Doctorado. Univerisdad de Granda.
29. Lastra G, Manrique C, (2005). Microarreglos: herramienta para el conocimiento de las enfermedades. *Revista colombiana de reumatología*, 12(3):263-267
30. Wong A, Lipska BK, Likhodi O, Boffa E, Weinberger DR, Kennedy JL, (2005). Cortical gene expression in the neonatal ventral-hippocampal lesion rat model. *Schizophr Res*, 77:261–270
31. Zimmermann M. (1987). Ethical principles for the maintenance and use of animals in neuroscience research. *Neurosci Lett*, 2;73(1):1.
32. López-Valdés H, García-Colunga J, (2003). La participación de los receptores de acetilcolina nicotínicos en trastornos del sistema nervioso central. *Salud mental*, 26(3), 66-72
33. Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K, (2008). Genetic association analysis of tagging SNPs in alpha4 and beta2 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptor genes (CHRNA4 and CHRNB2) with schizophrenia in the Japanese population. *J Neural Transm*, 115(10):1457-6
34. De Luca V, Voineskos S, Wong G, Kennedy JL, (2006). Genetic interaction between alpha4 and beta2 subunits of high affinity nicotinic receptor: analysis in schizophrenia. *Exp Brain Res.*,174(2):292-6.
35. Kerns D, Vong GS., Barley K, Dracheva S, Katsel P, Casaccia P, (2010). Gene expression abnormalities and oligodendrocyte deficits in the internal capsule in schizophrenia. *Schizophr Res*, 120(1-3):150-8.
36. te Velthuis Aartjan J.W. and Bagowski CP, (2007). PDZ and LIM Domain–Encoding Genes:Molecular Interactions and their Role in Development. Review Article, *ScientificWorldJournal*, 7: 1470–1492

37. Qiu WQ, Folstein MF, (2006). Insulin, insulin-degrading enzyme and amyloid-beta peptide in Alzheimer's disease: review and hypothesis. *Neurobiol Aging*, 27(2):190-8
38. Bernstein HG, Ernst T, Lendeckel U, Bukowska A, Ansorge S, Stauch R, (2009). Reduced neuronal expression of insulin-degrading enzyme in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with haloperidol-treated, chronic schizophrenia. *J Psychiatry Res*, 43(13):1095-105
39. Miyakawa T, Leiter LM., Gerber DJ, Gainetdinov RR, Sotnikova TD, Zeng H, Caron MG, Tonegawa S, (2003). Conditional calcineurin cexhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(15):8987-92.
40. Liu CM, Fann CS, Chen CY, Liu YL, Oyang YJ, Yang WC, (2011). ANXA7, PPP3CB, DNAJC9 and ZMYND17 genes at chromosome 10q22 associated with the subgroup of Schizophrenia with deficits in attention and executive function. *Biol Psychiatry*, 70(1):51-58
41. Kurian SM, Le-Niculescu H, Patel SD, Bertram D, Davis J, Dike C, (2011) Identification of blood biomarkers for psychosis using convergent functional genomics. *Mol Psychiatry*,. 16, 37–58
42. Bales CB, Kamath BM, Munoz PS, Nguyen A, Piccoli DA, Spinner NB, Horn D, Shults J, Grimberg A, Loomes KM, (2010). Pathologic lower extremity fractures in children with Alagille syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 51(1): 66–70
43. Engelender S, Sharp AH, Colomer V, Tokito MK, Lanahan A, Worley P, Holzbaur EL, Ross CA. (1997). Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Hum Mol Genet*, 6(13):2205-12.
44. Li SH, Gutekunst CA, Hersch SM, Li XJ. (1998). Interaction of Huntingtin-Associated Protein with Dynactin P150Glued. *J Neurosci*, 15;18(4):1261-9.
45. Ikenaka K, Katsuno M, Kawai K, Ishigaki S, Tanaka F, Sobue G. (2012). Disruption of axonal transport in motor neuron diseases. *Int J Mol Sci*, 2012;13(1):1225-38.
46. Tastet J, Vourc'h P, Laumonnier F, Vallée B, Michelle C, Duittoz A, Bénédicti H, Andres CR, (2012). LIMK2d, a truncated isoform of Lim kinase 2 regulates neurite growth in absence of the LIM kinase domain. *Biochem Biophys Res Commu.*, 420(2):247-52.
47. Croft D, Crighton D, Samuel M, Lourenco F, Munro J, Wood J, Bensaad K, Vousden K, Sansom O, Ryan K, Olson M, (2011). p53-mediated transcriptional regulation and activation of the actin cytoskeleton regulatory RhoC to LIMK2 signaling pathway promotes cell survival. *Cell Res*, 21(4): 666–682.