



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

**CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR NICOTÍNICO ALFA7 EN
EL MODELO EXPERIMENTAL DE ESQUIZOFRENIA DE LESIÓN
NEONATAL DEL HIPOCAMPO VENTRAL**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

ALINE OSTOS VALVERDE

TUTOR:

**DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

COMITÉ TUTOR:

**DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM**

**DRA. MAGDALENA GIORDANO NOYOLA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

PÁGINA DE FIRMAS

RESUMEN

Cambios en la expresión del receptor nicotínico $\alpha 7$ en el modelo experimental de esquizofrenia de lesión neonatal del hipocampo ventral.

La esquizofrenia es un trastorno neuropsiquiátrico crónico e incapacitante. La sintomatología es heterogénea e incluye a los síntomas psicóticos, los síntomas negativos y deficiencias en cognición. El modelo de esquizofrenia de lesión neonatal del hipocampo ventral (NVHL) ha sido ampliamente validado, tanto por estudios conductuales como neurobiológicos. En este modelo se ha validado la participación de la nicotina restaurando o preservando la morfología de las neuronas corticales ante alteraciones morfológicas en las neuronas granulares del hipocampo y neuronas piramidales de la corteza en ratas NVHL. Los efectos descritos podrían ser mediados por el receptor nicotínico $\alpha 7$, el cual es altamente sensible a la nicotina y está asociado a una mayor susceptibilidad para presentar el trastorno, así como con el mantenimiento del tabaquismo en pacientes con esquizofrenia. Es por esto que el objetivo de este trabajo fue evaluar el nivel de expresión del receptor nicotínico $\alpha 7$ en ratas NVHL tratadas con nicotina. Para tal propósito se generaron animales NVHL, los cuales fueron evaluados en una tarea de laberinto radial. Dichos animales replicaron las deficiencias en memoria de trabajo descritas previamente. Este déficit cognitivo fue revertido tras la administración crónica de nicotina. La expresión relativa del receptor $\alpha 7$ fue evaluada mediante la técnica de Western blot. Los resultados mostraron un aumento en la expresión de esta proteína en animales NVHL que fueron tratados con nicotina, restringiéndose a regiones corticales. Nuestros resultados proveen evidencia en favor de la hipótesis de automedicación con nicotina, la cual sugiere que los pacientes con esquizofrenia mantienen un alto consumo de tabaco debido a un intento de mejorar deficiencias cognitivas.

SUMMARY

Changes in the expression of the $\alpha 7$ nicotinic receptors in the experimental model of schizophrenia by neonatal ventral hippocampal lesion.

Schizophrenia is a chronic and disabling neuropsychiatric disorder. The symptomatology includes psychotic and negative symptoms, as well as cognitive disturbances. The neonatal ventral hippocampal lesion (NVHL) model of schizophrenia has been widely validated, the evidence includes behavioral and neurobiological studies. Previous work showed that NVHL rats display morphological aberrations in granular neurons of the hippocampus and in pyramidal neurons of the cortex, interestingly, the nicotine reverted the morphological deficiencies in the cortical neurons. These effects could be mediated by the nicotinic receptor $\alpha 7$, which is highly sensitive to nicotine. This receptor has been associated with a higher prevalence of developing schizophrenia, as well as with higher tobacco consumption in patients with this disorder. The main goal of this work was to evaluate the patterns of expression of the nicotinic receptor $\alpha 7$ in the NVHL animals treated with nicotine. Thus, we generated NVHL rats which were tested through a radial arm maze task. The NVHL group replicated impairments in working memory, which have been previously described. This cognitive deficit was ameliorated under the chronic administration of nicotine. The relative expression of the $\alpha 7$ receptor was tested by Western blot. The results showed an increase in the expression of this protein in the NVHL animals that were treated with nicotine, this raise was restricted to cortical regions. Our results provide support to the self-medication hypothesis with nicotine, which suggests that patients with schizophrenia smoke in higher amounts in an attempt to improve their cognitive disturbances.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado para la realización de este proyecto. Becario No: 589197.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (No Cuenta: 307207034).

Al Dr. Ataúlfo Martínez Torres, por su invaluable apoyo en la realización de este proyecto. Por el ejemplo de constancia, trabajo y dedicación que nos ha brindado.

A los miembros del comité tutor, el Dr. Hugo Sánchez Castillo por su constante apoyo en mi formación. A la Dra. Magdalena Giordano Noyola por los valiosos comentarios que siempre ayudaron a enriquecer este proyecto.

Al Dr. Ragu Varman Durairaj, gracias por todas las enseñanzas académicas y personales. Sin tu apoyo este trabajo no hubiera sido posible.

A la M. en C. Edith Espino y la Sra. Ramírez Romero por el importante trabajo que realizan en el laboratorio D-15. Por toda la ayuda y enseñanzas.

A la M. en C. Leonor Casanova Rico, y la Unidad de Enseñanza y Estudios de Posgrado por el excelente trabajo administrativo que realizan y por todo el apoyo brindado.

Al personal del Bioterio:

Dra. Alejandra Castilla y M.V.Z José Martín García Servín por el servicio brindado y el mantenimiento y cuidado de los animales utilizados en la realización de este proyecto.

A la unidad de Videoconferencia:

Lic. Lourdes Lara Ayala por el apoyo brindado para la comunicación con otras entidades y el apoyo para el uso de material audiovisual.

A la unidad de Análisis Conductual:

Dra. Deisy Gasca Martínez por su atención constante a los proyectos. Gracias por todo el trabajo y dedicación que se refleja en el excelente servicio de la unidad conductual.

INDICE

Resumen español.....	i
Summary.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Introducción.....	2
Antecedentes	
1. Esquizofrenia	4
1.1 Síntomas Cognitivos en Esquizofrenia.....	8
1.2 Hipótesis de automedicación con nicotina.....	14
2. Receptores neuronales nicotínicos.....	18
2.1.1 Receptores neuronales nicotínicos $\alpha 7$ y esquizofrenia.....	19
3. Modelo de esquizofrenia por Lesión Neonatal del Hipocampo Ventral.....	23
Justificación.....	30
Hipótesis.....	30
Objetivos.....	31
Sujetos, materiales y métodos.....	32
1. Evaluación conductual.....	34
2. Corroboración de lesión.....	37
3. Western blot.....	38
4. Análisis de datos.....	39
Resultados	
1. Corroboración de lesión.....	41
2. Evaluación conductual.....	43
3. Western blot.....	58
Discusión.....	61
Conclusiones.....	69
Referencias.....	70
Lista de figuras.....	79
Lista de abreviaturas.....	81

INTRODUCCIÓN

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico prevalente en el 1% de la población mundial. Aquéllos que lo desarrollan experimentan síntomas psicóticos, síntomas negativos y déficits cognitivos. Los síntomas psicóticos se caracterizan por alucinaciones, delirios y pensamiento desorganizado. Los síntomas negativos se identifican como problemas en la interacción social, problemas en motivación, anhedonia, entre otros. Los pacientes con esquizofrenia también presentan deficiencias cognitivas, que incluyen dominios como la atención, la memoria y funciones ejecutivas (Tandon et al., 2013). La sintomatología cognitiva y negativa no es tratada por la medicación antipsicótica, por lo que, en los últimos años se han llevado a cabo esfuerzos para ofrecer nuevas alternativas farmacológicas a este grupo de pacientes (Katsnelson, 2014).

Se ha determinado que esta población psiquiátrica fuma de 3 a 4 veces más que la población general, esta alta tasa de tabaquismo podría suponer un intento de automedicación por parte de los pacientes (Kumari y Postma, 2005). Los efectos pro-cognitivos de la nicotina podrían ser mediados por el receptor neuronal nicotínico $\alpha 7$. Los niveles de expresión de este receptor son menores en cerebros post-mortem de pacientes con esquizofrenia, y ciertos polimorfismos del gen que codifica para este receptor se asocian tanto con deficiencias cognitivas, como con la prevalencia de tabaquismo en esta población (Leonard, Mexal y Freedman, 2007).

El modelo experimental de esquizofrenia de lesión neonatal del hipocampo ventral (NVHL, siglas en inglés de neonatal ventral hippocampal lesion, Lipska, Jaxkiw y Weinberger, 1993) se ha utilizado en numerosos trabajos experimentales que intentan describir los procesos neurobiológicos del trastorno (Tseng et al., 2009). Estudios previos del laboratorio han demostrado que la morfología de las neuronas granulares del hipocampo y las neuronas piramidales de la corteza es afectada por la lesión neonatal, pero el efecto en las segundas fue parcialmente revertido por la administración crónica de nicotina (Ostos-Valverde, 2015, tesis de licenciatura).

A pesar de las consecuencias positivas que acarrearía el tratamiento de los síntomas cognitivos en esquizofrenia no se han identificado blancos farmacológicos relevantes para su tratamiento. Es por esto que el objetivo del presente trabajo fue determinar si

existe una asociación de la actividad pro-cognitiva de la nicotina con la expresión del receptor nicotínico neuronal $\alpha 7$ en el hipocampo y en la corteza.

Para cumplir dicho propósito entrenamos ratas NVHL en una tarea de laberinto radial, la cual es útil para evaluar la integridad de la memoria de trabajo. Los resultados mostraron que el deterioro en la ejecución de esta tarea en animales NVHL, fue parcialmente revertido tras la administración crónica de nicotina. Adicionalmente, encontramos por Western blot un aumento en la expresión de receptores nicotínicos $\alpha 7$ en la corteza de animales NVHL que fueron tratados con el fármaco.

ANTECEDENTES

1. ESQUIZOFRENIA

Según la última versión del Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-V, por sus siglas en inglés; APA, 2014) se define a los trastornos mentales como síndromes caracterizados por deficiencias clínicamente relevantes en la cognición, regulación emocional o conducta de un individuo, los cuales reflejan una disfunción en procesos psicológicos, biológicos o del desarrollo. Los trastornos mentales se acompañan de discapacidades en esferas sociales, ocupacionales y otras actividades relevantes para el sujeto.

La Organización Mundial de la Salud define a la esquizofrenia como un trastorno mental severo, con afectaciones en pensamiento, lenguaje, percepción, afecto y conducta social. La incidencia mundial del trastorno oscila entre 1.4 a 17 personas por cada 1000, afectando aproximadamente al 1% de la población (OMS, 2015). El diagnóstico del trastorno se hace entre los 16 y 30 años, pero se presenta mayormente en periodos de adolescencia tardía o adultez temprana (OMS, 1998).

Debido a la ausencia de marcadores biológicos que aseguren la presencia del trastorno, el diagnóstico se realiza mediante la examinación y observación de la conducta del paciente. Existen manuales diagnósticos que identifican y enlistan un amplio espectro de signos y síntomas reconocibles en los pacientes con esquizofrenia, estos manuales son el DSM-V y el CIE-10 (Clasificación Internacional de enfermedades en su décima versión). El DSM-V está editado por la APA, mientras que el CIE-10 lo compila la Organización Mundial de la Salud.

De manera general, los síntomas pueden clasificarse en tres grupos: 1) Los síntomas positivos o psicóticos. 2) Los síntomas negativos. 3) Los síntomas cognitivos. La caracterización de estos grupos sintomáticos se desarrolla a continuación:

1) Los síntomas positivos o psicóticos determinan el diagnóstico del trastorno, es decir, su presencia es necesaria (aunque no suficiente) para indicar que un sujeto padece esquizofrenia (Tandon et al., 2013). Cabe recalcar que la presencia de estos síntomas es episódica, fluctuando entre episodios o brotes psicóticos seguidos de periodos de remisión (OMS, 1998). Los síntomas positivos incluyen a las alucinaciones, delirios, desorden de pensamiento y alteraciones motoras. Las alucinaciones que presentan principalmente los pacientes son de tipo auditivo, donde se manifiesta la escucha de voces que pueden expresar ideas u órdenes, o incluso ser ininteligibles y se perciben como distintas a los pensamientos del propio individuo (DSM-V, 2014). Las alucinaciones también pueden ser de otro tipo sensorial, incluyendo las alucinaciones visuales, somatosensoriales o incluso olfativas, por lo que se definen como percepciones sensoriales reportadas en ausencia de un estímulo externo que efectivamente evoque la actividad de transducción sensorial (Wong y Tol, 2003).

Los delirios se refieren a falsas creencias o referencias sobre la realidad, estas creencias no cambian incluso cuando se le muestre al sujeto evidencia de que son erróneas o implausibles; los delirios más comunes son de tipo persecutorio, donde el sujeto tiene la creencia de que será lastimado o perseguido por algún grupo o individuo. Los delirios de grandiosidad consisten en creencias donde el sujeto se percibe con habilidades excepcionales, exceso de fama o riqueza. Otro ejemplo son los delirios nihilistas donde los sujetos perciben que una catástrofe esta por ocurrir. También son comunes las creencias somáticas, erotomaníacas o referenciales (DSM-V, 2013).

El desorden de pensamiento se manifiesta como pobreza en el contenido del discurso, el lenguaje de los pacientes (hablado o escrito) fluctúa entre varios temas, apartándose de un asunto o relato principal para tratar otro asunto sin relación directa al anterior, el discurso llega a ser incomprensible. Las alteraciones de la conducta motora se muestran como patrones de movimiento repetitivos y sin objetivo, actividad motriz intensa y desorganizada seguida de periodos de

inactividad y sin reactividad a estímulos externos, los pacientes también suelen mantener posturas rígidas y excéntricas por periodos indeterminados de tiempo (Mueser y McGurck, 2004).

- 2) Los síntomas negativos son crónicos y persistentes, es decir, se pueden reconocer incluso antes del diagnóstico formal y se mantienen durante todo el curso del trastorno, sin tener periodos de fluctuación. Incluyen síntomas como afecto plano, abulia, alogia, anhedonia, apatía y problemas en interacción social (Tandon, Nasrallah y Keshavan, 2009). El afecto plano se muestra como deficiencias en la prosodia, es decir, en la entonación del lenguaje que indica expresiones afectivas, por lo que su habla suele mostrarse en tono monótono, también muestran poca expresión facial, y disminución en el movimiento de manos y cabeza que da énfasis emocional al discurso. La abulia indica problemas en la motivación, es decir los pacientes muestran deficiencias para iniciar y mantenerse en una actividad. La anhedonia indica una capacidad reducida para experimentar placer, en este caso los pacientes muestran poco interés o satisfacción en sus actividades, incluso cuando antes pudieran percibirlos como reforzantes. La alogia se refiere a pobreza de lenguaje, donde los sujetos disminuyen el flujo de la conversación sin ninguna razón aparente. También se observan problemas para iniciar y mantener relaciones sociales, los sujetos suelen evitar el contacto con otras personas, afectando de manera importante la funcionalidad de estos sujetos (Tandon et al., 2009, DSM-V, 2014).
- 3) Los síntomas cognitivos también se presentan de manera crónica y persistente. Las deficiencias cognitivas son amplias en este trastorno, incluye problemas en filtrado sensorial, topología aberrante en potenciales evocados, así como problemas en atención, memoria y funciones ejecutivas. Se ha identificado que este grupo de síntomas predice la funcionalidad del sujeto, es decir, si será capaz de llevar una vida productiva e independiente. La medicación ofrecida a estos pacientes no da tratamiento a este grupo sintomatológico, incluso se ha demostrado que puede empeorar las deficiencias cognitivas (O'Carroll, 2000).

La esquizofrenia es un trastorno heterogéneo. Desde su conceptualización, en 1911 por Eugen Bleuer, ya se identificaba como un trastorno complejo y multifacético, caracterizado por la presencia de síntomas negativos pero acompañado de muchos otros grupos sintomáticos; los trabajos de Kraepelin en 1919 confirmaron la complejidad del trastorno, admitiendo la falta de un criterio diagnóstico fiable, pero sugiriendo como característica distintiva su curso crónico y progresivo (Tandon et al., 2009). A pesar de que la descripción formal de este trastorno tiene 100 años, hasta el momento no se han identificado tratamientos efectivos para su amplia gama sintomática.

La etiología del trastorno no se ha demostrado de manera concluyente. La “hipótesis etiológica del neurodesarrollo” plantea que los cambios en las estructuras cerebrales de los pacientes se deben a problemas en el desarrollo temprano del sistema nervioso. Es decir, afectaciones perinatales predispondrían al sujeto a cierto patrón de funcionamiento cerebral que daría como resultado la expresión de esquizofrenia (Pantelis, Yücel, Wood, McGorry y Velakoulis, 2003). Esta hipótesis contrasta con la “hipótesis dopaminérgica”, la cual prevaleció por muchos años y sugiere que una exacerbación de la transmisión dopaminérgica subyace al trastorno. La hipótesis se formuló a partir de la evidencia ofrecida por la medicación antipsicótica; se describió que la efectividad clínica de la medicación antipsicótica correlacionaba con la magnitud de bloqueo hacia los receptores dopaminérgicos D_{2-LIKE} (Howes y Kapur, 2009).

Existe evidencia epidemiológica que asocia afectaciones prenatales y postnatales con un mayor riesgo a desarrollar la enfermedad, apoyando la hipótesis del neurodesarrollo. Entre estos factores de riesgo encontramos hipoxia, infecciones virales, preclampsia, bajo peso al nacer, entre otras (Rapoport, Addington, Frangou y Psych, 2005).

Otras evidencias a favor de la hipótesis de neurodesarrollo identifican menor tamaño de somas y menor arborización de grupos neuronales, esto en ausencia de gliosis; el hecho de que no se hayan identificado cicatrices gliales descarta un efecto neurodegenerativo. Por otro lado, los genes que codifican para NRG1 (Neuroregulina 1) y su receptor ErbB4,

así como DISC 1 (Disrupted in Schizophrenia 1) se han identificado como factores de riesgo en el trastorno. Las proteínas que codifican estos genes se ven implicadas en procesos de proliferación, migración y arborización en etapas perinatales, mientras que en etapas tardías del desarrollo se encuentran implicados en procesos de maduración de sinapsis, mielinización y poda neuronal (Jaaro-Peled, et al.,2009).

Esta hipótesis ha recibido creciente atención en los últimos años, guiando la generación de nuevos modelos animales que han permitido mejores predicciones respecto al trastorno, estos incluyen al modelo NVHL, que se describirá más adelante y se utilizará como modelo experimental en este estudio.

1.1 SINTOMAS COGNITIVOS EN ESQUIZOFRENIA

En el DSM-V se menciona a las deficiencias cognitivas como características que apoyan el diagnóstico de esquizofrenia, ya que son altamente frecuentes en esta población y se encuentran ligadas a problemas funcionales, es decir, a la incapacidad de llevar una vida autónoma. Según la descripción del DSM-V los síntomas cognitivos persisten incluso en periodos de remisión, donde los síntomas positivos están disminuidos o controlados. Estos síntomas incluyen deficiencias en la memoria declarativa, memoria de trabajo, lenguaje y otras funciones ejecutivas, así como enlentecimiento en la velocidad de procesamiento. También son frecuentes anomalías en el procesamiento sensorial, en la capacidad inhibitoria y reducciones en la atención. Algunos individuos con esquizofrenia muestran deficiencias en cognición social, es decir, en la capacidad de inferir las intenciones de otras personas. También se puede presentar anosognosia, la cual se define como desconocimiento de las deficiencias funcionales asociadas al trastorno (DSM-V, 2013).

Las deficiencias cognitivas se identifican en los pacientes incluso antes de la aparición del primer brote psicótico (Sanders et. al. 2004). Evaluaciones neuropsicológicas hechas en pacientes con esquizofrenia libres de medicación antipsicótica han encontrado alteraciones en varios dominios cognitivos, evidenciando que estas deficiencias no están relacionadas con la medicación (Torrey, 2002). También se han identificado deficiencias

cognitivas moderadas en familiares de pacientes con esquizofrenia, estas deficiencias son evidentes en tareas que evalúan atención, velocidad de procesamiento y funciones ejecutivas (Kuha et. al. 2007). La presencia de deficiencias cognitivas previas al primer brote psicótico, en pacientes sin historial de medicación antipsicótica, así como en familiares de pacientes, deja claro que los síntomas cognitivos son inherentes al trastorno, y acompañan a los sujetos a lo largo de toda su evolución.

Los síntomas cognitivos han sido asociados ampliamente con la pérdida de funcionalidad social y ocupacional, esto incluye la reducción de vínculos sociales, menores tasas de empleo, así como la incapacidad de vivir de manera independiente por parte de los pacientes. La severidad de los síntomas positivos o negativos no muestra asociación con dichas medidas de funcionalidad (Bryson y Bell, 2003). El impacto de los síntomas cognitivos en la funcionalidad también se ha mostrado de manera longitudinal, incluso predice el éxito de los pacientes tras intervenciones psicosociales (Green, Kern, y Heaton, 2004).

El desarrollo de medicación pro-cognitiva resulta relevante en función de su impacto en la adaptación y funcionalidad de los pacientes. De manera interesante, se ha observado que la disponibilidad de medicamentos antipsicóticos no ha ofrecido mejoras en funciones cognitivas o funcionales en esta población, incluso las nuevas generaciones de medicamentos antipsicóticos dejan de lado esta meta farmacológica. Debido a lo anterior, el Instituto Nacional de Salud (NIH, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos fundó, en 2002, la iniciativa MATRICS (Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia), la cual tenía como principal objetivo desarrollar una batería de evaluación cognitiva, la cual debía realizar medidas robustas y estandarizadas de las esferas cognitivas mayormente afectadas. Un segundo objetivo consistía en utilizar dicha batería en ensayos clínicos de fármacos pro-cognitivos y promover la obtención de resultados consistentes (Cohen, e Insel, 2008).

En 2006 se publicó la batería MCCB (MATRICS Consensus Cognitive Battery), la cual se centró en la evaluación de los dominios cognitivos que han mostrado afectaciones

consistentes en pacientes con esquizofrenia. La batería se compone de 10 pruebas que evalúan velocidad de procesamiento, atención/ vigilancia, memoria de trabajo, aprendizaje y memoria visual, aprendizaje y memoria verbal, razonamiento y solución de problemas y, finalmente, cognición social. La creación de este instrumento supone una mejor manera de evaluar los déficits cognitivos en esquizofrenia y un método consensuado para comparar estrategias pro-cognitivas (Rodríguez-Jiménez, et al., 2012).

En 2008 la iniciativa MATRICS se transformó en CNTRICS [Cognitive Neuroscience Approaches to the Treatment of Impaired Cognition in Schizophrenia (NIMH, 2008)]. Los propósitos de esta nueva iniciativa es generar un puente entre la investigación de neurociencias cognitivas y las necesidades de evaluación y tratamiento en esquizofrenia; traduciendo las investigaciones de ciencia básica en instrumentos con relevancia clínica (Harvey, 2008). Entre las premisas más ambiciosas de CNTRICS se encuentra la detección temprana del trastorno mediante marcadores cognitivos, promoviendo intervenciones preventivas que retrasen o disminuyan la sintomatología psicótica (Cohen, e Insel, 2008). Sin embargo, su objetivo primario consiste en cuantificar de mejor manera las deficiencias conductuales del trastorno en modelos animales, promoviendo una mejor identificación de los mecanismos neurales subyacentes y mejorando la calidad de investigación pre-clínica para el tratamiento cognitivo (Young, y Geyer, 2015).

El espectro de deficiencias cognitivas en estos pacientes es evidente desde etapas tempranas de procesamiento sensorial. Mediante técnicas electroencefalográficas se han identificado alteraciones en potenciales relacionados con procesamiento de estímulos auditivos y visuales. Uno de ellos es el potencial P50, el cual se identifica en regiones corticales auditivas 50 milisegundos después de la presentación de un estímulo auditivo, si el estímulo es repetitivo se identifica una reducción en la magnitud del potencial, esta reducción se ha asociado con mecanismos que inhiben información redundante. En pacientes con esquizofrenia no se encuentra dicha modificación en el potencial P50, interpretándose como una afectación en mecanismos de filtrado sensorial. Otro ejemplo es el potencial MMN (siglas en ingles de Mismatch Negativity), se identifica tras la

presentación de un estímulo irregular después de varios estímulos regulares, en pacientes con esquizofrenia se encuentra una reducción en la magnitud de este potencial, indicando afectaciones pre-atentivas en el procesamiento sensorial. Otros correlatos electroencefalográficos han sido estudiados en estos pacientes, incluyendo los potenciales auditivos N100 y P300, así como los potenciales de procesamiento visual P100, N170 y N400, en todos ellos se han mostrado alteraciones en magnitud, topografía o latencia, evidenciando afectaciones en los mecanismos neurales que codifican la entrada sensorial (Onitsuka, Oribe, Nakamura, y Kanba, 2013).

La evaluación de procesos atentos en pacientes con esquizofrenia se ha realizado mediante test neuropsicológicos. El Test de Ejecución Continua (CPT, por sus siglas en inglés) permite evaluar la atención mantenida por largos periodos de tiempo o vigilancia. En un estudio reciente se comparó la ejecución de pacientes en 5 poblaciones diferentes, los resultados indicaron afectaciones significativas en comparación a la ejecución control; dichos resultados fueron consistentes en todos los grupos de edad, nivel educativo y raza. La ejecución de los pacientes se mostró independiente de la severidad de síntomas positivos o negativos (Nuechterlein, et al. 2015). Estos resultados sugieren que las afectaciones en atención son altamente frecuentes en esta población.

La memoria se refiere a la habilidad de recordar eventos del pasado, e involucra procesos de codificación, almacenamiento y recuperación de información. En pacientes con esquizofrenia se han evaluado principalmente procesos de aprendizaje y memoria verbal, los cuales consisten en codificar y recuperar listas de palabras durante una o varias sesiones. Los resultados indican que los sujetos con esquizofrenia recuerdan menor cantidad de información que los sujetos control, esta diferencia se observa en pacientes bajo tratamiento antipsicótico, e incluso en pacientes libres de medicación (Manglam, y Das, 2013). Aprovechando diferentes paradigmas es posible diferenciar el papel de cada sub-proceso mnemónico en la ejecución de los pacientes, los resultados indican mayores deficiencias en codificación y recuperación, con efectos modestos en almacenamiento. En el proceso de codificación los sujetos sanos tienden a asociar o agrupar las palabras

que serán recordadas, las evidencias indican que este proceso no sucede en los pacientes con esquizofrenia (Cirillo, y Seidman, 2003).

La memoria de trabajo se considera como la habilidad para codificar, mantener y manipular información por periodos cortos de tiempo, esta capacidad permite mantener en línea información que no está inmediatamente accesible e incorporar nuevos elementos para organizar la conducta hacia ciertos objetivos (Lett, et al. 2014). Esta habilidad ha sido la más explorada en pacientes con esquizofrenia, y su afectación se considera como un síntoma central de este trastorno (Barch, y Smith. 2008). Lee y Park (2005) realizaron un meta-análisis considerando la heterogeneidad de paradigmas utilizados en la evaluación de esta función cognitiva; los resultados mostraron que los déficits en memoria de trabajo son robustos, ya que son evidentes en una variedad de tareas neuropsicológicas, además son supramodales, es decir, son independientes de la modalidad sensorial aprovechada (verbal vs visual). En sujetos sanos, se ha identificado que la actividad en la corteza prefrontal dorsolateral (DLPFC, por sus siglas en inglés) da lugar a la memoria de trabajo; las evidencias señalan que hay mayor perfusión sanguínea en esta corteza cuando hay demanda de este tipo de memoria, por otro lado, la coherencia de actividad entre la DLPFC y el hipocampo predice una mejor ejecución en memoria de trabajo (Lett, et. al., 2014). En pacientes con esquizofrenia se ha demostrado una pobre conectividad entre la DLPFC y el hipocampo, esta afectación también fue evidente en familiares de primer grado (Schneider, et al. 2017). Por otro lado, se ha demostrado que el menor volumen hipocampal, presente en pacientes con esquizofrenia, correlaciona de manera directa con la ejecución en memoria de trabajo, es decir, un menor volumen en regiones hipocamapales corresponde a una peor ejecución en estas tareas (Vargas et al., 2017).

De manera reciente, se han generado nuevas investigaciones sobre las afectaciones en cognición social mostradas en esta población psiquiátrica. Las deficiencias en interacción social suelen agruparse dentro de los síntomas negativos, no obstante, tienen un componente cognitivo que incluye la percepción, codificación, almacenamiento, recuperación y regulación de información sobre pensamientos y emociones propios y

ajenos, los cuales modulan la interacción social (Ochsner, 2008). Estas deficiencias son evidentes en estos pacientes, muestran una capacidad alterada del reconocimiento de expresiones faciales emocionales, así como de entonación vocal con contenido emocional, asimismo, suelen hacer interpretaciones erróneas sobre las intenciones de terceros y muestran problemas regulando su conducta en contextos emocionales.

Estudios de neuroimagen, así como de potenciales relacionados a eventos, han determinado que regiones del cerebro como la amígdala, el giro fusiforme, el surco temporal superior, y la corteza prefrontal medial muestran actividad disminuida en tareas de cognición social en pacientes (Green, Horan, y Lee, 2015).

Como se puede advertir, el correlato neuroanatómico de las deficiencias cognitivas en esquizofrenia es amplio, dependiendo de la función cognitiva a evaluar se han identificado diferentes circuitos, no obstante, la disminución en la actividad de regiones corticales frontales se ha reportado de manera consistente mediante técnicas de imagenología cerebral, encontrando una hipofrontalidad bajo la demanda de tareas cognitivas. La actividad del lóbulo temporal, particularmente del hipocampo, también se ha relacionado con las deficiencias cognitivas, encontrándose una reducción en el tamaño de esta estructura, así como menor actividad ante diversas tareas. Varios estudios han integrado esta información, proponiendo un modelo de “conectividad interrumpida”, en dicho modelo se asume que la comunicación entre las regiones frontales y temporales está afectada, dando lugar a un pobre control cognitivo en esta población psiquiátrica (Ragland, Yoon, Minzenberg, y Carter, 2009).

Ciertos mecanismos celulares han sido relacionados con la sintomatología cognitiva, principalmente modificaciones en la actividad de regiones corticales frontales. En estas regiones es necesario mantener un fino balance excitatorio/inhibitorio para permitir que la actividad se propague y no aumente de manera descontrolada. La actividad excitatoria cortical depende de la actividad de neuronas piramidales, las cuales son inhibidas mediante interneuronas GABAérgicas que expresan Parvalbúmina (PV, proteína de unión a calcio, importante en la regulación de actividad neuronal). En esquizofrenia se ha descrito un pobre control excitatorio/inhibitorio en regiones corticales. Las evidencias

indican una menor expresión de GAD67 (Glutamato descarboxilasa, enzima limitante en la síntesis de GABA) en regiones corticales y límbicas, también se han descrito menores niveles del RNA mensajero de PV en estos pacientes (Lewis, Curley, Glausier, y Volk, 2012). De manera interesante, se determinó mediante hibridación *in situ* que solamente el 55% de células positivas a PV tenían señal de GAD67 en cerebros post-mortem de sujetos con esquizofrenia (Hashimoto, et. al. 2003).

Estas evidencias nos permiten tener un conocimiento más profundo respecto al sustrato neurobiológico de las deficiencias cognitivas en esta población, y hace posible la generación de nuevas aproximaciones farmacológicas para reducir su impacto en la funcionalidad del paciente. Idealmente, dichas aproximaciones farmacológicas impactarán en la regulación del balance excitatorio/inhibitorio cortical, mostrando efectos benéficos en la cognición de los pacientes.

1.2 HIPÓTESIS DE AUTOMEDICACIÓN CON NICOTINA

La esquizofrenia presenta una alta comorbilidad con el abuso de sustancias, incluyendo drogas como el alcohol, cannabis, alucinógenos, anfetaminas o cocaína (OMS, 1998). Sin embargo, la prevalencia de tabaquismo es especialmente alta en esta población. Se ha determinado que del 60% al 90% de la población que padece esquizofrenia fuma, mientras que en la población general se conoce que el consumo regular de tabaco es mantenido por el 25.9% de la población (Volkow, 2009). También se ha identificado que los pacientes fuman en mayor cantidad, teniendo un consumo de 3 a 4 veces mayor que un fumador control (Leon y Diaz, 2005). De manera interesante, se han encontrado mayores concentraciones de cotinina (principal metabolito de nicotina) en saliva de pacientes, a pesar de consumir el mismo número de cigarrillos al día que un grupo control, sugiriendo una extracción de nicotina más eficiente por parte de los sujetos con esquizofrenia (Strand y Nybäck, 2005).

Existen dos hipótesis que intentan explicar los mecanismos que subyacen al pronunciado consumo de nicotina en esta población psiquiátrica. La primera se denomina “Hipótesis

de vulnerabilidad compartida”, propone que existen factores ambientales y genéticos inherentes al trastorno que promueven un mayor consumo de drogas, es decir, los mecanismos neuropatológicos que dan lugar a la esquizofrenia también contribuyen a una mayor vulnerabilidad al abuso de sustancias. Esta hipótesis asume que los pacientes muestran mayores efectos reforzantes de esta droga, aumento en los síntomas de abstinencia, así como mayor impulsividad ante el consumo de tabaco (Parikh, Kutlu, y Gould, 2016).

Algunas evidencias en este sentido indican que los sustratos responsables del reforzamiento de drogas están involucrados en la patología del trastorno, el circuito dopaminérgico mesolímbico se ha visto involucrado en el mantenimiento de adicciones en la población general, así como en la expresión de síntomas psicóticos en pacientes con esquizofrenia (Volkow, 2009). Otros resultados sugieren que la actividad del receptor $\alpha\beta 2$, así como polimorfismos en el gen que codifica para la subunidad $\alpha 4$ (CHRNA4), están involucrados en la mayor sensibilidad a las propiedades reforzantes de la nicotina en esta población; la subunidad $\alpha 7$ no mostró asociación con propiedades reforzantes (Parikh et al., 2016).

La segunda hipótesis se denomina “Hipótesis de automedicación con nicotina”. Tal hipótesis indica que esta población fuma de manera exacerbada debido a que obtienen consecuencias deseables en la sintomatología por la administración de nicotina. Los pacientes reportan mejoras en los síntomas tras el consumo de tabaco, y empeoramiento durante periodos de abstinencia (Kumari y Postma, 2005).

Los beneficios del consumo de nicotina han sido descritos en las etapas tempranas del procesamiento de información sensorial, esto incluye la capacidad de filtrar información irrelevante de manera pre- atenta. El potencial relacionado a eventos P50 permite evaluar estos mecanismos; Esta onda se obtiene al presentar varios tonos repetitivos, los cuales generan una onda electroencefalográfica positiva, 50 ms después la presentación del tono. En sujetos sanos, la amplitud de esta onda disminuye tras las exposiciones repetidas del tono, evidenciando mecanismos de inhibición de información

irrelevante. Los sujetos con esquizofrenia no muestran dichas modificaciones en la onda P50, evidenciando alteraciones en el filtrado sensorial (Vlcek, Bob, & Raboch, 2014). Del mismo modo, los pacientes muestran afectaciones en tareas de inhibición prepulso; en dichas tareas se evalúa la respuesta de alertamiento ante un tono fuerte; en la población sana, dicho alertamiento se ve disminuido siempre que sea precedido por un tono subumbral, mientras que en esta población psiquiátrica no se observa tal supresión (Parikh et al., 2016). Las deficiencias en P50, y las afectaciones en tareas de inhibición prepulso, se ven disminuidas tras el consumo de tabaco en pacientes con esquizofrenia (Leonard et al., 2007).

El consumo de nicotina en esta población también impacta en otros síntomas cognitivos. Los pacientes mejoran en tareas de memoria y tiempos de reacción tras la administración por parches transdérmicos, este efecto es dosis dependiente (Levin, Wilson, Rose y McEvoy, 1996). Por otro lado, el consumo moderado de nicotina en estos pacientes (20 cigarrillos al día) correlaciona con menor severidad de síntomas positivos y negativos (Aguilar, Gurpegui, Diaz y Leon, 2005). También se han reportado mejoras en atención, evaluadas mediante la batería MCCB, así como en la tarea de ejecución continua, tanto en pacientes no fumadores, como en pacientes con historial de tabaquismo y abstinencia de 10 a 24 horas (Smucny & Tregellas, 2017).

Mediante aproximaciones genéticas también se ha intentado identificar si la esquizofrenia y el tabaquismo tienen mecanismos de vulnerabilidad compartida, o si el tabaquismo es una afección secundaria al trastorno que intenta remediar ciertos síntomas. Los estudios de asociación del genoma completo permiten identificar grupos de genes que son factores de riesgo para diversos trastornos. Aprovechando esta información se identificó que ciertos genes, con mediana asociación para esquizofrenia, predecían altos niveles de dependencia para nicotina y un mayor número de cigarrillos fumados al día. Por otro lado, se determinó que los genes involucrados en la concentración plasmática de cotinina podían predecir un diagnóstico de esquizofrenia, no así los genes de riesgo involucrados en la dependencia al tabaco (Chen et al., 2016). También se han hecho análisis de variantes génicas asociadas con ambas condiciones, se encontraron 11 *locus*

compartidos en esquizofrenia y regulación plasmática de cotinina y 10 *locus* comunes a esquizofrenia y dependencia a nicotina; de manera interesante, en ambas condiciones se encuentran los genes CHRNA5, CHRNA3 y CHRNB4, que codifican para subunidades de receptores nicotínicos. Al agrupar los genes compartidos entre esquizofrenia y dependencia a nicotina se identificó que se involucraban en mecanismos de señalización de calcio, potenciación a largo plazo, interacción ligando-receptor, moléculas de adhesión celular, entre otros, identificándose mecanismos celulares fundamentales en diversas funciones cognitivas. Estos resultados indican que existe vulnerabilidad genética compartida para ambos trastornos. Sin embargo, los genes de riesgo altamente asociados con esquizofrenia no contribuyen a la presencia de conductas de tabaquismo, indicando que los mecanismos de adicción en esta población pueden ser secundarios a la presencia de esquizofrenia (Chen et al., 2016).

La importancia de identificar los mecanismos que regulan la comorbilidad entre esquizofrenia y el abuso de consumo de tabaco permitirán aproximarse de mejor manera al tratamiento de ambas afectaciones. Vale la pena resaltar que estas teorías no son mutuamente excluyentes, una mayor propensión al abuso de sustancias en esquizofrenia es posible, mientras que el alto consumo de nicotina podría mantenerse debido a las ventajas cognitivas que ofrece.

2. RECEPTORES NEURONALES NICOTÍNICOS

Tanto los receptores ionotrópicos nicotínicos, como los receptores metabotrópicos muscarínicos tienen como ligando endógeno a la acetilcolina. Ambos se encuentran expresados en neuronas y en grupos celulares no neuronales en todo el organismo. Los receptores muscarínicos están acoplados a proteína G y su actividad se encuentra en el rango de milisegundos a segundos. Por otra parte, la actividad de los receptores nicotínicos (nAChRs) se mantiene en el rango de los microsegundos, siendo la nicotina su principal ligando exógeno (Albuquerque, Pereira, Alkondon y Rogers, 2009).

Los receptores nicotínicos forman parte de la superfamilia de canales iónicos activados por ligando, que incluye a los canales GABA_A, glicina y 5-HT₃. Los receptores nicotínicos forman pentámeros, que pueden estar compuestos por diferentes subunidades, lo cual genera una gran diversidad de complejos canal-receptor. Los nAChRs de origen muscular se conforman por las subunidades $\alpha 1$, $\beta 1$, δ , γ y ϵ . En receptores nicotínicos neuronales se han descrito las subunidades $\alpha 2$ - $\alpha 6$ y $\beta 2$ - $\beta 4$, que pueden formar complejos heteroméricos, mientras que las subunidades $\alpha 7$ - $\alpha 9$ se han encontrado en conformación homomérica (Dani y Bertrand, 2007).

Las subunidades de los receptores neuronales nicotínicos pueden arreglarse en diversas conformaciones, dando lugar a complejos canal-receptor con diferentes características de cinética de actividad, diferentes permeabilidades y farmacología. La estequiometría de los receptores heteroméricos sigue un arreglo tipo $\alpha\beta\alpha\beta\beta$, sin embargo, también se han demostrado conformaciones tipo $(\alpha)_3(\beta)_2$ *in vitro*. Los receptores homoméricos se conforman por 5 subunidades $\alpha 7$, $\alpha 8$ o $\alpha 9$, los cuales muestran una alta permeabilidad a Ca²⁺ y una rápida tasa de desensibilización en comparación con la conformación heteromérica (Jensen, Frolund, Liljefors y Krosgsgaard-Larsen, 2005).

Una importante característica de estos receptores es el hecho de que incrementan su expresión cuando se exponen de manera crónica a nicotina. Se ha demostrado una regulación a la alta de nAChRs en cerebros post-mortem de fumadores crónicos,

principalmente de receptores con alta afinidad a la nicotina, como los $\alpha 4\beta 2$. Los mecanismos por los que se lleva a cabo la regulación a la alta de nAChRs no están bien descritos (Perry, Dávila-García, Stockmeier y Kellar, 1999).

2.1 RECEPTORES NEURONALES NICOTÍNICOS $\alpha 7$ Y ESQUIZOFRENIA

El receptor neuronal nicotínico $\alpha 7$ se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro y está localizado tanto en terminales pre- y post-sinápticas, donde tienen efectos regulatorios en neurotransmisión excitatoria o inhibitoria (Gillentine y Schaaf, 2015). Estos receptores se caracterizan por una rápida activación y desensibilización, también son altamente permeables a Ca^{2+} . Poseen una baja afinidad por la nicotina, en comparación con los receptores $\alpha 4\beta 2$ (Albuquerque, Pereira, Alkondon y Rogers, 2009).

Se ha postulado que la actividad de los receptores $\alpha 4\beta 2$ media los efectos reforzantes y adictivos de la nicotina. Mientras que la actividad de los receptores $\alpha 7$ se ha visto involucrada en el funcionamiento cognitivo. Mutantes de delección del gen que codifica para la subunidad $\alpha 7$ muestran afectaciones en atención, memoria de trabajo y filtrado sensorial en modelos murinos (Parikh et al., 2016).

La subunidad $\alpha 7$ se localiza en dendritas de neuronas hipocampales en cultivo y la aplicación de acetilcolina en dendritas de neuronas, genera una corriente tipo IA, típica de este receptor (Orr-Urtreger, et al, 1997). También se ha localizado a la subunidad $\alpha 7$ de manera presináptica en neuronas del bulbo olfatorio y se postula que la actividad de estos receptores en las terminales axónicas facilita la liberación de neurotransmisores debido a la entrada de Ca^{2+} (Alkondon, Rocha, Maelicke y Albuquerque, 1996).

Los receptores $\alpha 7$ también se encuentran localizados de manera extra-sináptica. En regiones preterminales causarían despolarizaciones locales, favoreciendo la generación de un potencial de acción que tendría como consecuencia la liberación de neurotransmisor. Esta distribución se ha reportado en sinapsis GABAérgicas, donde

despolarizaciones locales mediadas por nAChRs activarían canales activados por voltaje, favoreciendo el flujo de Ca^{2+} al interior de la neurona, lo cual tendría como consecuencia liberación de GABA y la mediación de mecanismos inhibitorios (Dani y Bertrand, 2007).

La subunidad $\alpha 7$ es codificada por el gen *CHRNA7* localizado en el cromosoma 15, este gen contiene 10 exones. Sin embargo, en humanos se encuentra una duplicación parcial, formando un nuevo gen *CHRFAM7A*, el cual incluye a los exones 5 al 10 con DNA adicional y se localiza a 1.6 Mb del gen *CHRNA7*. Se ha determinado que *CHRFM7A* se transcribe de manera eficiente pero se traduce pobremente en el péptido *dup $\alpha 7$* (Leonard y Freedman, 2006).

Se ha determinado que la subunidad $\alpha 7$ y el producto del gen duplicado, *dup $\alpha 7$* , pueden formar receptores funcionales. Esto se determinó mediante la técnica FRET (Förster fluorescence energy transfer), la cual permite la detección de proteínas que se encuentran a menos de 12 nM de distancia. Mediante técnicas de electrofisiología se pudo determinar que ambas subunidades forman canales funcionales, en ovocitos de rana se co-expresaron subunidades $\alpha 7$ y *dup $\alpha 7$* , lo cual provocó una reducción de las corrientes generadas por acetilcolina en un 30%. Esto sugiere que la presencia de *dup $\alpha 7$* en un receptor disminuiría el paso de iones a través del canal. Los ovocitos que expresaban ambas subunidades mostraron menor marcaje mediante [^{125}I]- α -Bungarotoxina (Sinkus *et. al.* 2015).

El locus 15q13-q14 se ha visto asociado a esquizofrenia en diversas poblaciones, incluyendo sujetos europeos, chinos y africanos, entre otros. Este locus contiene al gen que codifica para la subunidad $\alpha 7$. En la región promotora del gen se han descrito diversos polimorfismos que correlacionan con la presencia del padecimiento, así como con las deficiencias en la onda p50 presentes en estos pacientes (Leonard y Freedman, 2006). Asimismo, este locus también contiene al gen parcialmente duplicado de la subunidad $\alpha 7$ (*CHRFAM7A*). Se ha reportado que un polimorfismo de este gen que consiste en una deleción de dos pares de bases en el exón 6 se asocia con esquizofrenia, tanto en población afro-americana como en caucásicos (Sinkus *et. al.* 2009)

Por otro lado, se ha encontrado que los pacientes con esquizofrenia muestran una menor expresión del receptor $\alpha 7$ en el hipocampo, corteza del cíngulo, lóbulo frontal y núcleo reticular del tálamo. (Olinicy y Stevens, 2007). Como se ha mencionado anteriormente, la actividad de estos receptores está asociada con la correcta función cognitiva; en pacientes con esquizofrenia, la reducción del número de receptores $\alpha 7$, aunado al malfuncionamiento debido a mutaciones, podría ofrecer una explicación a la alta prevalencia de tabaquismo en estos pacientes, siendo un intento de mejorar la actividad de los receptores, teniendo consecuencias en la sintomatología cognitiva. En este sentido, Mexal et al. (2010), identificaron que pacientes con historial de tabaquismo mostraban niveles similares a fumadores controles, en el RNAm y el receptor $\alpha 7$. Ambos indicadores están disminuidos en tejido de pacientes con esquizofrenia sin historial de tabaquismo, en comparación con controles no fumadores. Los autores discuten que el consumo de nicotina mejora mecanismos celulares de ensamble y tráfico de dichos receptores (Mexal et al., 2010).

Estudios farmacológicos apoyan el involucramiento del receptor $\alpha 7$ en la sintomatología cognitiva de los pacientes. Agonistas específicos a este receptor como DMXBA y TC-5619 han sido probados en pacientes con esquizofrenia, donde han mostrado efectos deseables en memoria de trabajo, así como mejoras en capacidades atencionales y en el filtrado sensorial que se describe por la onda P50; también existen efectos modestos en la mejora de síntomas negativos. Ambos fármacos muestran ser bien tolerados por los pacientes (Lieberman et al., 2012; Martin y Freedman, 2007). Otro estudio evaluó la administración de colina y galantamina a pacientes con esquizofrenia, este último es un modulador alostérico positivo de los receptores $\alpha 7$. Los pacientes mantenían un tratamiento con antipsicóticos de segunda generación. Los resultados mostraron un mayor efecto benéfico de síntomas cognitivos y funcionalidad general (Deutsch, et al., 2013).

La red neuronal por defecto se muestra desactivada durante el procesamiento de información relevante para una tarea, y se compone de regiones como la corteza

cingulada anterior y la ínsula bilateral, de manera interesante, se ha encontrado que los pacientes con esquizofrenia muestran niveles reducidos del receptor $\alpha 7$ en la corteza cingulada anterior; además, se ha demostrado un aumento del flujo cerebral hacia estas regiones, y una mejor conexión entre esta red y otras estructuras cerebrales tras el consumo de nicotina (Smucny & Tregellas, 2017).

Se evaluó un agonista parcial del receptor $\alpha 7$, nombrado EVP-6124 en pacientes con esquizofrenia. Los resultados indicaron mejoras en potenciales evocados, incluyendo la medida atencional p300, así como marcadores de saliencia sensorial. Evaluaciones neuropsicológicas permitieron encontrar mejoras en tareas de aprendizaje no-verbal, memoria y funciones ejecutivas. Actualmente no existe ningún fármaco aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) que tenga como blanco el tratamiento de las deficiencias cognitivas en esquizofrenia, no obstante, algunos de los compuestos mencionados son evaluados en ensayos clínicos de fase II (Preskon et al., 2014). Por esta razón resulta relevante evaluar el efecto de la nicotina en un modelo de esquizofrenia validado, así como evidenciar el impacto de este fármaco en los receptores $\alpha 7$.

3. MODELO DE ESQUIZOFRENIA POR LESIÓN NEONATAL DEL HIPOCAMPO VENTRAL

La validez aparente, validez de constructo y validez predictiva del modelo de esquizofrenia por lesión neonatal del hipocampo (NVHL, por sus siglas en inglés) es robusta (Genis y López-rubacava, 2011). Existe un amplio grupo de investigaciones que utilizan el modelo NVHL, todas éstas lo identifican como un modelo útil en la investigación de características conductuales, neuroquímicas, neuroanatómicas, celulares y moleculares relevantes para esquizofrenia.

La conceptualización del modelo NVHL se basa en la hipótesis etiológica del neurodesarrollo (Lipska y Weinberger, 2002). Como se describió previamente, dicha hipótesis postula que la esquizofrenia es la manifestación de alteraciones en el desarrollo temprano (prenatal y/o postnatal) del sistema nervioso; la expresión de síntomas psicóticos en la adultez ocurre en concordancia con procesos finales de maduración, ante estas nuevas demandas se hacen evidentes las afectaciones acumuladas desde los periodos tempranos de desarrollo (Birnbbaum y Weinberger, 2017). Un amplio grupo de evidencias soportan esta teoría, incluyendo evidencia epidemiológica y neuroanatómica, de manera reciente se han sumado datos genéticos y epigenéticos, los cuales señalan cambios moleculares en el desarrollo fetal del cerebro como factores de riesgo para desarrollar esquizofrenia (Weinberger, 2017).

El modelo NVHL se genera mediante una lesión en la porción ventral del hipocampo en el día 7 postnatal. La localización de la lesión responde a evidencias obtenidas con técnicas de imagenología, como un aumento en el tamaño de los ventrículos laterales, así como reducciones bilaterales del volumen hipocampal, dichos cambios morfológicos son reconocibles en pacientes crónicos, así como en pacientes con primer brote psicótico (Heckers, 2001). Los resultados indican que el curso del trastorno no modifica el volumen del hipocampo, lo cual sugiere que las afectaciones en este circuito están determinadas desde periodos tempranos del desarrollo (Adriano, Caltagironeb y Spalletta, 2012). Es importante señalar que la porción ventral del hipocampo en roedores corresponde al

hipocampo anterior en humanos, y se ha visto relacionado con el procesamiento de respuestas emocionales y de estrés, esta subregión se comunica de manera importante con la CPF, la amígdala y el núcleo accumbens (Fanselow y Dong, 2010); dichas estructuras se identifican en la patofisiología del trastorno. Por otra parte, la temporalidad de la lesión se debe a su correspondencia con el tercer trimestre de gestación en humanos, en este periodo ocurren importantes eventos de desarrollo y conectividad hipocampal (Tseng, Chambers y Lipska, 2009).

A lo largo del desarrollo de los animales NVHL comienzan a mostrar un fenotipo conductual que mimetiza los síntomas presentes en esquizofrenia. Como modelo de síntomas positivos se ha descrito una mayor respuesta a agonistas dopaminérgicos, así como hiperresponsividad a estrés (Tseng, Chambers y Lipska, 2009). Las alucinaciones auditivas pueden ser el resultado de afectaciones en la sincronización neural de cortezas auditivas primarias y secundarias, mediante técnicas de electrofisiología e imagenología se ha confirmado actividad aberrante en dichas cortezas en pacientes con esquizofrenia. Mediante la evaluación de potenciales de campo local se pudo determinar afectaciones en la actividad neural de animales NVHL, dichas afectaciones estaban circunscritas a la corteza auditiva posterior, la cual es una corteza auditiva secundaria que permite la integración de estímulos sonoros (Li, et al., 2018).

Las ratas NVHL invierten menos tiempo en interacciones sociales y mantienen más conductas agresivas, lo cual recuerda a la sintomatología negativa en esquizofrenia (Becker, Grecksch, Bernstein, Höllt y Bogerts, 1999). También muestran deficiencias cognitivas que incluyen problemas en inhibición del prepulso, potenciales evocados con topografía alterada, y déficits en memoria de trabajo (Risterucci et al., 2005; Romero-Pimentel et al., 2014; Chambers, Moore, McEvoy y Levin, 1996).

El modelo NVHL también replica la cronología del trastorno, ya que presenta las deficiencias cognitivas y mimetiza síntomas negativos en etapas de adolescencia temprana. Una vez que los animales llegan a la adultez comienzan a mostrarse los símiles de síntomas positivos (Tseng, Chambers y Lipska, 2009).

Como se ha mencionado, los pacientes con esquizofrenia muestran afectaciones funcionales y anatómicas en regiones corticales e hipocampales, las cuales también son reconocibles en estos animales. El modelo NVHL mostró hiperresponsividad ante un ambiente novedoso, seguido de un aumento en la expresión del marcador de actividad neuronal c-fos, este resultado fue particular a la CPF y el hipocampo (Monfil, et al., 2017). De manera consistente, se mostraron disminuciones en el marcador NRP/B (una proteína de matriz nuclear, importante en el desarrollo temprano del sistema nervioso), así como disminuciones en NeuN (antígeno que identifica neuronas maduras) en diferentes edades de animales NVHL. Estas alteraciones se identificaron mediante Western blot e inmunohistoquímica en la corteza, el hipocampo y el estriado (Tian, et al., 2016).

Como antecedentes directos, en estudios previos del laboratorio se evaluó la morfología de neuronas granulares del hipocampo y de neuronas piramidales de porciones frontales corticales en ratas NVHL con tratamiento crónico de nicotina. Las neuronas granulares del hipocampo mostraron importantes decrementos en el área de soma ($F[1,103]=589.474$, $p<0.001$) y diámetro de soma ($F[1,103]=62.377$, $p<0.001$). Las neuronas granulares descritas mostraban de 2 a 4 dendritas primarias, las cuales no mostraban diferencias en longitud en comparación a los controles (Figura 1). La administración de nicotina no tuvo efecto en los parámetros evaluados. En la Figura 2 se muestran imágenes de neuronas granulares del hipocampo de cada grupo (Ostos-Valverde, 2015, tesis de licenciatura).

Las neuronas piramidales fueron tomadas de regiones frontales, incluían porciones de la corteza infralímbica, de las cortezas motoras y corteza primaria somatosensorial. Estas neuronas tuvieron diferencias significativas en la longitud de las dendritas entre el modelo NVHL y control ($F[1,155]=9.332$, $p<0.05$). El área del soma mostró diferencias según la condición del grupo y del tratamiento con nicotina ($F[1,155]=3.954$, $p<0.05$). Por su parte, el diámetro del soma también tuvo efecto dada la interacción del grupo y la droga ($F[1,150]=10.648$, $p=0.001$). La Figura 3 resume los resultados. Estos datos indican que la lesión temprana del hipocampo dejó consecuencias morfológicas en la conformación

somática y dendrítica de las neuronas piramidales corticales. La administración crónica de nicotina mostró un efecto en la morfología piramidal de los animales NVHL que fueron tratados. Por su parte, los animales Sham con administración de nicotina no mostraron cambios respecto al grupo Sham con salina. En la Figura 4 se muestran imágenes representativas de las neuronas piramidales (Ostos-Valverde, 2015, tesis de licenciatura).

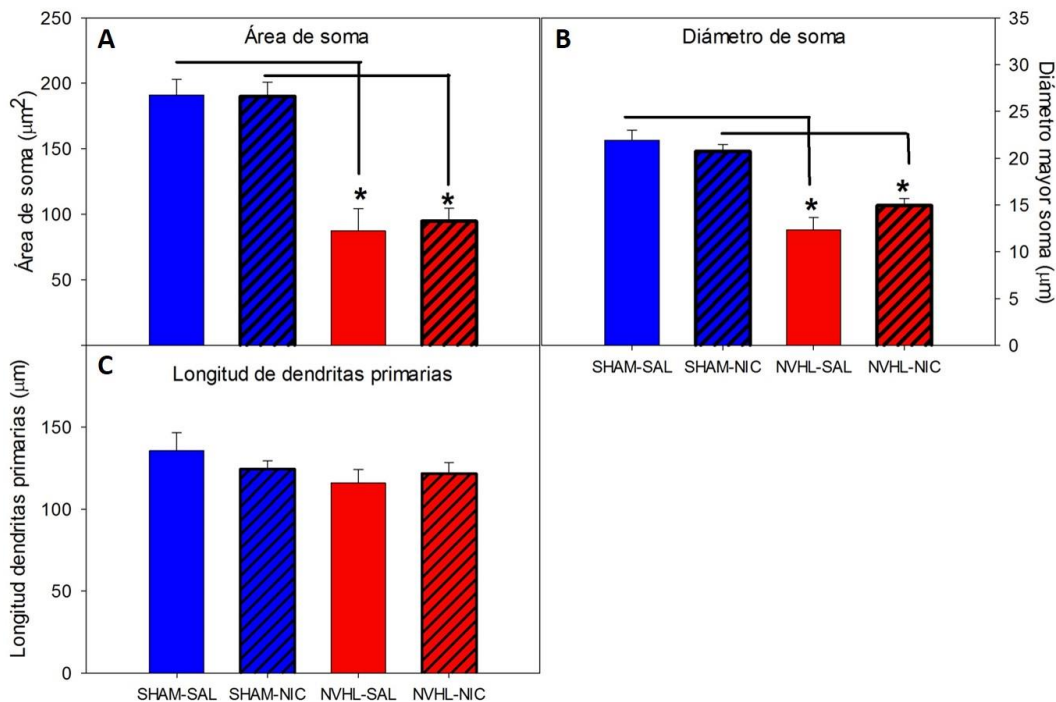


Figura 1. Análisis cuantitativo de las neuronas granulares del hipocampo. En el gráfico A se muestra la cuantificación del área del soma., las ratas Sham mostraron un área promedio de $190.534 \mu\text{m}^2$ ($\text{SEM}=9.316 \mu\text{m}^2$), mientras que los animales NVHL muestran un área de $91.021 \mu\text{m}^2$ ($\text{SEM}= 8.929 \mu\text{m}^2$). Se señalan diferencias significativas entre el modelo de esquizofrenia y el grupo control. En el panel B se muestra la cuantificación del diámetro mayor del soma, los animales Sham mostraron un diámetro promedio de $21.316 \mu\text{m}$ ($\text{SEM}= 0.703 \mu\text{m}$), y las ratas NVHL de $13.627 \mu\text{m}$ ($\text{SEM}=0.674 \mu\text{m}$), en este caso tampoco hubo efecto dado el tratamiento de nicotina. En la gráfica C se muestra la cuantificación de la longitud de las dendritas primarias. El promedio de longitud en el grupo Sham es de $130,003 \mu\text{m}$ ($\text{SEM}=5.433 \mu\text{m}$) mientras que el grupo NVHL tiene valor promedio de $118.772 \mu\text{m}$ ($\text{SEM}=5.207 \mu\text{m}$), en este caso no se mostraron diferencias según el grupo o el tratamiento con nicotina.

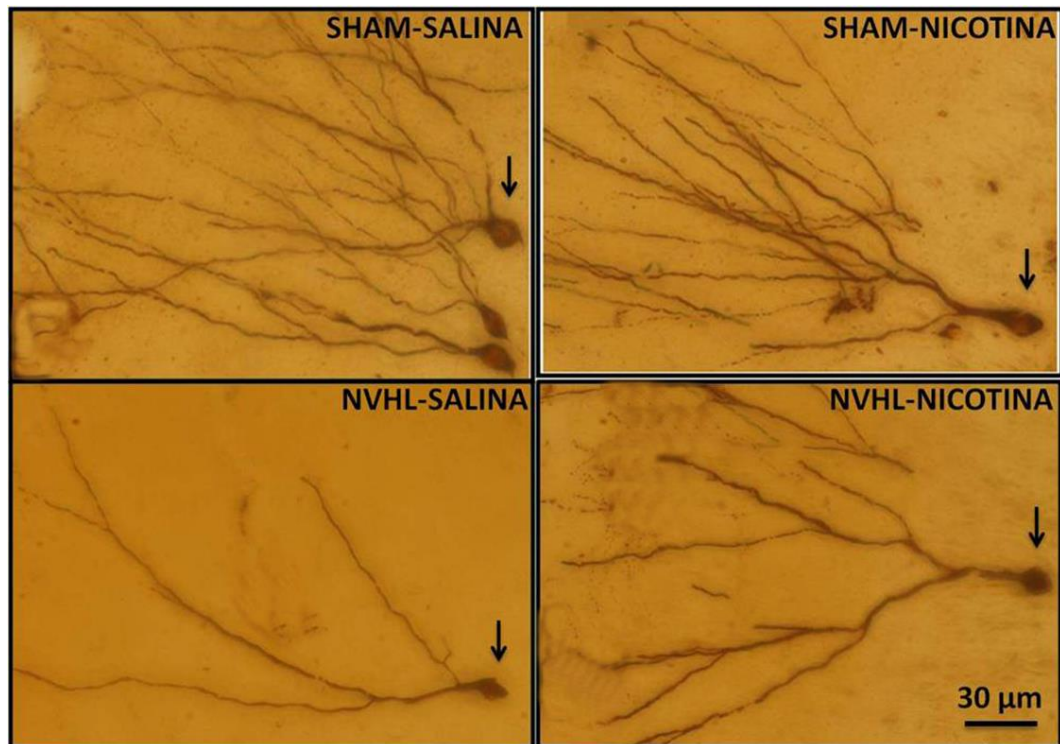


Figura 2. Fotografías representativas de las neuronas granulares hipocámpales en los 4 grupos experimentales. Se analizaron 18 neuronas en el grupo Sham-salina, 40 en el grupo Sham-nicotina, 19 en el grupo NVHL-salina y 35 en el NVHL-nicotina. La flecha señala los somas celulares donde se evidencian las diferencias en el área y diámetro del mismo. La administración de nicotina no afecta la morfología celular en ninguno de los grupos.

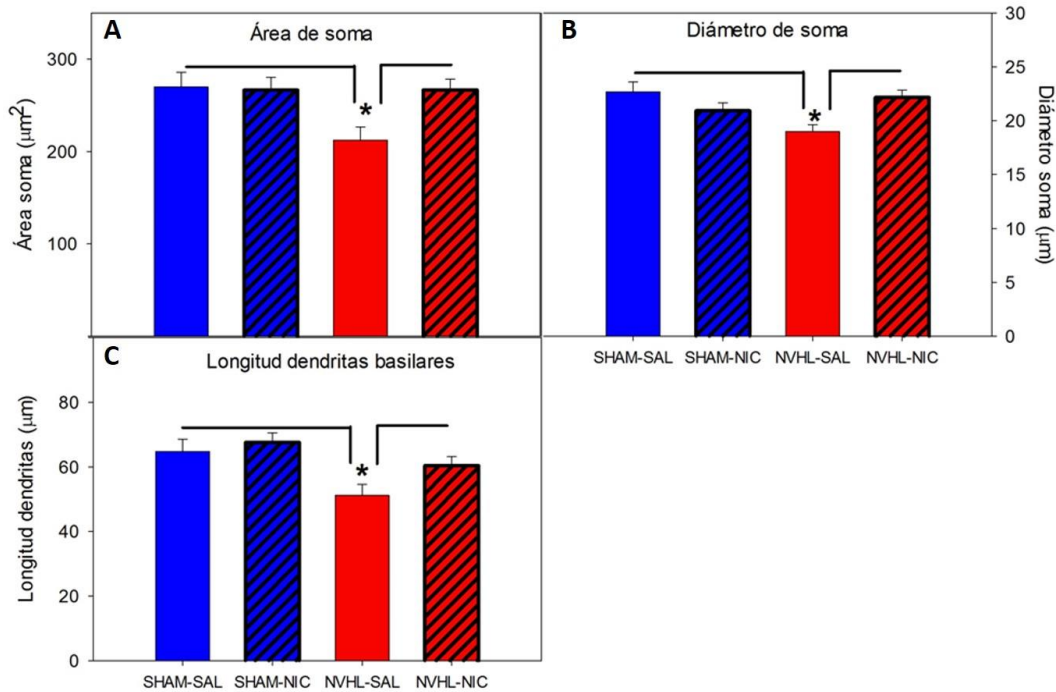


Figura 3. Análisis cuantitativo de neuronas piramidales de corteza. En el panel A se muestran los resultados de la cuantificación del área de soma. El área de soma para cada uno de los grupos fue: Sham-salina 269.714 μm^2 (SEM=17.750 μm^2), Sham-nicotina 266.206 μm^2 (SEM= 13.749 μm^2), NVHL-salina 212.230 μm^2 (SEM= 14.106 μm^2), NVHL-nicotina 266.460 μm^2 (SEM=11.833 μm^2). El análisis post-hoc reveló diferencias entre el grupo NVHL que fue tratado con solución salina y el resto de los grupos. En el panel B se muestra el diámetro de soma, en el grupo Sham-salina la media fue de 22.690 μm (SEM=0.916 μm), Sham-nicotina 20.922 μm (SEM=0.710 μm), NVHL-salina 18.980 μm (SEM=0.728 μm), NVHL-nicotina 22.144 μm (SEM=0.641 μm). La medición de la longitud de las dendritas primarias basales está indicada en el panel C, los datos que se obtuvieron por grupo son: Sham-salina 64.723 μm (SEM=4.252 μm), Sham-nicotina 67.540 μm (SEM=3.194 μm), NVHL-salina 51.214 μm (SEM=3.279 μm), NVHL-nicotina 60.357 μm (SEM=2.619 μm).

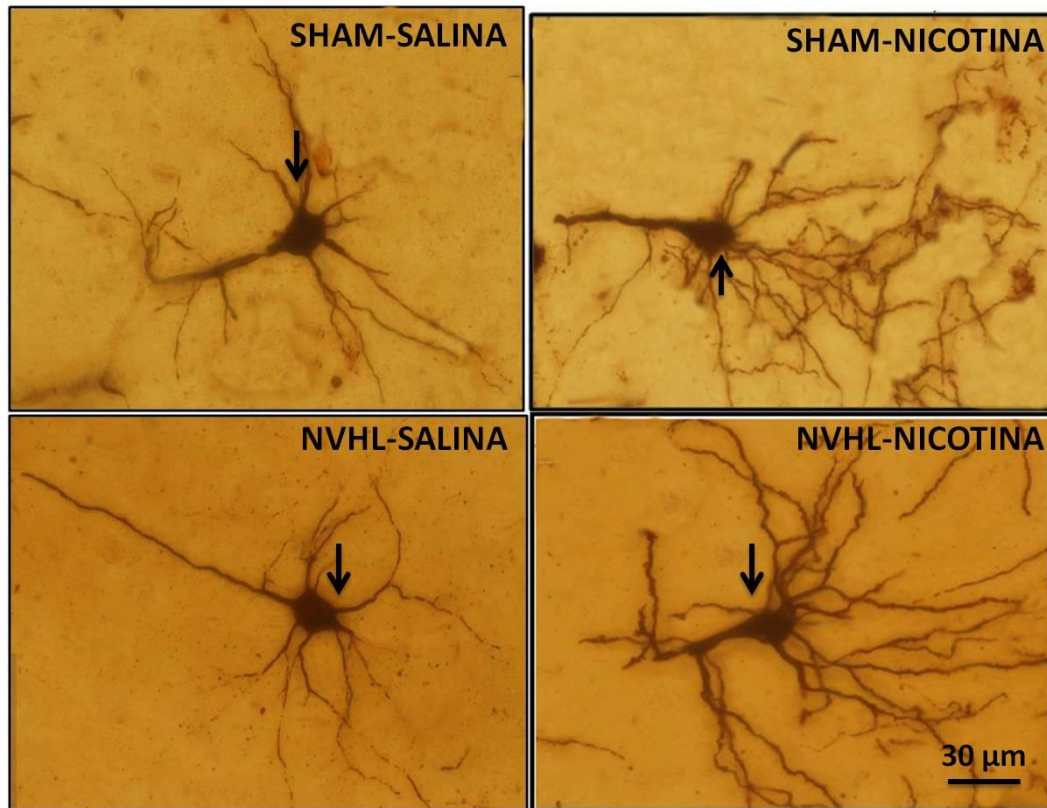


Figura 4. Fotografías representativas de las neuronas piramidales de la corteza, en los 4 grupos experimentales. Para el análisis se utilizaron 31 neuronas en el grupo Sham-salina, 45 en el grupo Sham-nicotina, 40 de animales NVHL-salina y 53 de animales NVHL-nicotina. La flecha señala los somas celulares de las neuronas en cada grupo. Los resultados indican que los animales NVHL con administración de salina mostraron menor longitud de dendritas basales, así como menor diámetro y área de soma. El tratamiento con nicotina en los animales NVHL promovió una normalización de la morfología celular cortical.

En línea con estos resultados, Ryan y cols. (2013) reportaron una disminución de la longitud de dendritas, así como menor número de espinas dendríticas, en neuronas piramidales corticales, además identificaron modificaciones en corrientes miniatura postsinápticas, tanto excitatorias como inhibitorias en porciones corticales de animales NVHL. Dicho reporte suma evidencias a favor de un desbalance excitatorio-inhibitorio cortical como sustrato de las deficiencias cognitivas en esquizofrenia (Ryan, Bhardwaj, Tse, Srivastava y Wong, 2013). Aunado a esto, nuestros resultados evidencian que la administración crónica de nicotina podría mediar sus efectos pro-cognitivos teniendo como blanco las regiones frontales corticales, debido a que las neuronas piramidales de estas regiones mostraron una importante recuperación morfológica

JUSTIFICACIÓN

Los síntomas cognitivos predicen la funcionalidad de los pacientes, sin embargo, el tratamiento de estas deficiencias se ha mantenido sin atención farmacológica desde la descripción formal del trastorno.

Es de gran relevancia determinar si la administración crónica de nicotina ayuda a revertir las deficiencias cognitivas presentes en un modelo animal de esquizofrenia, lo cual daría apoyo a la hipótesis de automedicación con nicotina. Consecuentemente es relevante determinar cuál es el impacto de la administración crónica de este fármaco a nivel molecular, particularmente en el receptor $\alpha 7$. Este receptor se muestra alterado en pacientes con esquizofrenia y muestra características farmacológicas que nos permiten inferir su papel como mediador de dicho efecto pro-cognitivo.

Determinar los mecanismos que median la acción de la nicotina en los síntomas cognitivos del modelo NVHL nos guían en la generación de nuevos tratamientos.

HIPÓTESIS

Los animales NVHL mostrarán déficits cognitivos y menores niveles de expresión del receptor nicotínico $\alpha 7$, tanto en hipocampo como en regiones corticales frontales.

Las deficiencias cognitivas del grupo NVHL y los niveles de expresión del receptor nicotínico $\alpha 7$ se verán modificados tras la administración crónica de nicotina.

OBJETIVOS

General

Determinar si la memoria de trabajo se ve comprometida en el modelo NVHL y evaluar si la administración crónica de nicotina impactará en la memoria de trabajo, así como en los niveles de expresión del receptor nicotínico $\alpha 7$

Particulares

1. Evaluar la memoria de trabajo de los animales NVHL mediante la ejecución de una tarea de laberinto radial.
2. Determinar si la administración crónica de nicotina en los animales NVHL modifica la ejecución de una tarea de laberinto radial.
3. Evaluar por Western blot los niveles de expresión del receptor nicotínico $\alpha 7$ en regiones corticales de animales NVHL tratados, y no tratados con nicotina.
4. Evaluar por Western blot los niveles de expresión del receptor nicotínico $\alpha 7$ en hipocampo de animales NVHL tratados, y no tratados con nicotina.

SUJETOS, MATERIALES Y MÉTODOS

Se generó al modelo de neurodesarrollo de esquizofrenia siguiendo la metodología original propuesta por Lipska, Jaxkiw y Weinberger (1993). Se obtuvieron 6 ratas preñadas de la cepa Sprague-Dawley. Las ratas fueron manipuladas entre los días gestacionales 18 a 22, con el objetivo de que se familiarizaran con el experimentador y minimizar el desconocimiento y rechazo de las crías. Cinco días después del parto se realizó el sexado de las crías, donde se sacrificó a las hembras de la camada para promover que los machos alcanzaran el peso óptimo para la cirugía experimental. Finalmente, cada camada quedaba conformada de 6 a 7 machos.

La cirugía se hizo en el día 7 postnatal y se realizó siempre que los animales tuvieran un peso de entre 15 y 20 gr. La anestesia se llevó a cabo mediante hipotermia, donde se colocó a las ratas en hielo por un tiempo máximo de 20 min, se corroboró que los animales no tuvieran respuesta a estímulos mecánicos y mostraran inmovilidad, así como ausencia de coloración. Con la ayuda de un aparato estereotáxico se mantuvo fija la cabeza de los animales, para realizar una incisión en la parte dorsal del cuero cabelludo y exponer el cráneo, donde se localizó Bregma. Con esta referencia anatómica se localizó el hipocampo ventral con las coordenadas AP :-3.0 mm, ML: +- 3.5 mm, se llevó a cabo la trepanación con la ayuda de una aguja de 20 ga, una vez en el tejido cerebral se deprimió la aguja de inyección -5.0 mm, para alcanzar la porción ventral del hipocampo.

Con una jeringa Hamilton se inyectaron 3 μ l de ácido iboténico (10 μ g/ μ l en líquido cerebroespinal artificial). Este ácido es un agente neurotóxico que promueve la muerte celular del tejido circundante, lesionando el hipocampo ventral y generando animales del grupo NVHL. A otro grupo de animales se les inyectó con 3 μ l de líquido cerebroespinal artificial generando animales del grupo Sham o de lesión falsa. La aguja se mantuvo en el sitio de inyección por 3 min para evitar que el líquido se retrajera y lesionara un sitio diferente al hipocampo ventral. De cada camada se seleccionaron animales de manera aleatoria para llevar a cabo la cirugía NVHL o Sham.

Se suturó a los animales una vez que el hipocampo fue intervenido de manera bilateral. Las ratas fueron retiradas del equipo estereotáxico y se les aplicó calor para promover su recuperación. Una vez que mostraban motilidad y la coloración corporal pasaba de pálido a rosado se regresaron con su madre. Los animales se mantuvieron en el bioterio con sus madres hasta el día postnatal 25, después se distribuyeron según la condición experimental a la que fueron asignados en la cirugía. Los animales se evaluaron con la tarea de laberinto radial, la cual fue seguida de una administración crónica de nicotina. Se generaron un total de 20 animales con lesión falsa o Sham y 19 animales NVHL. Una descripción detallada de la metodología llevada a cabo para generar el modelo NVHL se encuentra en el artículo de Brady (2016).

Para completar los objetivos respecto a la cuantificación del receptor $\alpha 7$ se utilizaron tejidos de los 39 animales generados en este proyecto (19 NVHL, 20 Sham; una vez que habían terminado la evaluación conductual), así como los tejidos cerebrales obtenidos de los animales utilizados en un estudio previo (Ostos-Valverde, 2015, tesis de licenciatura).

Se contaba con 900 mg de tejido hipocampal y 900 mg de tejido de corteza. Los animales se sacrificaron por decapitación, previa anestesia con Pentobarbital (1ml/kg). El tejido cerebral fue extraído y congelado con nitrógeno líquido, para preservarse a -80°C . El tejido de hipocampo o corteza fue procesado de manera independiente para aislar membranas y detectar el receptor nicotínico por la técnica de Western blot.

También se obtuvieron cerebros enteros, los cuales fueron fijados y conservados a -80°C . Después de corroborar signos de anestesia en los animales se llevó a cabo la perfusión intracardiaca con solución salina y paraformaldehído (4% en PBS), posteriormente se extrajeron los cerebros del cráneo y se mantuvieron en concentraciones progresivas de sacarosa (10%, 20% y 30%) para crioprotegerlos. Una vez que los encéfalos precipitaron en la última concentración de sacarosa, se congelaron en hielo seco y se mantuvieron en congelación a -80°C .

1. EVALUACIÓN CONDUCTUAL

Cuando las ratas alcanzaron una edad similar a la adolescencia tardía (día postnatal 50) se comenzó la evaluación conductual. La importancia de realizar este tipo de evaluación radica en que se puede identificar si los animales NVHL presentan características que mimetizan los síntomas presentes en los pacientes con esquizofrenia. Como ya se ha mencionado el modelo NVHL replica las deficiencias en memoria de trabajo presentes en los pacientes (Chambers, Moore, McEvoy y Levin, 1996., Ostos-Valverde, 2015, Tesis de Licenciatura). Si algún animal no presenta estas deficiencias podría indicarnos que la lesión no se realizó correctamente.

La tarea conductual consistió en la ejecución de laberinto radial para evaluar memoria de trabajo (Barch & Smith, 2008). El laberinto consiste en una plataforma central a la cual están conectados 6 brazos, para acceder a cada uno de los brazos siempre será necesario regresar a la plataforma central. Cada uno de los brazos contaba con un contexto diferente, lo cual permitía que el animal guiara su conducta mediante estas señales contextuales.

La visita a cada uno de los brazos se encuentra reforzada por la presencia de cereal de chocolate, sin embargo, el reforzador solo será encontrado en la primera visita, por lo que visitas subsecuentes a un mismo brazo se contabilizan como errores. En esta tarea la ejecución ideal consiste en la visita consecutiva de 6 brazos diferentes, sin repetir la entrada a ninguno de ellos.

Dado que al regresar a la plataforma central el animal se encuentra con las 6 posibilidades de brazos, incluyendo aquellos que ya visitó, el sujeto tendrá que almacenar la información de aquellos brazos en los cuales ya no encontrará reforzador y en cuáles de ellos aun estará disponible el cereal.

Para lograr que los animales se mostraran motivados para realizar la tarea se mantuvieron con alimentación restringida a 1 h de acceso a comida al día, y acceso *ad*

libitum a agua, dicha restricción alimenticia se inició 2 semanas antes de comenzar con la evaluación conductual, y se mantuvo hasta finalizar todas las fases de entrenamiento. Las sesiones fueron realizadas en un cuarto silencioso, en el cual se dejaba a los animales 15 min antes de la sesión para que se aclimataran al contexto. El laberinto no se movió a lo largo de todas las sesiones, y era limpiado con alcohol al 10% entre cada uno de los animales evaluados. La ejecución fue videograbada con ayuda del software Any-Maze (San Diego Instruments Co. San Diego, USA). La evaluación conductual consistió en tres fases de entrenamiento: 1) Entrenamiento de elección libre, 2) Entrenamiento con interrupciones, 3) Entrenamiento con administración de nicotina.

En la primera sesión los animales fueron expuestos al cuarto experimental y al laberinto sin reforzador durante 10 min, esto para promover habituación y evitar muestras de ansiedad en las sesiones de entrenamiento.

En la fase de entrenamiento con elección libre el animal fue colocado en la plataforma central, confinado mediante una guillotina, la cual se levantó 10 seg después de que el animal fue colocado. Una vez liberados se les permitió la elección de cualquiera de los brazos. El ensayo terminó cuando el animal visitaba cada uno de los 6 brazos al menos una vez o se mantenía en el laberinto por un máximo de 300 seg. Cada sesión consistía en un ensayo por animal, y solo había una sesión por día. Después de 8 sesiones los animales comenzaron la segunda fase. Se obtuvieron diversas medidas conductuales:

- Tiempo total de ejecución.
- Tiempo promedio de visita a un brazo.
- Errores. La ejecución ideal del laberinto consiste en la entrada a los 6 brazos sin repetir la entrada a ninguno, visitando un brazo nuevo en cada ocasión. Por lo tanto, más de 6 visitas en el periodo de la sesión constituye errores, ya que los animales reingresan a brazos sin reforzador.
- Tiempo de error donde se cuantifica el tiempo promedio gastado en visitas a brazos sin reforzador.

- Entradas antes de repetir (EAR), es decir el número de brazos con reforzador visitados antes de reingresar a un brazo sin reforzador. Esta medida es un indicador de la capacidad de la memoria de trabajo de los animales, ya que nos indica cuántos elementos puede almacenar el animal antes de cometer un error.

En la fase de entrenamiento con interrupciones los animales fueron confinados en la plataforma central después de la tercera elección de brazo. El confinamiento añadía un reto mayor a la ejecución, ya que durante diferentes intervalos de tiempo (10s, 30 s, 90 s o 180 s.) los animales tenían que almacenar la información de los brazos que ya habían visitado. Todos los animales fueron evaluados con todos los diferentes valores de las interrupciones de manera contrabalanceada. Una vez que el animal elegía los 6 brazos diferentes o que había ejecutado activamente durante 300 segundos era retirado del laberinto. Los parámetros medidos en esta fase fueron:

- Tiempo de completamiento de laberinto
- Tiempo promedio de visita a un brazo
- Errores totales
- Tiempo promedio de error
- Entradas antes de repetir (EAR)
- Tiempo de ejecución previo al confinamiento
- Tiempo de ejecución posterior al confinamiento
- Errores de brazos visitados previos al confinamiento
- Errores de brazos visitados posteriores al confinamiento

Finalmente se inició con la fase de administración de fármacos, donde tanto los animales NVHL como los animales Sham fueron asignados al azar a un grupo de administración crónica de nicotina o solución salina. La administración consistió en dos inyecciones subcutáneas al día (0.5 mg/kg), teniendo una administración total de 1 mg/kg al final de día, se ha reportado que esta dosis mimetiza el alto consumo de nicotina presente en los pacientes con esquizofrenia, llegando a niveles plasmáticos de 25 ng/ml (Matta *et al.*, 2006). Una vez que los animales habían cumplido con dos semanas de administración

se reinició la evaluación conductual mediante el entrenamiento con interrupciones, las medidas conductuales obtenidas fueron las mismas que en la fase anterior. Al finalizar esta sesión se contaba con 4 grupos experimentales;

1. Animales Sham con administración de solución salina= 10
2. Animales Sham con administración de nicotina=10
3. Animales NVHL con administración de solución salina=10
4. Animales NVHL con administración de nicotina=9

2. CORROBORACIÓN DE LESIÓN

Una vez que fue finalizada la evaluación conductual se procedió a la obtención de tejido neural. 13 animales Sham y 12 animales NVHL fueron perfundidos intracardiamente para obtener su cerebro. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital, una vez que no mostraban respuesta ante un estímulo nociceptivo (presión en la cola) se procedió a exponer la cavidad torácica. Se insertó una aguja en el ventrículo izquierdo del corazón, mediante la cual se dejó pasar solución salina a través del sistema circulatorio de los animales, permitiendo lavar los vasos y capilares. Finalmente se utilizó PFA 4% en PBS como solución fijadora. Los encéfalos fueron crioprotectados en concentraciones crecientes de sacarosa en PBS y almacenados a -80°C.

Para la corroboración de la lesión se usaron los cerebros de 3 animales Sham y 3 animales NVHL. Se obtuvieron cortes coronales de 40 µm que incluían al hipocampo en el eje antero-posterior. Se realizó la tinción de hematoxilina-eosina, la cual permite identificar el núcleo como el citoplasma de las células y de esta manera identificar la densidad celular en la zona de interés.

Los tejidos fueron rehidratados progresivamente con xileno, alcohol 100%, alcohol 96%, alcohol 80% y agua, para posteriormente sumergirlos en hematoxilina, después de realizar lavados el tejido fue sumergido en eosina. Finalmente se deshidrataron con alcohol en concentraciones crecientes y se montaron en Entellan.

3. WESTERN BLOT

Se procedió a la disección de tejido hipocampal y cortical una vez que los animales habían finalizado la evaluación conductual. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital y sacrificados por decapitación en una guillotina. El cráneo fue removido cuidadosamente para extraer el cerebro completo, el cual se enjuagó con PBS frío. Con la ayuda de un bisturí se extrajeron porciones corticales o hipocampales. Se obtuvo tejido de 7 animales Sham y 8 animales NVHL. El tejido se congeló en nitrógeno líquido, posteriormente se obtuvieron las membranas de un pool de tejidos de corteza, así como extracciones de un pool de tejidos de hipocampo.

Se realizaron cinco extracciones de hipocampo y cinco extracciones de corteza, aprovechando el material biológico obtenido de los animales utilizados en el reporte previo (Ostos-Valverde, 2015, tesis de licenciatura), así como del tejido de los animales generados para este reporte.

La extracción de proteínas de membrana se realizó mediante la técnica descrita en Miledi, Dueñas, Martínez-Torres, Kawas, y Eusebi (2004). Brevemente, el procedimiento consiste en la homogenización del tejido en Buffer de Glicina acompañado de inhibidor de proteasas, para una posterior centrifugación de 13,000 rpm a 4°C, el sobrenadante resultante contendrá a las proteínas totales del tejido. La separación de membranas se realizó ultracentrifugando dicho sobrenadante a una velocidad de 49,000 rpm durante 2 h, al finalizar este paso se obtiene un pellet. El receptor $\alpha 7$ se encuentra principalmente en la membrana plasmática, es por esto que nos fue ventajoso obtener membranas, promoviendo una mejor detección del receptor mediante el Western blot.

La cuantificación de la concentración de proteínas se realizó mediante el método de Bradford. Se obtuvo un rendimiento promedio del 20 %. Para el Western blot se preparó un gel de poliacrilamida al 10% entre dos placas de vidrio, se cargaron 15 μ g de proteína de cada uno de los cuatro grupos (NVHL-salina, NVHL-nicotina, Sham-salina, Sham-nicotina) y se procedió a realizar una electroforesis en dicho gel, separando las proteínas

de cada muestra según su peso molecular. Posteriormente se hizo una electrotransferencia a una membrana de polifloruro de vinilideno (PVDF), en donde se detectó el receptor $\alpha 7$ mediante un anticuerpo selectivo para el mismo (ABCAM ab182442, 1:2000), este fue detectado por un anticuerpo secundario, el cual estaba conjugado con fosfatasa alcalina, con lo que pudo revelarse la presencia del receptor (Santa Cruz SC-2034, 1:5000). Se utilizó la proteína α -actina como proteína de referencia, esta fue identificada con un anticuerpo primario (Santa Cruz SC-1616, 1:5000) y posteriormente con un anticuerpo secundario (Santa Cruz SC-2771, 1:5000) específico para el huésped del anticuerpo primario (Taylor y Posch, 2014).

Se evidenció la presencia del receptor con un kit de revelado (Biorad cat# 170-6432), se capturó la señal de las proteínas en las membranas de PVDF, mediante un fotodocumentador. Con ayuda del software ImageLab (Biorad) se analizó la densidad de pixeles asociada a cada marca en la membrana.

4. ANÁLISIS DE DATOS

Todos los datos fueron analizados usando el programa SigmaPlot 11.0. La comparación de la ejecución de los animales en la fase de elección libre del laberinto radial se hizo mediante un ANOVA de dos vías de medidas repetidas, teniendo como factor entre-grupos el efecto de lesión, es decir, comparando la ejecución de los animales NVHL vs animales Sham; y como efecto intra-grupos los bloques de las sesiones.

En la fase de entrenamiento con interrupciones se realizó un ANOVA de dos vías, teniendo como factores el grupo (NVHL o Sham), y la magnitud de interrupción en la ejecución del laberinto (10s, 30s, 90s o 180s). En la fase de administración de fármacos fue necesario utilizar un ANOVA de tres vías que nos permitiera analizar el efecto de grupo (NVHL o Sham), el efecto de la interrupción (10s, 30s, 90s o 180 s.), el efecto del historial de administración (salina o nicotina), así como la interacción entre estas variables. Se utilizó la prueba de Tukey para identificar diferencias estadísticamente significativas entre grupos particulares.

Para realizar el análisis de la señal del Western blot se registró el cociente de la señal detectada de receptor $\alpha 7$ sobre la de actina. El análisis de datos se llevó a cabo mediante un ANOVA de dos vías, teniendo en cuenta el factor de grupo (NVHL o Sham) y el historial de administración (nicotina o salina).

RESULTADOS

1. CORROBORACIÓN DE LESIÓN

La tinción histológica de hematoxilina-eosina mostró la ubicación anatómica de la lesión y si se encontraba de manera bilateral en las porciones ventrales del hipocampo.

Aquellos animales que fueron expuestos a la cirugía estereotáxica y que les fue administrado líquido cefalorraquídeo artificial mostraron una morfología de hipocampo normal, esto era evidente desde porciones anteriores, correspondientes a -3.3 mm relativo a Bregma, hasta regiones posteriores; en las cuales se identifica la porción ventral del hipocampo. En contraste, los animales a los que se les administró ácido iboténico mostraron un desarreglo en la morfología, consistente con la región del hipocampo ventral, mientras que la porción dorsal del hipocampo se mantuvo relativamente intacta. Los ventrículos laterales que acompañan al hipocampo se mostraron alargados. Este resultado fue consistente en todos los encéfalos de animales NVHL a los que se les tiñó con Hematoxilina-Eosina.

En el hipocampo de animales NVHL se observa degeneración celular y alargamiento del ventrículo en comparación con el del grupo Sham (Figura 5). Todos los animales que tuvieron administración de ácido iboténico en la cirugía estereotáxica mostraban algún signo de degeneración del hipocampo bilateral, por lo que ningún sujeto tuvo que ser excluido del análisis de datos.

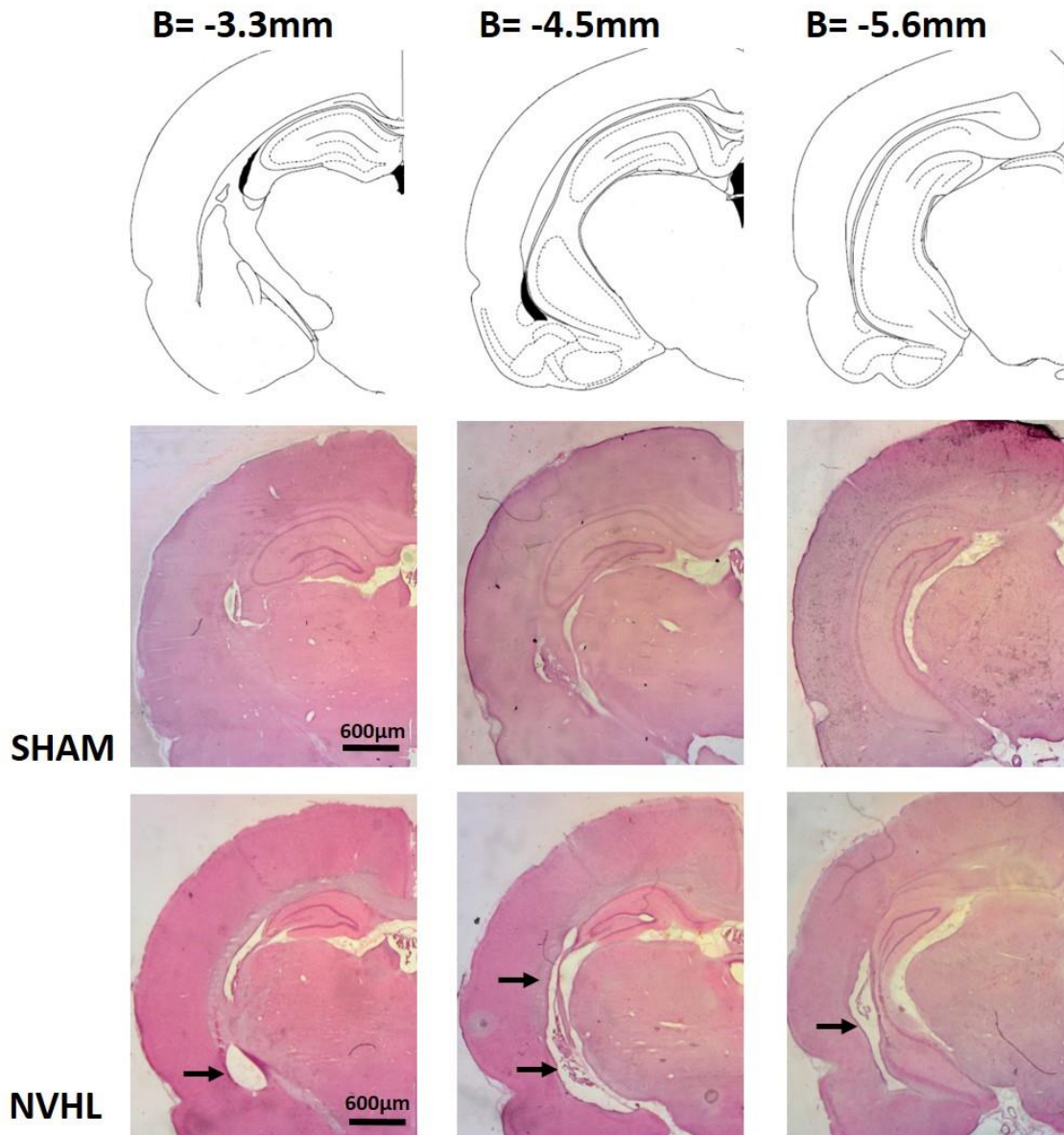


Figura 5. Corroboración de lesión mediante la tinción de hematoxilina-eosina. Se contrasta la anatomía del hipocampo a lo largo del eje anterior-posterior, identificando tres cortes anatómicos relativos a Bregma (-3.3mm, -4.5 mm, -5.6mm). En el panel superior se muestran los modelos anatómicos del encéfalo de rata (modificado de Paxinos y Watson, 2007). Estos modelos anatómicos permiten contrastar la morfología normal mostrada en los cortes del grupo Sham (panel intermedio), y evidenciar la degeneración celular, así como el alargamiento ventricular de los animales NVHL (panel inferior). En los cortes del grupo NVHL se indica con flechas las porciones del hipocampo ventral, se resalta el impacto del ácido iboténico en estas regiones, encontrando un menor impacto en las porciones dorsales del mismo.

2. EVALUACIÓN CONDUCTUAL

Fase de elección libre

Las deficiencias en la ejecución del laberinto radial en los animales NVHL se hicieron evidentes desde la primera fase de evaluación. En las primeras dos sesiones tanto los animales NVHL como los animales Sham visitaban alrededor de 9 brazos, pero a partir de la tercera sesión su ejecución se fue diferenciando. Para las últimas sesiones los animales Sham visitaba un máximo de 7 brazos, mientras que los NVHL se mantenían por arriba de los 10 brazos.

El número de entradas antes de repetir (EAR), se refiere a brazos nuevos que visitaba un animal antes de cometer un error, y se considera una medida directa de la capacidad de almacenamiento de la memoria de trabajo de un animal. Hacia el final del entrenamiento (sesiones 7 y 8) los animales Sham podían almacenar la información de al menos 5 brazos antes de cometer un error, mientras que los animales del grupo NVHL almacenaban la información de 4 brazos en promedio (Figura 6A). El análisis estadístico reveló diferencias significativas según el grupo experimental ($F[1,325]= 36.240, p<0.001$); el tiempo de entrenamiento también tuvo un impacto significativo en la ejecución de los animales ($F[3,325]= 13.364, p<0.001$). Esto quiere decir que ambos grupos mejoraron su ejecución a lo largo de las sesiones, aumentando el número de brazos almacenados conforme avanzaban las sesiones, pero siendo más eficiente en el caso del grupo Sham. Estos resultados nos indican una marcada deficiencia en la capacidad de almacenamiento del grupo NVHL, la cual se mantuvo a lo largo de todo el entrenamiento.

En cuanto al tiempo total de ejecución, los animales contaban con un máximo de 300 seg para completar el laberinto, sin embargo, al inicio del entrenamiento utilizaban 200 seg en promedio para completarlo. Al finalizar esta fase de entrenamiento los tiempos de ejecución de ambos grupos disminuyeron notablemente, se mostró un efecto significativo según la sesión de entrenamiento ($F[3,324]= 43.406, p<0.001$). Esto nos indica que ambos grupos aprendieron a hacer más eficiente la tarea (Ver Figura 6B). También se encontró un efecto por grupo ($F[1,324]= 18.326, p<0.001$) ya que, en las últimas sesiones

los animales Sham terminaban el laberinto en 103 seg (SEM=6.613), mientras que el grupo NVHL completaba la ejecución en 132 seg (SEM=6.613).

En el tiempo promedio que un animal pasaba en la visita a un brazo no se encontraron diferencias significativas según el grupo ($F[1,324]= 0.0667$ $p=0.797$), lo cual nos indica que ambos animales estuvieron expuestos la misma cantidad de tiempo a las señales contextuales de cada brazo, y un efecto de atención no sería el responsable de las diferencias en memoria de trabajo de los animales. El análisis estadístico reveló un efecto intra-sujetos, es decir, los tiempos promedios de visita a cada brazo fueron disminuyendo al paso de las sesiones ($F[1,324]= 16.688$ $p<0.001$)

Al inicio del entrenamiento ambos grupos cometían alrededor de 3 errores, es decir reingresaban en promedio a 3 brazos que ya no contenían reforzador. Hacia el final de esta fase de entrenamiento los animales NVHL se mantenían reingresando a 4 brazos sin reforzador, mientras que los animales del grupo Sham disminuyeron notablemente la cantidad de errores, reingresando a 1 brazo en promedio. La estadística muestra diferencias significativas entre los grupos ($F[1,324]= 38.448$ $p<0.001$). El análisis *post-hoc* indicó que la cantidad de errores es diferente entre los grupos a partir de la sesión 3 y hasta el final del entrenamiento (Figura 7A).

También se evaluó el tiempo de error, es decir, el tiempo promedio que los animales pasaban en brazos donde ya no había reforzador. Se encontró un efecto debido al grupo ($F[1,324]= 41.393$ $p<0.001$), así como un efecto debido al número de la sesión ($F[3,324]= 15.524$ $p<0.001$). La interacción de ambas variables también mostró un efecto significativo ($F[3,324]= 2.736$ $p=0.044$). El análisis *post-hoc* indica que el tiempo de error entre los grupos era igual al inicio del entrenamiento, sin embargo, la ejecución entre los grupos se fue diferenciando a partir de la tercera sesión. El grupo NVHL se mantuvo reingresando a brazos sin reforzador a lo largo de todo el entrenamiento, sugiriendo deficiencias en la memoria de trabajo. Los resultados respectivos a la cantidad de errores y el tiempo de error se grafican en la Figura 7B.

La ejecución de la tarea sugiere que hay una afectación en la memoria de trabajo del grupo NVHL, similares a las deficiencias cognitivas encontradas en los pacientes con esquizofrenia.

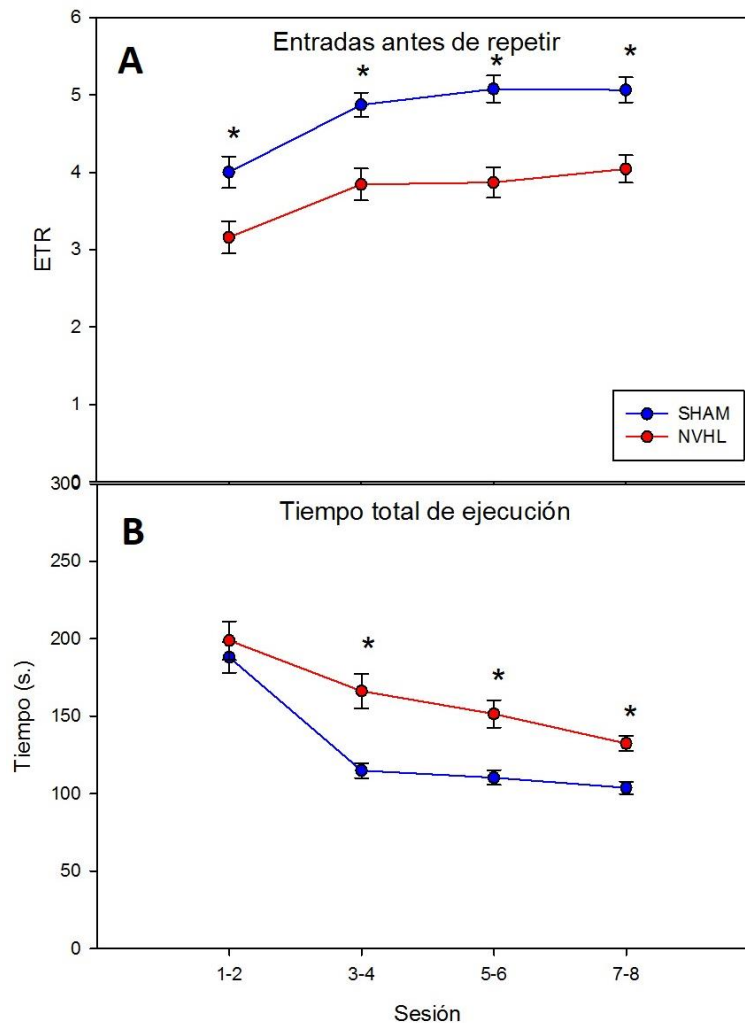


Figura 6. Entradas antes de repetir y tiempo total de ejecución en la fase de elección libre. La línea azul muestra la ejecución del grupo Sham, mientras que la línea roja indica los valores de los animales NVHL a lo largo de las sesiones. La misma nomenclatura será usada subsecuentemente. Las entradas antes de repetir brazo se refiere al número de brazos nuevos visitados antes de cometer un error y se correlaciona con la capacidad de almacenamiento de la memoria de trabajo. El análisis estadístico indica diferencias por grupo (<0.001) y por sesión (<0.001). En el panel inferior se grafica el tiempo total de ejecución, donde se muestra que ambos grupos exploran el laberinto la misma cantidad de tiempo en las primeras sesiones, al paso del entrenamiento los animales Sham disminuyen sus tiempos en comparación con el grupo NVHL (<0.001), sin embargo, el paso de las sesiones también afecta la ejecución en ambos grupos (<0.001).

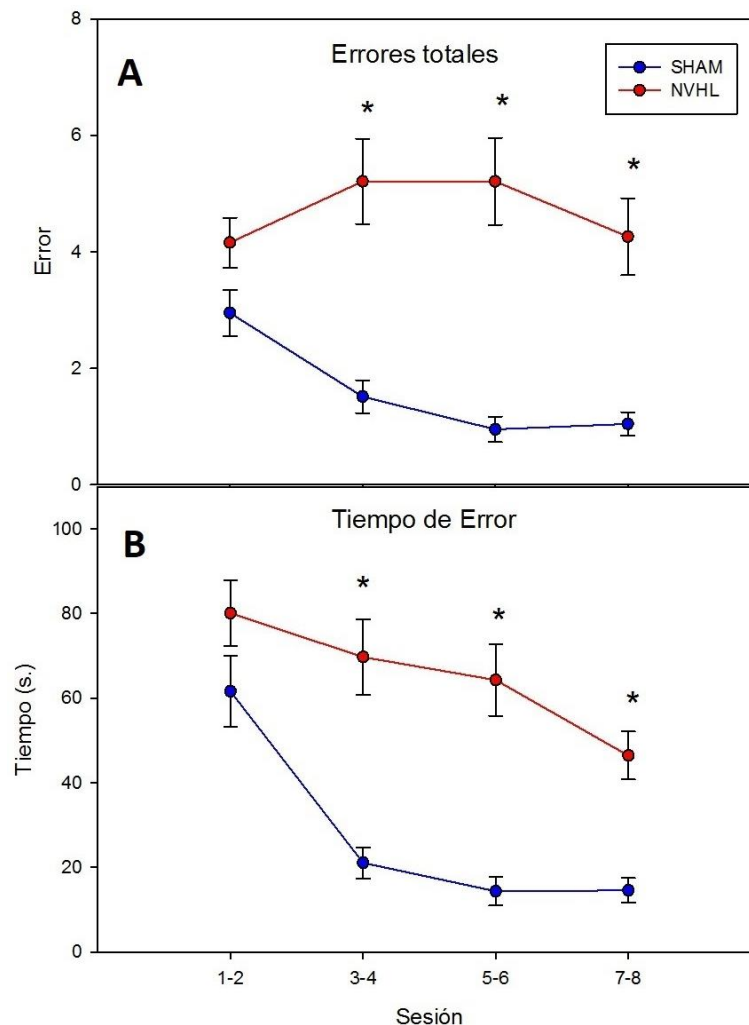


Figura 7. Errores totales y tiempo de error en la fase de elección libre. En la gráfica superior se muestra el número de visitas a brazos sin reforzador que tuvieron ambos grupos. Al inicio del entrenamiento ambos cometían una cantidad similar de errores, pero conforme pasaron las sesiones, los animales Sham decrementaron este valor. El grupo NVHL muestra deficiencias en memoria de trabajo, ya que continuaba reingresando a brazos sin reforzador. En el panel inferior se muestra el tiempo de la sesión invertido en brazos erróneos. De nuevo se muestra que el grupo Sham fue capaz de disminuir el tiempo gastado en brazos sin reforzador, mientras que las ratas NVHL se mantenían hasta 60 segundos en brazos donde ya no encontrarían reforzador. Se indican las diferencias significativas (<math><0.001</math>).

Fase de entrenamiento con interrupciones

En esta fase los animales eran confinados en la plataforma central por periodos de 10, 30, 90, o 180 seg tras la elección del tercer brazo. Las interrupciones se realizaron con la finalidad de agregar un reto mayor a la memoria de trabajo de los animales, ya que tenían que almacenar durante el periodo de interrupción aquellos brazos que ya habían sido visitados. En esta fase de entrenamiento también se obtiene información sobre las afectaciones que hay en la memoria de trabajo, según la magnitud de interrupción dada. En reportes previos se ha encontrado que las demoras de 60 o 180 segundos producen afectaciones moderadas en la memoria de trabajo, mientras que las interrupciones de 60 minutos producen un desvanecimiento total de la memoria de brazos visitados (Dudchenko, 2004).

Para la medida de entradas antes de repetir se encontró un efecto por grupo ($F[1,163]=20.949$, $p<0.001$), no hubo efecto según la magnitud de la interrupción, lo que indica que el tiempo en confinamiento no fue suficiente para impactar en los elementos que los animales almacenaban. Sin embargo, el efecto por grupo indica que, aunque se ponía un reto mayor a los animales Sham, estos seguían ejecutando mejor que el grupo NVHL (Ver Figura 8A).

El tiempo que tardaron los animales en completar el laberinto también mostró diferencias según el grupo ($F[1,163]=13.070$, $p<0.001$), y según la magnitud de interrupción ($F[3,163]=5.171$, $p<0.002$), en este sentido, las interrupciones de 10 y 30 segundos resultaban en ensayos más breves que las interrupciones de 180 segundos, asimismo, los animales Sham terminaban la ejecución antes que el grupo NVHL, pero la interrupción de 180 seg fue similar para ambos grupos (Figura 8B).

El tiempo promedio que los animales pasaban en cada brazo mostró un efecto según la magnitud de la interrupción ($F[1,155]=4.345$, $p=0.006$), ya que a mayor confinamiento los animales tienden a pasar más tiempo en la visita de cada brazo. El grupo Sham pasaban en promedio 14.9 seg (SEM=0.036) por brazo, mientras que el grupo NVHL pasaba 12.8 seg (SEM=0.37).

La cantidad de errores cometidos mostró un efecto por grupo ($F[1,155]= 40.481$, $p<0.001$), mientras que la magnitud de la interrupción no mostró efecto en esta variable. Los animales NVHL cometían alrededor de 4 errores por sesión, sin importar el tiempo que hubiesen sido confinadas, mientras que el grupo Sham cometía alrededor de 2 errores por sesión (Figura 9A). El tiempo que los animales invertían en brazos sin reforzador mostró un efecto por grupo ($F[1,155]= 35.278$, $p<0.001$). El grupo NVHL pasaba alrededor de 50 seg de la sesión en brazos donde no encontraría alimento, este valor se mantuvo constante sin importar la magnitud de la interrupción. Sin embargo, los animales Sham se vieron afectados por el tiempo de interrupción, en este caso mostraban tiempos de error bajos para la interrupción de 10 seg (19.11 seg, SEM=6.6), pero cuando la interrupción duró 180 seg, se mantuvieron en brazos erróneos por periodos de 43 seg (SEM=6.608), asemejando su ejecución a la del grupo NVHL. Estos resultados indican que la memoria de trabajo del grupo Sham se ve afectada de manera gradual, en correspondencia con la magnitud de interrupción que sea presentada, dichas interrupciones suponen un reto mayor al mantenimiento de información en la memoria de trabajo. La pobre ejecución de los animales NVHL no se vio comprometida con la introducción de demoras (Ver Figura 9B).

No se mostraron diferencias significativas en el tiempo de ejecución previa al confinamiento, los animales tardaban alrededor de 60 seg en la visita a los tres primeros brazos. El tiempo de ejecución posterior al confinamiento mostró un efecto según el grupo evaluado ($F[1,155]= 11.433$ $p<0.001$) y según la magnitud de la interrupción ($F[3,155]= 4.465$ $p=0.005$), esto indica que las interrupciones más largas incrementaban el tiempo en que los animales completaban la ejecución del laberinto, sugiriendo un reto mayor en la evocación de los brazos visitados.

También nos fue interesante explorar la fuente de los errores para ambos grupos, es decir, si los reingresos a brazos sin reforzador correspondían a los primeros tres brazos visitados, por lo tanto, los primeros en codificarse; o si era más probable cometer errores reingresando a brazos visitados después del confinamiento. Los resultados indican que

la información codificada en la primera parte de la sesión es la más lábil, ya que ambos grupos olvidan la información contextual de estas visitas y reingresan una vez que se termina el confinamiento. Los errores cometidos por el reingreso a los primeros 3 brazos visitados muestra un efecto por grupo ($F[1,155]= 44.723$ $p<0.001$), los animales NVHL cometían al menos 4 errores de este tipo, sin importar la magnitud de la interrupción, por otro lado, los animales Sham reingresaban de 1 a 2 brazos (Figura 10A).

El análisis de los errores cometidos al reingresar a un brazo visitado después del confinamiento indica que hay un efecto según el grupo ($F[1,155]= 16.399$ $p<0.001$), no se observa un efecto según la magnitud de la interrupción. Después de que la ejecución de los animales era interrumpida tenían la oportunidad de visitar 3 nuevos brazos que aun contenían reforzador, esta nueva información codificada no era tan lábil, ya que se reingresaba en menor medida a estos brazos. El grupo Sham no mostraba errores de este tipo, indicando una buena codificación y recuperación de información, mientras que el grupo NVHL cometía 1.6 errores de este tipo mostrando deficiencias en la memoria de estos brazos recién codificados. Estos resultados se muestran en la Figura 10B.

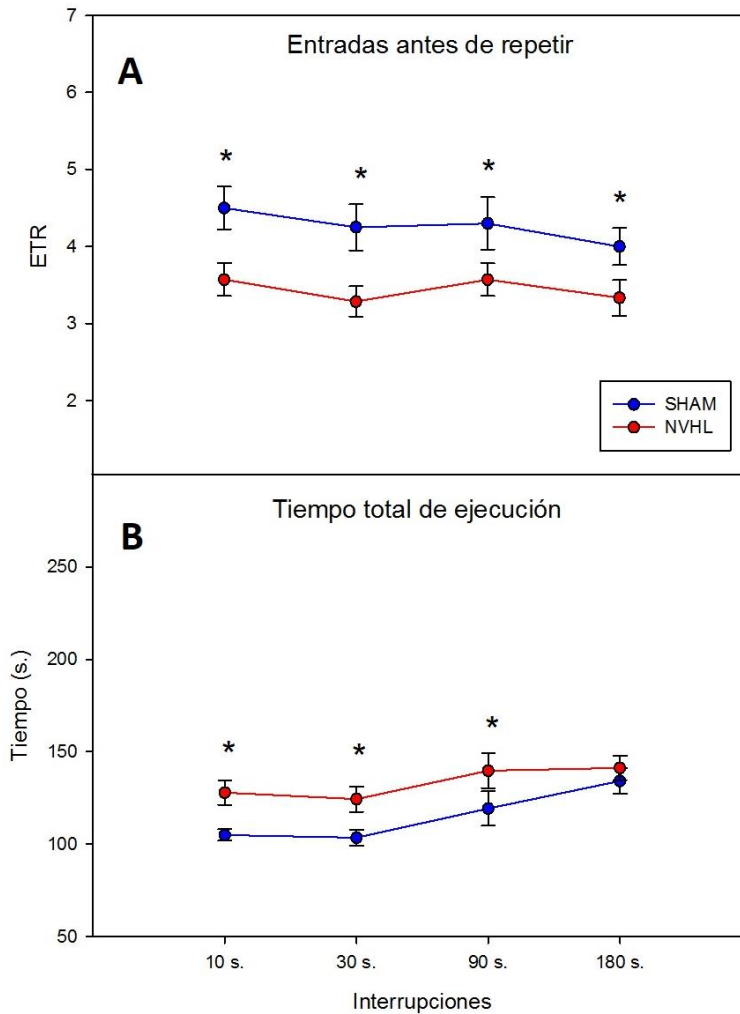


Figura 8. Entradas antes de repetir y tiempo total de ejecución en la fase de entrenamiento con interrupciones. En el panel superior se muestra la medida EAR, se observa que el número de brazos almacenados en la memoria de trabajo se mantiene relativamente constante para los dos grupos, los valores no se modifican según el tiempo que los animales fueron confinados en la plataforma central. En la gráfica inferior podemos observar que el tiempo que los animales tardan en completar el laberinto es menor para el grupo Sham, pero si la interrupción dura 180 segundos, ambos grupos tardarán lo mismo, este resultado indica que la interrupción más larga fue capaz de enlentecer la ejecución del grupo Sham.

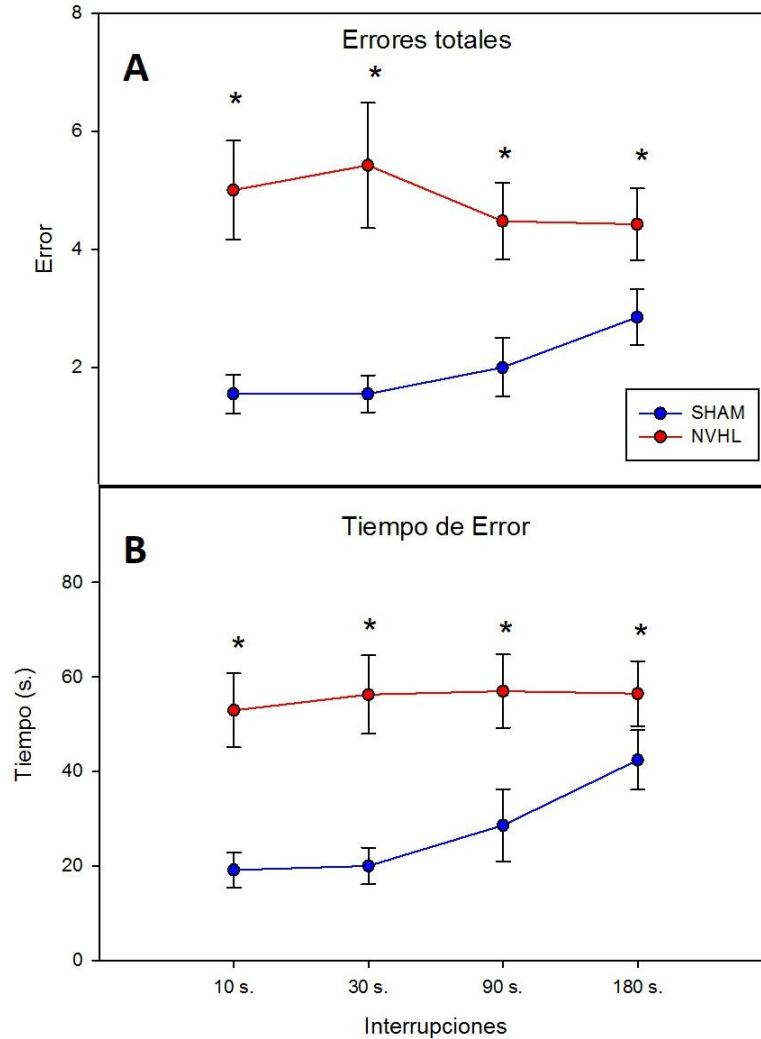


Figura 9. Errores totales y tiempo de error en la fase de entrenamiento con interrupciones. En la gráfica superior se observa que la cantidad de errores en el grupo NVHL se mantiene constante sin importar la duración de la interrupción, cometiendo más de 4 errores por sesión. Mientras que el grupo Sham muestra un ascenso de la cantidad de errores mientras aumenta el tiempo de la interrupción. En el panel inferior se observa el tiempo que los animales destinaban a brazos sin reforzador, en todos los casos los animales NVHL tuvieron valores más altos, indicando una deficiencia en la memoria de trabajo de este grupo. De manera interesante, se puede resaltar que los animales Sham mostraron un incremento gradual de este valor, indicando que el reto en la memoria de trabajo de este grupo se vio afectada por el grado de interrupción. Cuando los animales tenían una interrupción pequeña (10 segundos) la cantidad de tiempo que gastaban en brazos erróneos era de 20 segundos en promedio, mientras que la mayor de las interrupciones (180 segundos) les representaba alrededor de 40 segundos en brazos erróneos.

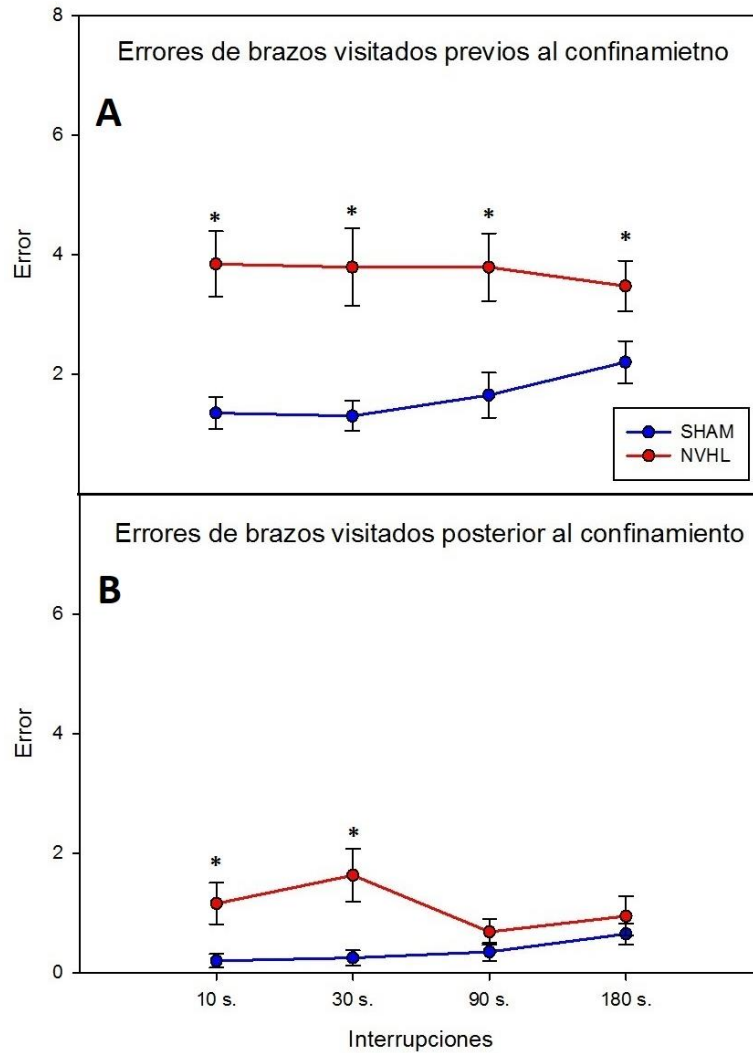


Figura 10. Errores de brazos visitados de manera previa y posterior al confinamiento en la fase de entrenamiento con interrupciones. Es importante determinar si la mayoría de los errores provienen de los brazos codificados en la primera parte de la sesión, o por el contrario proviene de los brazos visitados después del confinamiento. En la gráfica superior se identifica que la información de los brazos visitados previos a confinamiento es más lábil y produce más errores en ambos grupos. Cabe resaltar que los animales NVHL mantienen un alto índice de errores, mientras que el grupo Sham tiende a aumentar la cantidad de errores mientras más grande sea la interrupción en el laberinto. En el panel inferior se observa una menor cantidad de errores proveniente de información codificada después del confinamiento. El grupo Sham mantiene valores cercanos a 0 sin importar el tiempo que su ejecución fue interrumpida. El grupo NVHL muestra errores de este tipo, sugiriendo errores en la codificación y almacenamiento de información reciente.

Fase de administración de fármacos

En esta fase los animales continuaban bajo el paradigma de interrupciones, donde después de la tercera elección de brazo eran confinados en la plataforma central por los periodos de tiempo antes mencionados.

En este caso se tienen tres variables que modifican los resultados, tanto el grupo (NVHL vs Sham), los cuatro diferentes valores del confinamiento (10, 30, 90 o 180 seg) y el historial de administración de fármaco (solución salina vs nicotina).

En el caso de las entradas antes de repetir brazo se identificó un efecto por grupo ($F[1,184]= 5.701$ $p= 0.018$), a pesar de no encontrar un efecto explicado por el fármaco, o la interacción entre la droga administrada y el grupo, en la gráfica podemos identificar un aumento en la capacidad de almacenamiento de memoria de trabajo en aquellos animales NVHL tratados con nicotina. La ejecución de animales Sham con administración de nicotina o solución salina se mantiene constante (Figura 11A).

En el tiempo total de ejecución se encontró un efecto debido al grupo ($F[1,184]= 6.840$ $p=0.010$). Coincidiendo con la ejecución en las fases de entrenamiento previas, los animales Sham completaban el laberinto en menor tiempo ($103.786 \pm 3.122s.$) en comparación con el modelo de esquizofrenia ($115.425 \pm 3.171s$). El fármaco administrado también explicaba la varianza de los datos de manera modesta ($F[1,184]= 4.633$ $p=0.033$), en este caso un historial de administración con nicotina predecía una ejecución más rápida que un historia de administración de solución salina (Figura 11B).

El número de errores totales que cometían los animales fue diferente según el grupo al que pertenecían ($F[1,185]=40.490$, $p<0.001$). Existe un efecto dada la interacción entre el grupo y la droga ($F[1,185]=9.202$, $p=0.003$). En la Figura 12A se muestra una disminución de la cantidad de errores en el grupo NVHL con administración de nicotina, sugiriendo que este fármaco podría tener un efecto positivo sobre la memoria de trabajo. Por otro lado, el grupo Sham no mostró un efecto importante dada la administración de

nicotina o solución salina, evidenciando que el efecto pro-cognitivo de la nicotina podría observarse solo en poblaciones donde existe una disfunción cognitiva inicial.

El tiempo invertido en brazos erróneos también mostró un efecto según el grupo ($F[1,183]=32.482$, $p<0.001$), así como por la interacción de nicotina administrada y el grupo ($F[1,183]=6.724$, $p=0.010$). La administración de nicotina en el grupo NVHL provoca que estos animales disminuyan el tiempo que invierten en brazos sin reforzador (Ver Figura 12B).

Al evaluar el número de errores que representaban un reingreso a un brazo visitado previo al confinamiento encontramos un efecto por grupo ($F[1,184]= 28.524$ $p<0.001$), así como por la interacción entre grupo y fármaco ($F[1,184]= 7.801$ $p=0.006$). Consistente con lo encontrado en la fase previa, identificamos que la interrupción en la ejecución compromete, de manera más importante, la información almacenada sobre los primeros brazos visitados (Figura 13A). En este sentido, la administración crónica de nicotina logró disminuir el número de errores en los animales NVHL)

Por otro lado, los errores debidos a reingresos de brazos visitados después del confinamiento mostraron un efecto debido al grupo, al historial de administración de fármaco, así como a la interacción de ambas variables. La información de los brazos a los que se entraba por primera vez después de la interrupción, y que aun contenían reforzador, no era fuente de tantos errores, siendo cercana a 0 para el grupo Sham. Por su parte, el grupo NVHL con tratamiento de solución salina reingresaba a estos brazos, mostrándose una disminución en el número de errores en los animales NVHL que fueron tratados con nicotina. La ejecución de los animales se grafica en la Figura 13B.

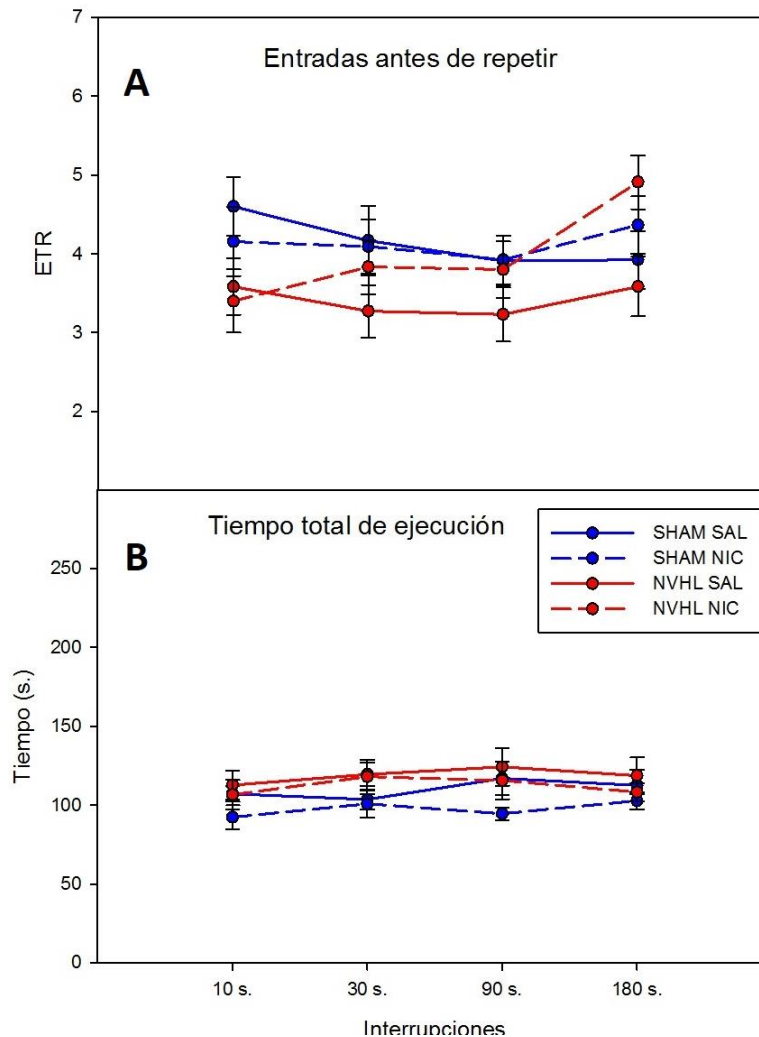


Figura 11. Entradas antes de repetir y tiempo total de ejecución en la fase administración de fármaco. Los animales NVHL o Sham fueron sometidos a un periodo de administración crónica de nicotina o solución salina, con la finalidad de esclarecer si la nicotina podría servir como fármaco pro-cognitivo y mejorar las deficiencias que mostraba el grupo NVHL en la ejecución del laberinto radial. Las líneas punteadas muestran la ejecución de los grupos bajo la administración de nicotina. Mientras que las líneas continuas muestran la ejecución control con administración de solución salina, la simbología se mantendrá en graficas subsecuentes. En el panel superior se grafican las entradas a nuevos brazos antes de cometer un error, medida que se ha relacionado con la capacidad de almacenamiento de la memoria de trabajo de un animal. Los datos sugieren una tendencia hacia una mejora en la capacidad de la memoria de trabajo en el grupo NVHL que fue tratado crónicamente con nicotina. El panel inferior muestra el tiempo total de ejecución, los cuatro grupos terminan la tarea en 100 s. en promedio, siendo más eficientes los animales Sham.

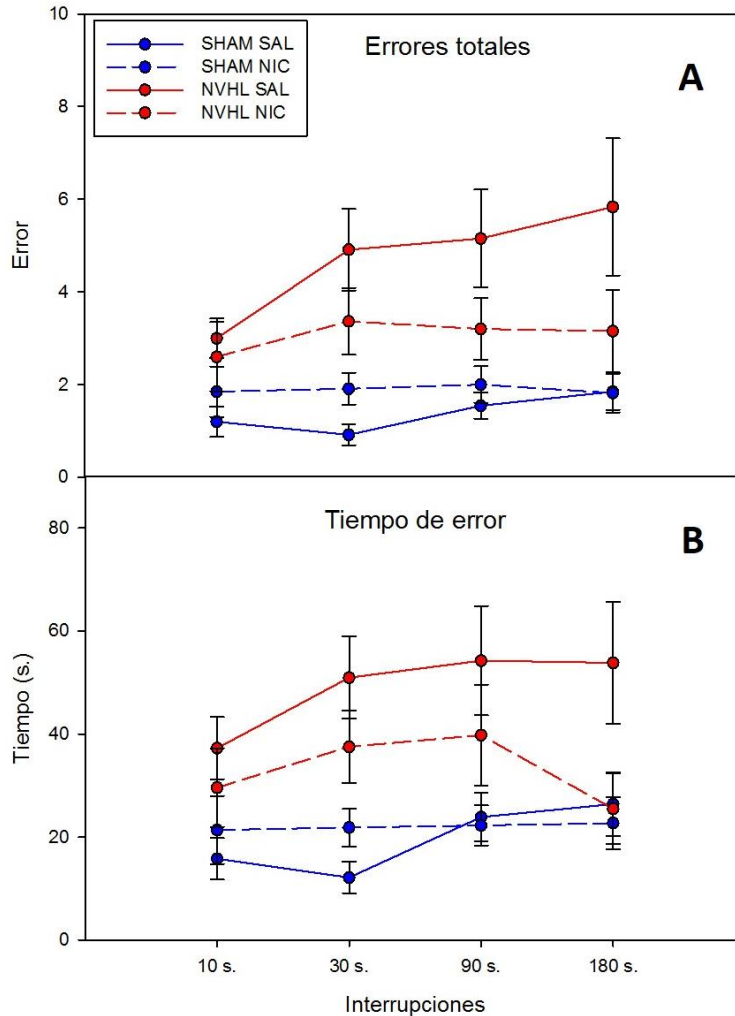


Figura 12. Errores totales y tiempo de error en la fase de administración de fármaco. En el panel superior se muestra la cantidad de errores que tuvieron los grupos, es claro que el grupo NVHL pudo beneficiarse de la administración de nicotina, ya que se muestra una disminución de la cantidad de errores incluso si la interrupción era de 180 segundos. En el panel inferior se observa el tiempo gastado en brazos erróneos, y se replica la disminución de este valor para el grupo NVHL que fue tratado con nicotina. La administración crónica de nicotina no muestra un efecto notorio en el grupo Sham, el cual ya mantenía una ejecución con pocos errores. Ambos resultados apuntan que el modelo de esquizofrenia podría estar mejorando su ejecución gracias a la administración crónica de nicotina

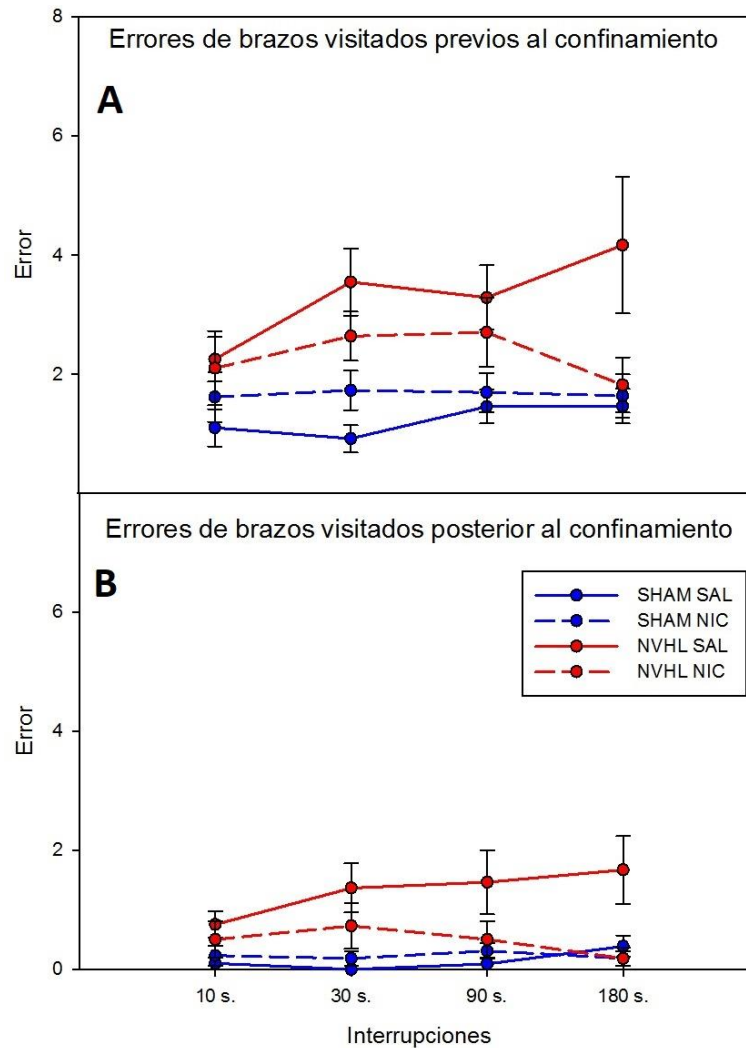


Figura 13. Errores de brazos visitados de manera previa y posterior al confinamiento en la fase de entrenamiento con administración de fármaco. En el grafico superior se identifican el número de errores cometidos dado el reingreso a un brazo visitado previo al confinamiento. Se puede advertir que los animales NVHL con administración de solución salina cometen más errores de este tipo, mientras que los animales NVHL con administración crónica de nicotina muestran una reducción de los mismos. Los animales del grupo Sham cometen menos de dos errores por sesión, y la administración de nicotina o salina no afecta de manera importante su ejecución. En la gráfica inferior se muestran los errores de brazos visitados después al confinamiento, este tipo de errores es menor en los 4 grupos, pero se mantiene una tasa más alta en el grupo NVHL con administración de salina, mientras que el grupo NVHL con administración de nicotina se acerca a los valores de animales Sham.

3. WESTERN BLOT

Mediante la técnica de Western blot determinamos si los niveles de la expresión del receptor $\alpha 7$ son afectados en el modelo NVHL en regiones hipocampales o de corteza cerebral.

El análisis de la cantidad relativa de proteínas reveló que no había diferencias significativas en la expresión del receptor $\alpha 7$ en la corteza entre los diferentes grupos, historial de administración de nicotina o la interacción de estas variables ($F[1,27]=0.755$, $p=0.394$, Figura 14). Sin embargo, las imágenes representativas del revelado de membranas muestran un ligero aumento en la expresión del receptor en los animales NVHL con tratamiento crónico de nicotina. Cabe resaltar que la expresión del receptor entre el grupo Sham con tratamiento de salina y el grupo Sham con tratamiento de nicotina es muy similar, este resultado va en línea con lo encontrado en la evaluación conductual, donde el grupo Sham mantenía constante su ejecución independientemente del fármaco administrado.

En el hipocampo no se encontraron cambios en la expresión relativa del receptor $\alpha 7$, no hay efecto individual de las variables, ni dada su interacción ($F[1,27]=0.326$, $p=0.573$). En la Figura 15 se puede advertir que la expresión del receptor nicotínico se mantiene constante sin importar el grupo experimental o el historial de administración.

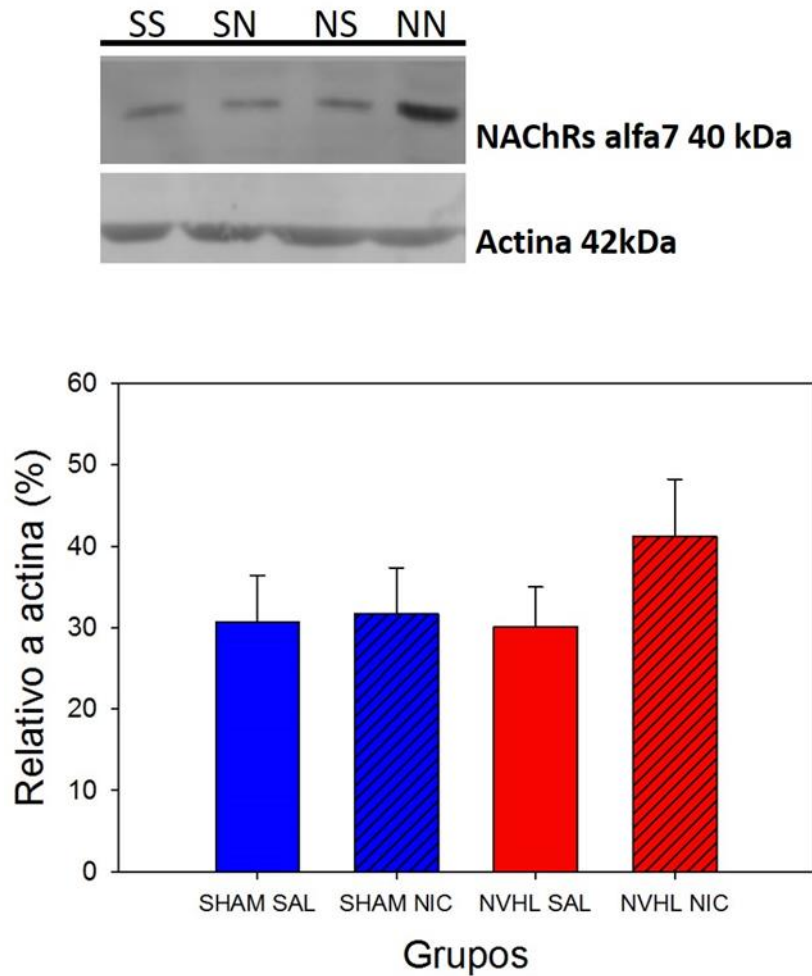


Figura 14. Expresión del receptor $\alpha 7$ en la corteza cerebral. En la parte superior se observan Western blots representativos de la expresión del receptor nicotínico $\alpha 7$, y de la proteína control (actina), en los 4 grupos experimentales. La cuantificación revela que no hay diferencias significativas, sin embargo se observa una tendencia hacia una mayor expresión del receptor en el modelo de esquizofrenia tratado con nicotina ($F[1,27]=0.755$, $p=0.394$). SS, Sham Salina. SN, Sham Nicotina. NS, NVHL Salina. NN, NVHL Nicotina

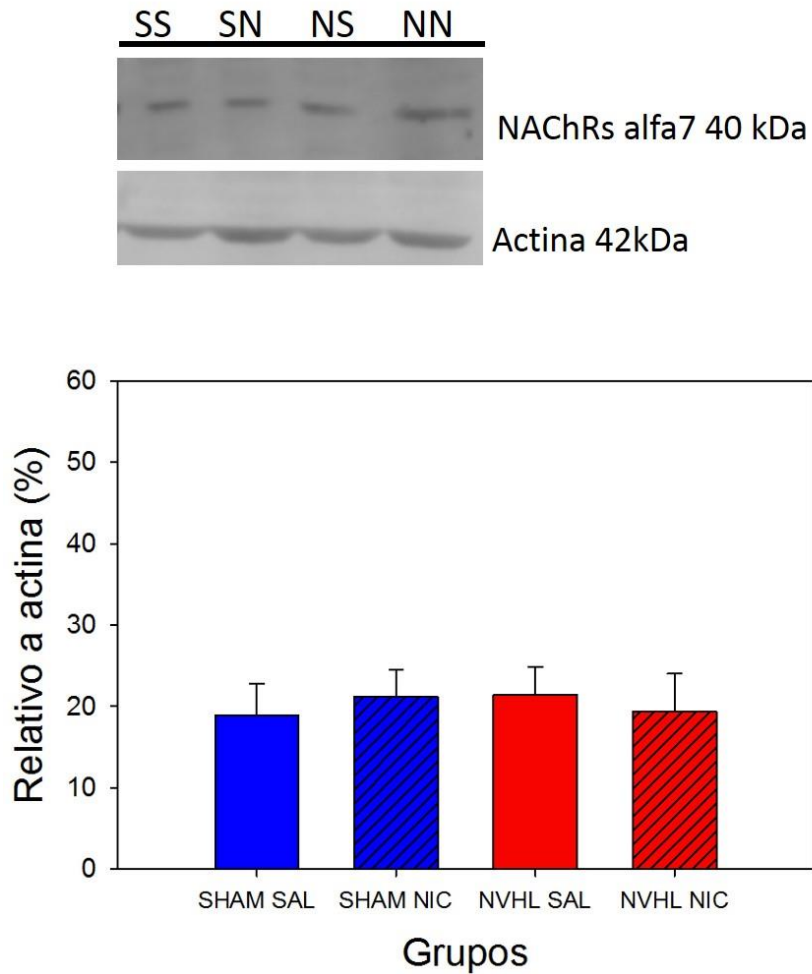


Figura 15. Expresión del receptor $\alpha 7$ en el hipocampo. En la parte superior se muestran Western blot representativos de la expresión del receptor nicotínico y de la proteína control (actina), en los 4 grupos experimentales. La expresión relativa del receptor en el hipocampo no se modifica en el modelo de esquizofrenia, ni por el tratamiento crónico de nicotina ($F[1,27]=0.326$, $p=0.573$), como se puede advertir en el panel inferior la expresión se mantuvo constante en los 4 grupos. SS, Sham Salina. SN, Sham Nicotina. NS, NVHL Salina. NN, NVHL Nicotina

DISCUSIÓN

La complejidad de la esquizofrenia, incluyendo la amplia gama sintomatológica, así como la falta de un marco etiológico concluyente, dificulta la conceptualización de un modelo animal que incluya toda la fenomenología del trastorno. Actualmente se han descrito alrededor de 150 modelos animales que intentan replicar alguna o varias características del amplio espectro sintomatológico y neurobiológico presente en los pacientes con esquizofrenia (Brady, 2016). Las manipulaciones experimentales utilizadas para generar dichos modelos incluyen herramientas farmacológicas, genéticas, ambientales, así como intervenciones en el neurodesarrollo. En este sentido, el modelo NVHL ha mostrado replicar una amplia gama de conductas que recuerdan a los síntomas de pacientes con esquizofrenia, así como diferentes características neurobiológicas congruentes con las reportadas en pacientes humanos. El modelo NVHL cumple con características que permiten validarlo como un modelo de trabajo experimental (Genis y López-rubacava, 2011).

Los resultados señalan que todos los animales sometidos a cirugía estereotáxica con administración de ácido iboténico mostraron una lesión bilateral del hipocampo ventral, evidenciado por degeneración celular, así como alargamiento ventricular en dichas porciones. La corroboración del insulto excitotóxico mostrada en estos animales replica los cambios morfológicos mostradas por otros grupos que utilizan el modelo NVHL (Brady, 2016). Esta evidencia anatómica nos permite inferir que dichos animales mostrarían el fenotipo conductual reportado en este modelo, así como los cambios neurobiológicos asociados con el trastorno y descritos por varios grupos de investigación (Revisado por Tseng et al., 2009).

Como se ha descrito previamente, el modelo NVHL replica características conductuales que mimetizan a los síntomas psicóticos (p.ej. mayor responsividad a metanfetaminas), a los síntomas negativos (evidenciado por menor tiempo invertido en interacciones sociales) y a las deficiencias cognitivas (Tseng et al., 2009). Para los fines de este trabajo, la evaluación conductual de los animales se centró en los síntomas cognitivos,

particularmente en las afectaciones a la memoria de trabajo, evaluada mediante un paradigma de laberinto radial. Las deficiencias en memoria de trabajo de pacientes con esquizofrenia han sido ampliamente descritas, y son consistentes a través de varios métodos de evaluación (Lee y Park, 2005). Es importante resaltar que esta función cognitiva está compuesta por varios subprocesos, los cuales son codificación, mantenimiento y manipulación de información, y cada uno de ellos puede ser evaluado aprovechando distintos paradigmas.

La iniciativa CNTRICS (Cognitive Neuroscience Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia) ha reconocido la importancia de las deficiencias en memoria de trabajo en los pacientes con esquizofrenia, resaltando la necesidad de aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de esta función cognitiva. Esta tarea involucra la correcta evaluación de la memoria de trabajo en modelos animales, la identificación de las deficiencias en cada uno de los sub-procesos, así como ulteriores manipulaciones farmacológicas, e identificación de los mecanismos neurales subyacentes, permitiendo acumular evidencia pre-clínica de diversos fármacos (Dudchenko, et al., 2012).

En este sentido, el modelo NVHL replica las afectaciones en memoria de trabajo mostrada en los pacientes con esquizofrenia. Estas deficiencias fueron evidentes en la fase de elección libre, en donde el grupo NVHL mostró más errores, invirtió mayor tiempo dentro de brazos que ya no contenían reforzador. La capacidad de almacenamiento de la memoria de trabajo, mostrada en la medida EAR, se vio disminuida en el grupo NVHL. La evaluación de memoria de trabajo en animales NVHL ha sido reportada por varios grupos de investigación, obteniendo resultados consistentes con los presentados en este trabajo (Brady, Saul y Wiest, 2010., Berg, et al., 2014., Berg, et al., 2015., Ostos-Valverde, 2015).

En una segunda fase de entrenamiento en el laberinto radial, se introdujeron demoras (10, 30, 90 o 180 segundos) entre la entrada al tercer brazo y la ejecución subsecuente; por lo que los animales debían mantener la información de los brazos visitados durante periodos mayores de tiempo, añadiendo un reto mayor a la realización de la tarea. Esta

modificación se realizó con el objetivo de determinar si las afectaciones en el grupo NVHL podían agravarse introduciendo dicha demora, así como determinar si el sub-proceso de mantenimiento está afectado en el modelo. En reportes previos se ha demostrado que interrupciones de 60 minutos producen un desvanecimiento total de la memoria de los primeros tres brazos visitados, interrupciones de 1 o 2 minutos han mostrado efectos modestos (Dudchenko, 2004). En el ANOVA de dos vías, que tomaba en cuenta el efecto por grupo y el efecto del tiempo de demora, no encontramos afectaciones particulares dada la magnitud de interrupción en el error o latencia de error, si hubo efectos dado el grupo evaluado, siendo más eficiente la ejecución del grupo Sham. Al tomar en cuenta únicamente la magnitud de la interrupción encontramos que, dentro del grupo Sham había un efecto sobre la latencia de error, donde la interrupción de 180 segundos produjo las mayores latencias ($F[3,79]= 3.656, p=0.016$). Por otro lado, la ejecución intragrupo de los animales NVHL no se vio afectada por los diferentes valores de la demora ($F[3,75]=0.057, p=0.987$). El hecho de que los animales NVHL no se mostraron sensibles a la introducción de estas demoras evidencia que la capacidad de almacenamiento no fue trastocada dada la interrupción; una posible explicación es que la ejecución de este grupo ya evidenciaba deficiencias en la capacidad de codificar la información, pero el forzar a los animales a mantener los estímulos por intervalos mayores de tiempo no ocasionó que la deficiencia fuera mayor. Este resultado concuerda por lo encontrado por Lee y Park en 2005, quienes al realizar un exhaustivo meta-análisis, encontraron que las deficiencias en memoria de trabajo de pacientes con esquizofrenia se mantienen a través de varios métodos de evaluación (p. ej. Tareas de N-back o igualación a la muestra demorada), sin embargo, el meta-análisis indicó que aquellas tareas que involucraban demoras no suponían un reto mayor a la memoria de trabajo de este grupo de pacientes; es decir, no agravaban sus deficiencias respecto a la ejecución control. La concordancia entre lo observado en pacientes con esquizofrenia y la ejecución del grupo NVHL permite consolidar su validez aparente, replicando las deficiencias en memoria de trabajo, incluso en el nivel de sub-procesos; donde podemos determinar que las afectaciones en memoria de trabajo se encuentran desde periodos de codificación de información, sin encontrar afectaciones en el mantenimiento.

Se podría discutir que la ejecución mostrada por el grupo NVHL se debe a deficiencias en el aprendizaje o en el entendimiento de la tarea. Podemos notar que los animales hacen más eficiente su ejecución a lo largo de las sesiones, evidenciado por un menor tiempo de ejecución, menor tiempo en brazos erróneos, y un aumento progresivo en la medida EAR, estos patrones conductuales se comportan como curvas de aprendizaje, sin embargo, la ejecución del grupo NVHL nunca logra ser tan eficiente como la del grupo Sham (Figuras 6A, 6B, 7B) . Por otro lado, en la fase de entrenamiento con interrupciones notamos que los animales NVHL cometen más errores que involucran el reingreso a brazos visitados en la primera parte del ensayo, evidenciando un efecto en la memoria de trabajo; en el caso contrario, si los animales hubiesen reingresado a todos los brazos de manera indistinta podríamos sospechar de una afectación en el aprendizaje de la tarea (Figura 10). Dadas estas evidencias podemos asumir que el grupo NVHL muestra deficiencias en la memoria de trabajo.

La administración de nicotina en el modelo NVHL también ha sido probada previamente aprovechando otros paradigmas (Berg, et al., 2014). En este respecto, se ha intentado elucidar si el consumo de nicotina por parte de los pacientes es mediado por un mecanismo de auto-medicación y mejora de síntomas cognitivos, o si por el contrario indica una mayor propensión al consumo de drogas en estos pacientes.

Una investigación realizada por Berg y colaboradores (2014), aprovecharon el modelo NVHL para evaluar el patrón de administración de nicotina por parte de los animales. Usando un paradigma de auto-administración se encontró que este grupo de animales se mantenía más tiempo presionando una palanca para administrarse nicotina, en el mismo sentido, se describe que el grupo NVHL no extinguía la respuesta de auto-administración, aun cuando la presión de la palanca ya no supusiera una infusión de nicotina. Los autores también identifican que la mayor sensibilidad a la nicotina en el grupo NVHL se da en periodos de adultez, emergiendo junto con el resto de síntomas; los autores relacionan ambas características con deficiencias en la maduración de circuitos cortico-estriatales que explicarían una mayor propensión al consumo de drogas como un rasgo clínico propio del trastorno, y no como una característica secundaria en

respuesta al tratamiento de síntomas. En este reporte también se evaluó a los animales en el laberinto radial, donde las deficiencias en memoria de trabajo del grupo NVHL se hicieron evidentes, a estos animales se les administró nicotina una vez al día en una dosis de 0.5 mg/kg. Sin embargo, esta administración no correspondía al periodo total de entrenamiento de los animales, por lo que los efectos pro-cognitivos de la nicotina se mostraron con efectos moderados.

Existen otros reportes que evalúan la memoria de trabajo de animales NVHL bajo la administración de nicotina. La mayoría de estos reportes indican que no existe un efecto pro-cognitivo de este fármaco, o que dicho efecto es sutil. De manera general, estos reportes realizan administraciones agudas del fármaco, se valen de concentraciones que no corresponde al alto consumo de estos pacientes o mantienen la administración en periodos distintos a la evaluación conductual (Chambers, et al., 1996., Berg, et al., 2015).

Nuestros resultados muestran una disminución de errores y latencias de error en el grupo NVHL que mantuvo una administración crónica de nicotina. Este efecto en la cognición de los animales puede deberse a que la administración de nicotina que realizamos intentaba mimetizar el alto consumo de tabaco reportado en estos pacientes. Por un lado, la dosis administrada consistía en dos inyecciones subcutáneas al día, cada una de 0.5mg/kg, elevando los niveles plasmáticos de nicotina a los correspondientes para un fumador crónico (Matta et al., 2006). También mantuvimos la administración de nicotina durante un largo periodo de tiempo, es decir, los animales recibieron el fármaco en un periodo de dos semanas, tras el cual se reinició el entrenamiento mientras se continuaba la administración. Es posible que los efectos pro-cognitivos de la nicotina se hagan evidentes siempre que su administración sea crónica y replique las concentraciones que mantiene esta población psiquiátrica.

Las observaciones de este reporte nos permiten apoyar a la hipótesis de automedicación como uno de los mecanismos por los cuales se mantiene el alto consumo de nicotina en pacientes con esquizofrenia. Sin embargo, los resultados obtenidos por otros grupos de investigación sugieren una mayor propensión al consumo de drogas, así como mayores

efectos reforzantes y adictivos de la nicotina en este grupo de pacientes (Parikh, et al., 2016; Volkow, 2009). Es importante resaltar que hay evidencias que soportan ambas hipótesis, y cabe la posibilidad de que ambos mecanismos estén mediando el alto consumo de nicotina en esta población.

Es interesante notar que la nicotina no tuvo un impacto significativo en la ejecución del grupo Sham, ya que los errores y tiempos de error se mantuvieron constantes sin importar el historial de administración (Figura 12). En este sentido, se ha reportado que la nicotina actúa como un fármaco pro-cognitivo en diversas poblaciones neuropsiquiátricas, como el Trastorno por déficit de atención e hiperactividad, Enfermedad de Alzheimer y Esquizofrenia, mientras que en sujetos fumadores sanos se observa poco impacto en funciones cognitivas, e incluso efectos adversos (Sacco, Bannon y George, 2004).

Otro objetivo del presente trabajo consistía en determinar los cambios que seguían a la administración crónica de nicotina y que podrían mediar sus efectos pro-cognitivos. Mediante la técnica de Western blot analizamos la expresión relativa del receptor $\alpha 7$ en hipocampo y corteza. Nuestros resultados indicaron que la expresión relativa del receptor se mantuvo constante en hipocampo sin importar el historial farmacológico de estos grupos. De manera interesante, encontramos una tendencia hacia un aumento en la expresión del receptor en regiones corticales, este aumento se observó en animales NVHL que llevaron un tratamiento crónico de nicotina. En el modelo NVHL se han descrito modificaciones en la expresión del receptor nicotínico $\alpha 4\beta 2$, donde se encontraron disminuciones del receptor en regiones frontales y aquellos animales que estuvieron expuestos a parches transdermales de nicotina mostraron un aumento de la presencia de este receptor, tanto en regiones corticales, como en regiones estriatales (Berg et al., 2015). En pacientes con esquizofrenia se han encontrado modificaciones en la expresión del receptor $\alpha 7$ tras el consumo crónico de tabaco, en este sentido se evaluó la expresión de mRNA mediante RT-PCR, y la expresión de la proteína mediante Western blot en tejido de sujetos control, fumadores controles, pacientes fumadores, y pacientes no fumadores. Los resultados indicaron un decremento en ambos marcadores en pacientes con esquizofrenia sin historial de tabaquismo, y un aumento de estos marcadores en

pacientes fumadores. A pesar de no alcanzar diferencias significativas, el patrón de expresión en nuestro reporte, y en lo publicado por Mexal y colaboradores (2010) muestran alta concordancia

El aumento de expresión del receptor $\alpha 7$ en la corteza de animales NVHL sugiere que las porciones frontales del encéfalo son blancos importantes de cambios asociados a mejoras cognitivas. Estos resultados concuerdan con la evidencia celular mostrada previamente, donde la nicotina revierte daños en la morfología de células piramidales de la corteza (Ostos-Valverde, 2015).

Este trabajo ha permitido determinar que la administración crónica de nicotina ayuda a mejorar las deficiencias cognitivas asociadas al modelo NVHL. No encontramos diferencias significativas en la expresión del receptor $\alpha 7$, sin embargo, la representación gráfica sugiere que estos efectos pro-cognitivos podrían estar asociados a los niveles de expresión del receptor $\alpha 7$. Siguiendo investigaciones deberán dilucidar la interacción con otros mecanismos que permitan explicar la mejora de síntomas cognitivos, centrándose particularmente en el desbalance excitatorio-inhibitorio cortical.

En este sentido, será interesante evaluar si existen modificaciones en la actividad de interneuronas GABAérgicas corticales e hipocámpales, ya que este tipo celular media su actividad a través del receptor $\alpha 7$, y la administración de nicotina podría modular el tono inhibitorio. Por otro lado, se ha determinado que la subunidad $\alpha 7$, así como la subunidad $\beta 2$, se encuentran en terminales que modulan la actividad dopaminérgica cortical, a su vez, el sistema dopaminérgico facilita la respuesta de receptores NMDA mediante un aumento en el Ca^{2+} intracelular y la proteína cinasa A, la actividad del receptor NMDA es fundamental para un correcto funcionamiento de neuronas piramidales corticales, y por lo tanto, un correcto balance excitatorio (Parikh et al., 2016).

La administración de PNU282987 (agonista total de $\alpha 7$) y de SSR180711 (agonista parcial) en un modelo de neurodesarrollo de esquizofrenia (modelo MAM, Acetato de Metilazoximetanol) logró reducir el tono hiperdopaminérgico en regiones mesencefálicas,

como el VTA (área ventral tegmental). Cuando la infusión de dichos fármacos fue hecha en el hipocampo ventral se redujo la actividad espontánea en neuronas dopaminérgicas del VTA, este resultado se encontró en animales MAM (Neves & Grace, 2018). El efecto modulador del receptor $\alpha 7$ podría ser esperado en regiones corticales, regulando la actividad excitatoria-inhibitoria, dando como resultado una mejora cognitiva en pacientes con esquizofrenia.

En resumen, el presente trabajo da apoyo a la hipótesis de automedicación con nicotina. La esquizofrenia es un trastorno altamente incapacitante, debido, en gran medida, a las deficiencias cognitivas. Dichas deficiencias no son tratadas farmacológicamente, por lo que el alto consumo de nicotina en esta población podría sostenerse por una mejora en los déficits cognitivos y un ulterior impacto en la funcionalidad. Nuestros resultados indican que un tratamiento crónico de nicotina ayudo a mejorar la ejecución cognitiva de un modelo animal de esquizofrenia, y dichos efectos podrían estar mediados por regiones corticales cerebrales. La generación de nuevas alternativas farmacológicas para esta población psiquiátrica deberá importarse por los síntomas cognitivos para ofrecer una mejor calidad de vida.

CONCLUSIONES

1. Los animales NVHL mostraron déficits cognitivos evidenciados por un mayor número de errores en la tarea de laberinto radial.
2. Los animales NVHL tratados con nicotina mostraron una mejora en la ejecución del laberinto radial.
3. La expresión relativa del receptor $\alpha 7$ no se ve significativamente modificada en las ratas NVHL.
4. El tratamiento con nicotina no tiene efecto significativo en la expresión del receptor $\alpha 7$. Se identificó una tendencia de aumento en la expresión del receptor $\alpha 7$ en la corteza de ratas NVHL tratadas con nicotina.

REFERENCIAS

1. Adriano, F., Caltagirone, C., & Spalletta, G. (2012). Hippocampal volume reduction in first-episode and chronic schizophrenia: A review and meta-analysis. *Neuroscientist*, 18(2), 180–200.
2. Aguilar, M., Gurpegui, M., Diaz, F., & Leon, J. (2005). Nicotine dependence and symptoms in schizophrenia: naturalistic study of complex interactions. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*, 186, 215–21.
3. Albuquerque, E., Pereira, E., Alkondon, M., & Rogers, S. (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev.* 89(1), 73-120.
4. American Psychiatric Association (APA). (2014). *Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales DSM-V (.5ª ed.)* Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
5. Barch, D., & Smith, E. (2008). The Cognitive Neuroscience of Working Memory: Relevance to CNTRICS and Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 64(1), 11–17.
6. Becker, A., Grecksch, G., Bernstein, H.-G., Höllt, V., & Bogerts, B. (1999). Social behaviour in rats lesioned with ibotenic acid in the hippocampus: quantitative and qualitative analysis. *Psychopharmacology*, 144(4), 333–338
7. Berg, S., Sentir, A., Bell, R., Engleman, E., & Chambers, R. (2015). Nicotine effects in adolescence and adulthood on cognition and $\alpha 4\beta 2$ -nicotinic receptors in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of schizophrenia. *Psychopharmacology*, 232(10), 1681–1692.
8. Berg, S., Sentir, A., Cooley, B., Engleman, E., & Chambers, R. (2014). Nicotine is more addictive, not more cognitively therapeutic in a neurodevelopmental model of schizophrenia produced by neonatal ventral hippocampal lesions. *Addiction Biology*, 19(6), 1020-1031.
9. Birnbaum, R., & Weinberger, D. R. (2017). Genetic insights into the neurodevelopmental origins of schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(12), 727–740.

10. Brady, A. (2016). The Neonatal Ventral Hippocampal Lesion (NVHL) Rodent Model of Schizophrenia. *Current Protocols in Neuroscience*. 9.55.1–9.55.17.
11. Brady, A., Saul, R., & Wiest, M. (2010). Selective deficits in spatial working memory in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of schizophrenia. *Neuropharmacology*, 59(7-8), 605–611.
12. Bryson G., & Bell M.D. (2003). Initial and final work performance in schizophrenia: cognitive and symptom predictors. *J Nerv Ment Dis*. 191(2):87-92.
13. Chambers, A., Moore, J., McEvoy, J., & Levin, E. (1996). Cognitive Effects of Neonatal Hippocampal Lesion in Rat Model of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 15(6), 587-594
14. Chen, J., Bacanu, S. A., Yu, H., Zhao, Z., Jia, P., Kendler, K. S., Chen, X. (2016). Genetic Relationship between Schizophrenia and Nicotine Dependence. *Scientific Reports*, 6(Tukholmankatu 8), 1–10.
15. Cirillo, M. A., & Seidman, L. J. (2003). Verbal declarative memory dysfunction in schizophrenia: from clinical assessment to genetics and brain mechanisms. *Neuropsychology review*, 13(2), 43–77.
16. Cohen, J., & Insel, T. (2008). Cognitive Neuroscience and Schizophrenia: Translational Research in Need of a Translator. *Biological Psychiatry*, 64(1), 2–3.
17. Dani, J. & Bertrand, D. (2007). Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 699-729.
18. Deutsch, S., Schwartz, B., Schooler, N., Brown, C., Rosse, R., & Rosse, S. (2013). Targeting alpha-7 nicotinic neurotransmission in schizophrenia: A novel agonist strategy. *Schizophrenia Research*, 148(1-3), 138-144.
19. Dudchenko, P. (2004). An overview of the task usdes to test working memory in roedents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 28(7), 699-709.
20. Dudchenko, P.A., Talpos , J., Young, J., & Baxter, M.G. (2012). Animal models of working memory: A review of tasks that might be used in screening drug treatments for the memory impairments found in schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*.

21. Fanselow, M., & Dong, H.-W. (2010). Are the Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures. *Neuron*, 65(1), 1–25.
22. Genis, A. D., & López-rubacava, C. (2011). ¿ Es posible modelar esquizofrenia en un modelo animal? *El Residente*, VI(2), 120–126. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/elresidente>
23. Gillentine, M., & Schaaf, C. (2015). The human clinical phenotypes of altered CHRNA7 copy number. *Biochemical Pharmacology*.
24. Green, M., Horan, W., & Lee, J. (2015). Social cognition in schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*, 16(10), 620–63.
25. Green, M., Kern, R., & Heaton, R. (2004). Longitudinal studies of cognition and functional outcome in schizophrenia: implications for MATRICS. *Schizophrenia Research*, 72(1), 41–51.
26. Harvey, P. D. (2008). CNTRICS: Bringing Clinical Treatment Trials Closer to the Brain. *Psychiatry*, 5(2), 57–9.
27. Hashimoto, T., Volk, D., Eggan, S., Mirnics, K., Pierri, J., Sun, Z., Sampson, A., et al. (2003). Altered gene expression in parvalbumin-containing GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 60(1), 71.
28. Heckers, S. (2001). Neuroimaging studies of the hippocampus in schizophrenia. *Hippocampus*, 11(5), 520–528.
29. Howes, OD, & Kapur, S. (2009). The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III—the final common pathway. *Schizophrenia bulletin*. 33(3), 549-562.
30. Jaaro-Peled, H., Hayashi-Takagi, A., Seshadri, S., Kamiya, A., Brandon, N., & Sawa, A. (2009) Neurodevelopmental mechanism of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through neuregulin-1-ErbB4 and DISC1. *Trends in Neurosciences*, 32(9), 485- 495.
31. Jense, A., Frolund, B., Liljefors, T. & Krogsgaard-Larsen, P. (2005). Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Structural Revelations, Target Identifications, and Therapeutic Inspirations. *Journal of Medicinal Chemistry*. 48(15), 4705-4745
32. Katsnelson, A. (2014). Drug development: The modelling challenge. *Nature*, 508(7494), S8–S9.

33. Kuha, A., Tuulio-Henriksson, A., Eerola, M., Perälä, J., Suvisaari, J., Partonen, T., & Lönnqvist, J. (2007). Impaired executive performance in healthy siblings of schizophrenia patients in a population-based study. *Schizophrenia Research*, 92(1-3), 142–150.
34. Kumari, V., & Postma, P. (2005). Nicotine use in schizophrenia: the self medication hypotheses. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 29(6), 1021–34.
35. Lee, J., & Park, S. (2005). Working Memory Impairments in Schizophrenia: A Meta-Analysis. *Journal of Abnormal Psychology*, 114(4), 599.
36. Leon, J., & Diaz, F. (2005). A meta-analysis of worldwide studies demonstrates an association between schizophrenia and tobacco smoking behaviors. *Schizophrenia research*, 76(2-3), 135–57.
37. Leonard, S & Freedman, R. (2006). Genetics of Chromosome 15q13-q14 in Schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 60,115-122.
38. Leonard, S., Mexal, S., & Freedman, R. (2007). Genetics of Smoking and Schizophrenia. *Journal of Dual Diagnosis*, 3(3-4), 4359.
39. Lett, T., Voineskos, A., Kennedy, J., Levine, B., & Daskalakis, Z. (2014). Treating Working Memory Deficits in Schizophrenia: A Review of the Neurobiology. *Biological Psychiatry*, 75(5), 361–370.
40. Levin, E., Wilson, W., Rose, J., & McEvoy, J. (1996). Nicotine-Haloperidol interactions and Cognitive Performance in Schizophrenics. *Neuropsychopharmacology*, 15(5), 429-436
41. Lewis, D., Curley, A., Glausier, J., & Volk, D. (2012). Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends in Neurosciences*, 35(1), 57–67.
42. Li, S., Ma, L., Wang, Y., Wang, X., Li, Y., & Qin, L. (2018). Auditory steady-state responses in primary and non-primary regions of the auditory cortex in neonatal ventral hippocampal lesion rats. *PLoS ONE*, 13(2), 1–16.
43. Lipska, B., & Weinberger, D. (2002). A neurodevelopmental model of schizophrenia: Neonatal disconnection of the hippocampus. *Neurotoxicity Research*, 4(5-6), 469–475.

44. Lipska, B., Jaxkiw, G., & Weinberger, D. (1993). Postpubertal Emergence of Hyperresponsiveness to Stress and to Amphetamine after Neonatal Excitotoxic Hippocampal Damage: A Potential Animal Model of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 9(1), 67-75
45. Manglam, M., & Das, A. (2013). Verbal learning and memory and psychopathology in schizophrenia. *Asian Journal of Psychiatry*, 6(5), 417–420.
46. Martin, L., & Freedman, R. (2007). Schizophrenia and the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *International review of neurobiology*, 78, 225–46.
47. Matta, S., Balfour, D., Benowitz, N., Boyd, R., Buccafusco, J., Caggiula, A., Craig, C., et al. (2006). Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. *Psychopharmacology*, 190(3), 269-319.
48. Mexal, S., Berger, R., Logel, J., Ross, R. G., Freedman, R., & Leonard, S. (2010). Expression in Schizophrenic Smokers. *Gene*, 40, 185–195.
49. Miledi, R., Dueñas, Z., Martínez-Torres, A., Kawas, C., & Eusebi, F. (2004). Microtransplantation of functional receptors and channels from the Alzheimer's brain to frog oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(6), 1760–1763.
50. Monfil, T., Vázquez Roque, R. A., Camacho-Abrego, I., Tendilla-Beltran, H., Iannitti, T., Meneses-Morales, I., ... Morales-Medina, J. C. (2017). Hyper-response to Novelty Increases c-Fos Expression in the Hippocampus and Prefrontal Cortex in a Rat Model of Schizophrenia. *Neurochemical Research*, 43(2), 441–448.
51. Mueser, K., & McGurck, S. (2004). Schizophrenia. *The Lancet*, 363(9426), 2063-2072.
52. Neves, G. A., & Grace, A. A. (2018). a7 Nicotinic receptor-modulating agents reverse the hyperdopaminergic tone in the MAM model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, (April), 1–9.
53. NIMH. (2008-2018) NIMH Schizophrenia Initiative Featured in Biological Psychiatry. Bethesda, MD, E.U. Recuperado de <https://www.nimh.nih.gov/news/science-news/2008/nimh-schizophrenia-initiative-featured-in-biological-psychiatry.shtml>

54. Nuechterlein, K., Green, M., Calkins, M., Greenwood, T., Gur, R., Gur, R., Lazzeroni, L., et al. (2015). Attention/vigilance in schizophrenia: Performance results from a large multi-site study of the Consortium on the Genetics of Schizophrenia (COGS). *Schizophrenia Research*, 163(1-3), 38–46
55. O'Carroll, R. (2000). Cognitive impairment in schizophrenia. *Advances in Psychiatric Treatment*, 6(3), 161-168
56. Ochsner, K. N. (2008). The social-emotional processing stream: five core constructs and their translational potential for schizophrenia and beyond. *Biological psychiatry*, 64(1), 48–61.
57. Olincy, A., & Stevens, K. (2007). Treating schizophrenia symptoms with an $\alpha 7$ nicotinic agonist, from mice to men. *Biochemical Pharmacology*, 74(8), 1192-1201
58. OMS, Schizophrenia and public health. Geneva, Organización Mundial de la Salud, 1998. Recuperado de: http://www.who.int/mental_health/media/en/55.pdf
59. OMS, Schizophrenia, Organización Mundial de la Salud, 2015. Recuperado de: http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/
60. Onitsuka, T., Oribe, N., Nakamura, I., & Kanba, S. (2013). Review of neurophysiological findings in patients with schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 67(7), 461–470
61. Orr-Utreger, A., Göldner, F.M., Saeki, M., Lorenzo, I., Goldber, I., De Biasi, M., Dani, J.A., Patrick, J.W. & Beaudet, A. (1997). Mice Deficient in the $\alpha 7$ Nueronal Nicotinic Acetilcholine Receptor Lack α -Bungarotoxin Binding Sites and Hippocampal Fast Nicotinic Currents. *The Journal of Neuroscience*. 17(23), 9165-9171.
62. Ostos-Valverde, A. (2015). Evaluación de la administración crónica de nicotina en un modelo de neurodesarrollo de esquizofrenia. Tesis de Licenciatura (Psicología). D.F. México, Facultad de Psicología, UNAM. 89p.
63. Pantelis, C., Yücel, M., Wood, S., McGorry, P., & Velakoulis, D. (2003). Early and late neurodevelopmental disturbances in schizophrenia and their functional consequences. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 37(4), 399–406.

64. Parikh, V., Kutlu, M. G., & Gould, T. J. (2016). nAChR dysfunction as a common substrate for schizophrenia and comorbid nicotine addiction: Current trends and perspectives. *Schizophrenia Research*, 171(1–3), 1–15.
65. Paxinos, G; Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. London: Academic Press.
66. Perry, D., Dávila-García, I., Stockmeier, C. & Kellar, K. (1999). Increased Nicotinic Receptors in Brains from Smokers: Membrane Binding and Autoradiography Studies. *J Pharmacol Exp Ther*. 289, 1545-1552
67. Preskorn, S., Gaweyl, M., Dgetluck, N., Palfeeyman, M., Bauer, L., Hilt, D. (2014). Normalizing effects of EVP-6124, an alpha-7 nicotinic partial agonist, on event-related potentials and cognition: a proof of concept, randomized trial in patients with schizophrenia. *Journal of Psychiatric Practice*, 20, 12-24.
68. Ragland, J., Yoon, J., Minzenberg, M., & Carter, C. (2009). Neuroimaging of cognitive disability in schizophrenia: Search for a pathophysiological mechanism. *International Review of Psychiatry*, 19(4), 417–427.
69. Rapoport, J., Addington, A., Frangou, S., & Psych, M. (2005) The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Molecular Psychiatry*, 10(5), 434-449.
70. Risterucci, C., Jeanneau, K., Schöppenthau, S., Bielser, T., Künnecke, B., Kienlin, M., & Moreau, J.-L. (2005). Functional magnetic resonance imaging reveals similar brain activity changes in two different animal models of schizophrenia. *Psychopharmacology*, 180(4), 724–734.
71. Rodríguez-Jiménez, R., Bagney, A., Moreno-Ortega, M., García-Navarro, C., Aparicio, A.I., López-Antón, R., de la Oliva, J., Jiménez-Arriero, M. A., Santos, J. L., Lobo, A., & Palomo, T. (2012). Cognitive deficits in schizophrenia: MATRICS Consensus Cognitive Battery. *Rev Neurol*, 55(9), 549-555.
72. Romero-Pimentel, A., Vázquez-Roque, R., Camacho-Abrego, I., Hoffman, K., Linares, P., Flores, G., & Manjarrez, E. (2014). Histological correlates of N40 auditory evoked potentials in adult rats after neonatal ventral hippocampal lesion: animal model of schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 159(2-3), 450-457.

73. Ryan, R. T., Bhardwaj, S. K., Tse, Y. C., Srivastava, L. K., & Wong, T. P. (2013). Opposing alterations in excitation and inhibition of layer 5 medial prefrontal cortex pyramidal neurons following neonatal ventral hippocampal lesion. *Cerebral Cortex*, 23(5), 1198–1207.
74. Sacco, K., Bannon, K., & George, P. (2004). Nicotinic receptor mechanism and cognition in normal states and neuropsychiatric disorders. *J Psychopharmacology*, 18(4), 457-474
75. Sanders, R., Scheupbach, D., Goldstein, G., Hass, G., Sweeney, J., & Keshavan, M. (2004). Relationships Between Cognitive and Neurological Performance in Neuroleptic-Naïve Psychosis. *Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 16(4), 480-487
76. Schneider, M., Walter, H., Moessnang, C., Schäfer, A., Erk, S., Mohnke, S., Romund, L., et al. (2017). Altered DLPFC–Hippocampus Connectivity During Working Memory: Independent Replication and Disorder Specificity of a Putative Genetic Risk Phenotype for Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 43(5), 1114–1122
77. Sinkus, M., Graw, S., Freedman, R., Ross, R.G., Lester, H.A. & Leonard, S. (2015). The human CHRNA7 and CHRFA74 genes: A review of the genetics, regulation and function. *Neuropharmacology*. 96, 274-288.
78. Sinkus, M.L., Lee, M, J., Gault, J., Logel, J., Short, M., Freedman, R., Christian, S.L., Lyon, J. & Leonard, S. (2009). A 2-base pair deletion polymorphism in the partial duplication of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine gene (CHRFA7A) on chromosome 15q14 is associated with schizophrenia. *Brain Research*, 1291, 1-11.
79. Smucny, J., & Tregellas, J. R. (2017). Targeting neuronal dysfunction in schizophrenia with nicotine: Evidence from neurophysiology to neuroimaging. *Journal of Psychopharmacology*, 801-811.
80. Strand, J. E., & Nybäck, H. (2005). Tobacco use in schizophrenia: A study of cotinine concentrations in the saliva of patients and controls. *European Psychiatry*, 20(1), 50–54.
81. Tandon, R., Gaebel, W., Barch, D., Bustillo, J., Gur, R., Heckers, S., Malaspina, D., et al. (2013). Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. *Schizophrenia Research*, 150(1).

82. Tandon, R., Nasrallah, H., Keshavan, M. (2009). Schizophrenia, “Just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophrenia Research*, 110.
83. Taylor, S., & Posch, A. (2014). The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *BioMed Research International*.
84. Tian, Y., Yang, J., Lei, Y., Zhang, Z., Dai, Z., Chen, X., Ling, S. (2016). Neonatal ventral hippocampus lesion changes nuclear restricted protein/brain (NRP/B) expression in hippocampus, cortex and striatum in developmental periods of rats. *Neuroscience*, 319, 59–68.
85. Torrey, E. F. (2002). Studies of individuals with schizophrenia never treated with antipsychotic medications: a review. *Schizophrenia research*, 58(2-3), 101–1.
86. Tseng, K., Chambers, R., & Lipska, B. (2009). The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. *Behavioral Brain Research*, 204(2), 295-305.
87. Vargas, T., Dean, D. J., Osborne, K. J., Gupta, T., Ristanovic, I., Ozturk, S., Mittal, V. A. (2017). Hippocampal Subregions Across the Psychosis Spectrum. *Schizophrenia Bulletin*, 33–35.
88. Vlcek, P., Bob, P., & Raboch, J. (2014). Sensory disturbances, inhibitory deficits, and the P50 wave in schizophrenia. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 10.
89. Volkow, N. D. (2009). Substance Use Disorders in Schizophrenia — Clinical Implications of Comorbidity. *Schizophrenia Bulletin*, 35(3), 469–472.
90. Weinberger, D. R. (2017). Future of Days Past: Neurodevelopment and Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 43(6), 1164–1168.
91. Wong, A., & Tol, H. (2003). Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, 27(3), 269–306.
92. Young, & Geyer. (2015). Developing treatments for cognitive deficits in schizophrenia: The challenge of translation. *Journal of Psychopharmacology*, 29(2), 178–196.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análisis cuantitativo de las neuronas granulares del hipocampo.....	26
Figura 2. Fotografías representativas de las neuronas granulares hipocampales en los 4 grupos experimentales.....	27
Figura 3. Análisis cuantitativo de neuronas piramidales de corteza.....	28
Figura 4. Fotografías representativas de las neuronas piramidales de la corteza en los 4 grupos experimentales.....	29
Figura 5. Corroboración de lesión mediante la tinción de hematoxilina-eosina...	42
Figura 6. Entradas antes de repetir y tiempo total de ejecución en la fase de elección libre.....	45
Figura 7. Errores totales y tiempo de Error en la fase de elección libre.....	46
Figura 8. Entradas antes de repetir y tiempo total de ejecución en la fase de enteramiento con interrupciones.....	50
Figura 9. Errores totales y tiempo de error en la fase de entrenamiento con interrupciones.....	51
Figura 10. Errores de brazos visitados de manera previa y posterior al confinamiento en la fase de entrenamiento con interrupciones.....	52
Figura 11. Entradas antes de repetir y tiempo total de ejecución en la fase administración de fármaco	55
Figura 12. Errores totales y tiempo de error en la fase de administración de fármaco.....	56
Figura 13. Errores de brazos visitados de manera previa y posterior al confinamiento en la fase de entrenamiento con administración de fármaco.....	57

Figura 14. Expresión del receptor $\alpha 7$ en la corteza cerebral	59
Figura 15. Expresión del receptor $\alpha 7$ en el hipocampo.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de Varianza
AP	Antero-Posterior
CIE-10	Clasificación Internacional de enfermedades
CNTRICS	Cognitive Neuroscience Treatment Research to Improve Cognition in Schizophrenia
CPF	Corteza Prefrontal
CPT	Continuous Performance Test
DISC 1	Disrupted in Schizophrenia 1
DLPFC	Corteza Prefrontal Dorsolateral
DMN	Default Mode Network
DMXBA	3-(2,4-dimethoxybenzylidene)-anabaseine
DSM-V	Manual Diagnostico y Estadístico de los Trastornos Mentales
EAR	Entradas antes de repetir
FRET	Förster fluorescence energy transfer
GAD67	Glutamato descarboxilasa
LCRa	Líquido Ceforraquídeo artificial
MAM	Acetato de Metilazoximetanol
MATRICS	Measurement and Treatment Research to Improve Cognition in
ML	Medial-Lateral
MMN	Mismatch Negativity
nAChRs	Nicotinic Acetylcholine Receptors
NIH	National Institute of Health
NRG1	Neuroregulina 1
NVHL	Neonatal Ventral Hippocampal Lesion
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer Fosfato Salino
PET	Tomografía por emisión de positrones
PFA	Paraformaldehido
PV	Parvalbumina
PVDF	Polifloruro de vinilideno

	Schizophrenia
SEM	Error Estándar de la Media
SPECT	Tomografía computarizada de emisión monofónica
TM	Dominios Transmembranales
VTA	Área Ventral Tegmental