



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO  
FACULTAD DE PSICOLOGÍA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

**Evaluación de la administración crónica  
de nicotina en un modelo del  
neurodesarrollo de esquizofrenia.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN PSICOLOGÍA

PRESENTA:

ALINE OSTOS VALVERDE

DIRECTOR: DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO

REVISOR: DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES

SINODALES: DR. DAVID NATANAEL VELÁZQUEZ MARTÍNEZ

DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ

DR. ÓSCAR RICARDO GALICIA CASTILLO

Proyecto apoyado por DGAPA-PAPIIT IN302512-3, PAPIME  
PE300715.

México, D.F.

JUNIO 2015





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi abuela, por todos los cuidados y las enseñanzas. Por ser el mayor ejemplo de entereza. Porque todos mis logros siempre han sido y serán dedicados a ti.

A mi papá, por ser tan inteligente, cariñoso y chido. No pude tener mejor padre que tú. Te admiro de muchas maneras papá.

A mi mamá, por todo el apoyo y el cariño que me has dado siempre. Te quiero mucho ma.

A mis tías Lety y Lupe, por estar siempre al pendiente de mí y ayudarme tanto. A Nancy, Viri y Luis, porque los considero mis hermanos, me han enseñado mucho.

A mis rommies, Nela y Arturo. Por todo lo que compartimos juntos, porque mi estancia en Querétaro no hubiera sido igual sin ustedes. A Kechu y Juan Pablo por los cotorreos y las charlas.

A mis amigos: A Manuel, por todo el cariño y todo lo que he aprendido de ti. A Helena, Tamara y Jimena, por todo lo que hemos crecido juntas. A Laura, Mema, Paulo, Hiram porque siempre que nos vemos aprendo algo nuevo. A Tío, Kalimba, Rodrigo, Jorge, Carlos e Israel por todos los buenos momentos. A Octavia, Erika y Daniela por ser unas amigas bien chidas y escucharme siempre. A María por todo lo que hemos compartido, gracias por ser más que una amiga. Bien saben que los quiero infinito.

A Rafa, porque siempre la paso muy bien contigo. Gracias por todas las visitas, por tanto cariño y por todo lo que compartimos. Te quiero mucho.

Al laboratorio NET: Brayan, Martín, Arely, Ingrid, R, Diego, Ana, Gaby, por aprender muchas cosas juntos y divertirnos en el camino.

Al laboratorio D-15, especialmente a Gaby, Ale y Edith. Gracias por todo lo que me enseñaron, sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

Al Dr. Hugo Sánchez Castillo y a Diana Paz, por introducirme al mundo de la ciencia. Por permitirme aprender tanto de ustedes. Los quiero.

Al Dr. Ataúlfo Martínez Torres por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por todo el apoyo y la valiosa orientación en la realización de este proyecto.

A mis sinodales, gracias por sus comentarios, por su apoyo para la construcción de este trabajo y sus valiosas perspectivas.

Finalmente quisiera agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México, por mi formación, por enseñarme el valor de las buenas ideas, el trabajo y la constancia. Gracias por permitirme trabajar en lo que más me gusta. Espero poder retribuirle algún día haciendo ciencia de calidad.

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>3</b>
3.1 ESQUIZOFRENIA.....	3
3.1.1 SÍNTOMAS COGNITIVOS EN ESQUIZOFRENIA.....	6
3.1.2 HIPÓTESIS DE ETIOLOGÍA EN ESQUIZOFRENIA.....	10
3.1.2.1 HIPÓTESIS ETIOLÓGICA DE NEURODESARROLLO.....	12
3.2 MODELO DE ESQUIZOFRENIA NVHL.....	16
3.2.1 CARACTERÍSTICAS CONDUCTUALES DEL MODELO NVHL.....	21
3.2.2 CARACTERÍSTICAS NEUROBIOLÓGICAS.....	24
3.3 SISTEMA COLINÉRGICO EN ESQUIZOFRENIA.....	26
3.3.1 NICOTINA COMO FÁRMACO PRO-COGNITIVO.....	31
3.3.2 AUTOMEDICACIÓN DE NICOTINA EN PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA.....	33
<b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>39</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>

<b>6. HIPÓTESIS.....</b>	<b>40</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>42</b>
7.1 SUJETOS EXPERIMENTALES.....	42
7.2 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA.....	42
7.3 EVALUACIÓN CONDUCTUAL Y ADMINISTRACIÓN DE NICOTINA..	43
7.4 CORROBORACIÓN DE LESIÓN.....	48
7.5 TINCIÓN DE GOLGI.....	49
7.6 ANÁLISIS DE DATOS.....	50
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
8.1 CORROBORACIÓN DE LESIÓN.....	52
8.2 EJECUCIÓN DE LABERINTO RADIAL.....	53
8.3 EJECUCIÓN DE LABERINTO RADIAL BAJO LA ADMINISTRACIÓN DE NICOTINA.....	60
8.4 COMPARACIONES CELULARES.....	65
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>72</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>79</b>
<b>11. REFERENCIAS.....</b>	<b>80</b>

## 1. RESUMEN

PALABRAS CLAVE: Esquizofrenia, Memoria de trabajo, Nicotina

La esquizofrenia es un trastorno neuropsiquiátrico que se caracteriza por 3 grupos de sintomatología: 1) sintomatología positiva o psicótica; 2) síntomas negativos y; 3) deficiencias cognitivas. Hasta el momento no existe un fármaco que pueda tratar todo el espectro de síntomas. Los fármacos antipsicóticos han sido la única alternativa de tratamiento. Sin embargo, se ha encontrado que éstos no mejoran las deficiencias cognitivas o los síntomas negativos. Se ha registrado que los pacientes con este trastorno consumen tabaco de manera crónica. Existen evidencias que sugieren que este consumo puede ser un intento de automedicación para las deficiencias cognitivas que no son atendidas con la farmacología clásica. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la administración crónica de nicotina en ratas con una lesión neonatal del hipocampo ventral. Esta lesión genera un modelo animal de esquizofrenia, nombrado modelo de Lesión del Hipocampo Ventral de la Rata Neonata (NVHL, por sus siglas en inglés) que ha sido ampliamente validado. Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley en condiciones estándar de laboratorio. Los sujetos fueron entrenados en una tarea de laberinto radial. Una vez adquirida la tarea, se introdujeron demoras en la ejecución. Las ratas fueron confinadas durante 10, 30, 90 o 180 segundos, tras la elección del tercer brazo. Posteriormente, se comenzó la administración crónica de nicotina, dos veces al día, en dosis de 0.5 mg/kg o solución salina como control. Mediante la técnica de Golgi rápido, se evaluó la morfología celular de neuronas granulares del hipocampo, y neuronas piramidales de la corteza. Los resultados indicaron que las ratas NVHL cometen más errores y gastan más tiempo visitando brazos que ya no contienen reforzador. Al evaluar la ejecución con demoras, los sujetos NVHL mostraron mayores déficits. La administración crónica de nicotina logró revertir las deficiencias y llevó la ejecución de los animales NVHL a valores similares del grupo SHAM. Las neuronas granulares mostraron claras diferencias morfológicas. En el grupo NVHL, el área ( $91.02 \mu\text{m}^2$ ) y diámetro ( $13.62 \mu\text{m}$ ) de soma fueron más pequeños que los valores del grupo SHAM ( $190.53 \mu\text{m}^2$  y  $21.31 \mu\text{m}$  respectivamente); la nicotina no revirtió estas diferencias. Por otro lado, las neuronas piramidales del grupo NVHL tuvieron valores más pequeños en el área ( $212.23 \mu\text{m}^2$ ) y diámetro ( $18.98 \mu\text{m}$ ) de soma, así como en la longitud de dendritas basilares ( $51.21 \mu\text{m}$ ); el tratamiento con nicotina revirtió este efecto ( $266.46 \mu\text{m}^2$ ,  $22.14 \mu\text{m}$  y  $60.35 \mu\text{m}$ , respectivamente). Se concluye que la nicotina fue efectiva para dar tratamiento a las deficiencias en memoria de trabajo asociadas al modelo NVHL. Este efecto podría estar siendo mediado por las neuronas piramidales de corteza. Para identificar el mecanismo por el cual la droga ejerce su efecto pro-cognitivo se requieren más estudios con el fin de precisar las bases moleculares y celulares de esta actividad farmacológica.

## **2. INTRODUCCIÓN**

La esquizofrenia es un trastorno neuropsiquiátrico discapacitante que afecta alrededor del 1% de la población mundial. Se caracteriza por tres grupos de síntomas: 1) Positivos, que definen el diagnóstico de la enfermedad y comprenden alucinaciones, ilusiones y problemas de pensamiento; 2) Negativos que engloban características como retraimiento social, anhedonia, falta de motivación, afecto plano, entre otras (Wong y Tol, 2003) y; 3) Cognitivos, son crónicos y persistentes, se relacionan altamente con la adaptabilidad del paciente. Éstos últimos se caracterizan por amplias deficiencias en atención, memoria, funciones ejecutivas, entre otras (Kuperberg y Heckers, 2000). A pesar de las consecuencias benéficas que implicaría el tratamiento de los síntomas cognitivos, pocos esfuerzos se han hecho para ofrecer medicación a este grupo de síntomas.

La patofisiología de la esquizofrenia no se ha descrito de manera concluyente. Durante muchos años se pensó que una hiperactividad dopaminérgica en ganglios basales era la responsable de la expresión del trastorno. Nuevas evidencias sugieren que este trastorno es resultado de anomalías en el desarrollo temprano del cerebro. Estas anomalías impactan de manera silente la circuitería nerviosa en varios niveles, provocando la expresión de síntomas psicóticos en periodos tardíos y de síntomas negativos y cognitivos desde edades tempranas (Owen, O'Donovan, Thapar, y Craddock, 2011).

El consumo de tabaco en pacientes con este trastorno es muy alto. Se ha mostrado que esta alta tasa de tabaquismo puede correlacionarse con un intento de automedicación. Esto debido a que la nicotina ha mostrado efectos pro-cognitivos en varias de las deficiencias cognitivas asociadas al trastorno (Kumari y Postma, 2005).

Basados en la hipótesis de neurodesarrollo, Lipska y Weingerber (1993) desarrollaron un modelo animal de esquizofrenia, el modelo de Lesión Neonatal en el Hipocampo Ventral (NVHL, por sus siglas en inglés). Los animales NVHL logran modelar varias de las características conductuales y neurobiológicas del trastorno; por ejemplo, menor interacción social y amplias deficiencias cognitivas. El modelo también reproduce la mayor propensión a consumo de sustancias observada en los pacientes (Tseng *et al.*, 2009).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la administración crónica de nicotina en un modelo de esquizofrenia ampliamente validado, para determinar si existe un efecto pro-cognitivo de esta droga. Asimismo se intentó determinar si la lesión temprana o la administración de nicotina dejarían consecuencias en la morfología neuronal.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 ESQUIZOFRENIA**

El psiquiatra suizo Eugen Bleuler introdujo el término esquizofrenia a principios del siglo pasado. El término buscaba referirse a una ruptura de la capacidad mental o la razón (Tandon, Nasrallah, y Keshavan, 2009). Actualmente, la Organización Mundial de la Salud se refiere a la esquizofrenia como un desorden mental severo, con afectaciones profundas en el pensamiento, lenguaje, percepción, afecto y conducta social (OMS, 2015).

Hasta el momento no existe ningún marcador biológico que permita confirmar el diagnóstico de esquizofrenia. El diagnóstico se hace a través de la observación de la conducta del paciente y mediante entrevistas clínicas que se comparan con los criterios diagnósticos enlistados en el Manual de Diagnóstico y Estadística de Desórdenes Mentales (DSM, por sus siglas en inglés) o Clasificación Internacional de Enfermedad (CIE-10) (Sawa y Snyder, 2002).

Dentro de la tricotomía de síntomas de la esquizofrenia, los síntomas positivos o psicóticos son características ausentes en la población general que se suman al comportamiento del paciente; se presentan de manera episódica y son el principal motivo de hospitalización y tratamiento. Los síntomas negativos describen la ausencia de características en los pacientes, que son reconocibles en individuos normales y junto a los síntomas cognitivos se presentan de manera crónica y persistente (Wong y Tol, 2003).

La sintomatología puede aparecer de manera aguda. Es decir que el estado psicótico puede desarrollarse en periodos de días o semanas o ser de inicio insidioso, donde existe un periodo prodrómico y hay un cambio gradual en la personalidad del paciente (OMS, 1998).

Los síntomas positivos se presentan en forma de alucinaciones, ilusiones, desorden de pensamiento y problemas motores. Las alucinaciones son percepciones sensoriales reportadas en ausencia de un estímulo externo y que no se comparten con otros. Generalmente éstas se presentan a manera de

alucinaciones auditivas; los pacientes reportan escuchar voces de una o varias fuentes que pueden ser claras o ininteligibles y expresar órdenes o ideas que afectan su comportamiento, también son comunes sensaciones físicas bizarras. Las ilusiones se definen como falsas creencias o referencias sobre la realidad. Se clasifican en paranoides, de persecución, de grandiosidad o de control externo. El desorden de pensamiento se refiere a anormalidades en el lenguaje escrito o hablado, esto en forma de pobreza del contenido de discurso, digresión continua y pérdida de asociaciones. Finalmente, los problemas en conducta motora se evidencian con posiciones bizarras mantenidas por largos periodos, patrones de movimiento repetitivos y sin dirección, actividad desorganizada e intensa seguida de periodos de inactividad con poca reactividad a estímulos externos (Mueser y McGurk, 2004).

Los síntomas negativos incluyen problemas en la expresión afectiva o afecto plano, caracterizado por tono vocal monótono y poca expresión facial, pérdida de motivación o abulia, alogia o pobreza de lenguaje, inhabilidad para experimentar placer, falta de iniciativa, poco interés en las actividades o apatía, así como un reducido interés por formar relaciones sociales. De manera general, los síntomas cognitivos incluyen déficits en la atención, memoria episódica, fluencia verbal, velocidad de procesamiento, funciones ejecutivas y memoria de trabajo, entre otras (Tandon *et al.*, 2009). Este grupo de síntomas será tratado a detalle en un apartado posterior.

La esquizofrenia tiene una prevalencia de 1.4 a 17 personas por cada 1000 habitantes en todas las poblaciones del mundo. Su incidencia anual es de entre 0.16 a 0.42 por cada 1000 personas. En la actualidad, la OMS calcula que existen 21 millones de personas a nivel mundial con este padecimiento (OMS, 2015). El trastorno suele comenzar en periodos de adolescencia tardía o etapas tempranas de adultez (entre los 16 y 30 años) y está marcado formalmente por la aparición de síntomas positivos (Tandon *et al.*, 2009). Si bien este trastorno no es directamente mortal, reduce la expectativa de vida de quien lo padece (Wong y Tol, 2003). Este trastorno también muestra una alta comorbilidad con abuso de

sustancias como alcohol, cannabis, alucinógenos, anfetaminas o cocaína, pero es especialmente alta la prevalencia de tabaquismo (OMS, 1998).

Hasta el momento no es clara la etiología del trastorno. En la literatura podemos encontrar consistencias que nos dan pistas sobre los correlatos nerviosos que dan lugar a la esquizofrenia. Se ha encontrado una reducción del volumen de corteza en regiones temporales y frontales, así como aumento en el tamaño ventricular, especialmente en los ventrículos tercero y laterales (Ho *et al.*, 2003). También se ha demostrado menor flujo sanguíneo y actividad metabólica en porciones frontales del encéfalo, lo cual se relaciona con sintomatología negativa y cognitiva (Mueser y McGurk, 2004).

Existe un amplio cuerpo de evidencias que demuestra una afectación hipocampal en este grupo de pacientes. El volumen hipocampal bilateral se encuentra reducido en personas con esquizofrenia, este hallazgo ha sido confirmado tanto por tejidos *post-mortem*, como por evaluaciones volumétricas con neuroimagen (Herold *et al.*, 2015; Kawano *et al.*, 2015). El decremento en el volumen hipocampal afecta principalmente a la porción anterior (Heckers, 2001).

Esta deficiencia se encuentra desde el primer episodio psicótico y se mantiene sin cambios significativos hasta periodos crónicos del trastorno (Adriano, Caltagirone y Spalletta, 2011). La reducción en el volumen del hipocampo se muestra independiente de la acción de antipsicóticos (Tamminga, Stan y Wagner, 2010). También se ha confirmado que familiares de pacientes con esquizofrenia muestran afectación hipocampal (Heckers, 2001).

Mediante técnicas de imagenología funcional se ha demostrado reducción de la actividad hipocampal ante la ejecución de tareas. Asimismo se observa una reducción en el metabolismo del hipocampo (Heckers, 2001). Por otro lado, los pacientes con esquizofrenia presentan alteraciones en la conectividad entre la corteza prefrontal y el hipocampo, evidenciado mediante análisis de redes neurales (Tamminga *et al.*, 2010). Las anomalías en la funcionalidad del

hipocampo se han correlacionado a la expresión de síntomas positivos y deficiencias cognitivas.

De igual forma, se han mostrado afectaciones en el hipocampo de este grupo de pacientes a nivel histológico y neuroquímico. Por ejemplo, se encuentra reducida la proteína Ki-67, un marcador de neurogenesis adulta, en el giro dentado (Tamminga *et al.*, 2010). Se encuentran menores niveles hipocampales de N-acetil-aspartato, resultado que indica menor densidad neuronal (Heckers, 2001). La afectación hipocampal se ha establecido como una de las anormalidades cerebrales más robustas encontradas en el trastorno.

### **3.1.1 SÍNTOMAS COGNITIVOS EN ESQUIZOFRENIA**

Las deficiencias cognitivas son una característica central del cuadro sintomatológico de la esquizofrenia. Los déficits cognitivos son evidentes previo a la aparición de síntomas positivos, durante el primer episodio psicótico, en pacientes no medicados (Sanders *et al.*, 2004), así como en familiares sanos de pacientes con esquizofrenia (Snitz, MacDonald, y Carter, 2006). Si bien, esta sintomatología se agudiza durante los episodios psicóticos, también están presentes durante los periodos de remisión, lo que nos habla de su cronicidad (Rund, Landro, y Orbeck, 1997).

Es bien sabido que la medicación antipsicótica clásica no da tratamiento a los síntomas cognitivos e incluso se ha reportado que empeora la severidad de estos. Aunado a lo anterior, existe un efecto negativo de las drogas anticolinérgicas prescritas para tratar síntomas extrapiramidales. Por su parte, la medicación antipsicótica de nueva generación tampoco aporta beneficios significativos a los síntomas cognitivos (O'Carroll, 2000).

Las deficiencias cognitivas incluyen varios dominios. Éstas abarcan desde capacidades relativamente primitivas y dependientes de regiones subcorticales como inhibición pre-pulso o potenciales evocados, hasta funciones de alto orden

dependientes de corteza como atención, memoria de trabajo y funciones ejecutivas (Wong y Tol, 2003).

Como ejemplo de las deficiencias dependientes de regiones subcorticales, se encuentran deficiencias en la respuesta de alarma y orientación ante estímulos inesperados e intensos. Para evaluar lo anterior, se utiliza la tarea de inhibición prepulso. En la población sana, un estímulo de poca intensidad (pre-pulso) presentado previo a un estímulo intenso, reduce la respuesta de alarma ante el segundo de ellos. Sin embargo, los pacientes con esquizofrenia no muestran esta inhibición, manteniendo una alta respuesta de sobresalto ante el segundo estímulo aunque el pre-pulso este presente. Esto evidencia una deficiencia en un mecanismo automático e involuntario de procesamiento de información sensorial y respuesta motora (Hamm, Weike y Schupp, 2001).

Otro tipo de deficiencias en esquizofrenia puede ser evaluado mediante potenciales evocados, es decir los componentes electrofisiológicos del procesamiento de información. Por ejemplo, el potencial de disparidad (Mismatch Negativity) es un patrón de respuesta electrofisiológica ante un estímulo dispar presente en el contexto de estímulos repetitivos y regulares. La respuesta se observa de 100 a 250 ms después del estímulo dispar en forma de una pronunciada onda negativa. En los pacientes con esquizofrenia se ha mostrado que el potencial de disparidad tiene una menor amplitud y una topografía alterada, mostrando así una deficiencia en el procesamiento sensorial de estímulos (Todd, Harms, Schall y Michie, 2013).

En pacientes con esquizofrenia también se han mostrado deficiencias para filtrar información sensorial relevante y una menor capacidad para inhibir respuestas ante estímulos insignificantes y redundantes. Esto se evalúa mediante la presentación repetitiva de estímulos auditivos y la aparición de una onda electrofisiológica positiva que aparece 50 ms después del estímulo (onda p50). De manera regular la onda p50 es menos pronunciada ante un segundo estímulo que ante un primer estímulo con las mismas características. En esquizofrenia la onda p50 ante el segundo estímulo muestra un decremento modesto, este problema en

la inhibición de estímulos subyace a síntomas como la hipervigilancia (Bob, Vlcek y Raboch, 2014).

Déficits en atención son evidentes al hacer evaluaciones como el Test de Ejecución Continua. En dicha prueba se presenta una larga serie de estímulos y se tiene que responder ante un objetivo particular inhibiendo la respuesta al resto de los estímulos. Se han demostrado deficiencias tanto en pacientes con esquizofrenia, como en sus familiares. Cuando se agregan distractores a la tarea se observa que la ejecución de los pacientes empeora y la de sus familiares se iguala a la ejecución control (Franke, Maier, Hardt, Hain y Cornblatt, 1994).

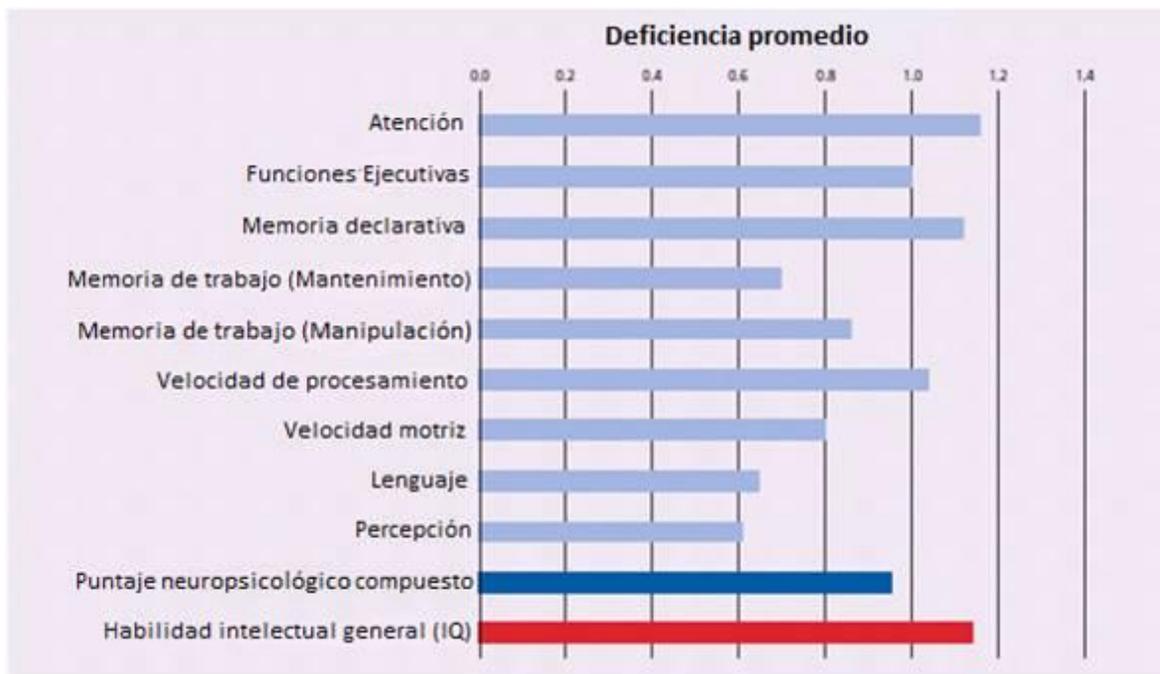
La habilidad para aprender y recordar información de eventos previamente experimentados también se ve sustancialmente afectada en la esquizofrenia. Se ha mostrado que las deficiencias en memoria se deben a problemas en la codificación y almacenamiento de información nueva. Esto principalmente en la modalidad declarativa, donde muestran problemas para codificar información de eventos o hechos. La memoria declarativa es dependiente de regiones mediales temporales, incluyendo al hipocampo (Barch y Ceaser, 2012). Por su parte, deficiencias en memoria procedimental, como la habilidad para aprender nuevas habilidades motoras, son moderadas (Sharma y Antonova, 2003).

Las funciones ejecutivas incluyen habilidades dependientes de regiones frontales como abstracción y planeación, razonamiento, auto monitoreo, flexibilidad cognitiva e inhibición de respuestas inmediatas priorizando resultados a largo plazo. La evaluación de las funciones ejecutivas se hace a través de pruebas neuropsicológicas como el Wisconsin Card Sorting Test (WCST) o el test de Stroop, por mencionar algunas. Se ha mostrado una severa deficiencia en la ejecución de estas tareas en sujetos con esquizofrenia comparados con sujetos sanos. Por otro lado las características clínicas en esquizofrenia recuerdan las deficiencias en funciones ejecutivas mostradas por personas con lesiones en lóbulos frontales (Reichenberg, 2010).

La memoria de trabajo depende de la actividad de la corteza prefrontal dorsolateral (CPF DL), región que muestra hipoactividad basal en pacientes con esquizofrenia. Las deficiencias en memoria de trabajo en este grupo de pacientes son evidentes tanto con estímulos verbales, como visoespaciales, donde se tiene que mantener el estímulo en línea por un periodo breve de tiempo y manipularlo durante la ejecución (Sharma y Antonova, 2003). También se ha mostrado reducción de actividad de la CPF DL en pacientes y familiares de primer grado ante tareas de memoria de trabajo (Barch y Ceaser, 2012). A manera de resumen, en la *Figura 1* podemos observar, en análisis meta-analíticos, el grado de déficit que existe en los pacientes con esquizofrenia en varias funciones cognitivas.

Estudios de neuroimagen sugieren que las deficiencias cognitivas involucran a una red que abarca la corteza frontal y temporal, la corteza cingular anterior, el hipocampo y ciertas regiones subcorticales (Kuperber y Heckers, 2000).

Se ha reportado que la sintomatología psicótica correlaciona pobremente con el pronóstico de adaptabilidad de los pacientes con esquizofrenia. Sin embargo, los déficits cognitivos predicen en buena medida la funcionalidad de los pacientes y si serán capaces de llevar una vida independiente. Por ejemplo, las deficiencias en memoria declarativa correlacionan con la funcionalidad social y ocupacional de los pacientes ya que se requiere aprender y recordar nueva información para sobrellevar de manera adaptativa estas actividades. Las funciones ejecutivas se ven relacionadas con planeación del día, priorización de actividades y resolución de problemas; sus deficiencias se ven involucradas en las bajas tasas de empleo de estos pacientes (Sharma y Antonova, 2003). Es por esto que el tratamiento a los síntomas cognitivos es de suma importancia ya que indudablemente ayudaría al mejor pronóstico en este grupo de pacientes, así como una mejor adaptabilidad y calidad de vida.



*Figura 1.* Perfil de ejecución neuropsicológica en esquizofrenia. Resume el resultado de estudios meta-analíticos de cada una de las funciones cognitivas enlistadas en el texto. Un déficit leve es indicado si el puntaje está entre 0.2 y 0.5 desviaciones estándar debajo de la ejecución normal. Un déficit moderado se encuentra entre 0.5 y 0.8 desviaciones estándar debajo de ejecución control. Un déficit severo se encuentra con 0.8 o mayores desviaciones estándar por debajo de puntuaciones normativas. Como se puede observar la ejecución cognitiva promedio en pacientes con esquizofrenia va de deficiencias moderadas a severas. Modificado de Reichenberg, 2010.

### **3.1.2 HIPÓTESIS DE ETIOLOGÍA EN ESQUIZOFRENIA**

La Hipótesis Dopaminérgica sobre esquizofrenia ha sido, sin lugar a dudas, la más relevante tanto en la investigación como en el tratamiento del trastorno. Se inició en 1950 con el descubrimiento y uso de la medicación neuroléptica. Se comenzó con la descripción de los efectos del neuroléptico clorpromazina, que ayudaba a la disminución de la sintomatología psicótica y disminuía la hiperactividad, permitiendo que los pacientes dejaran la hospitalización (Sawa y Snyder, 2002). Los neurolépticos tienen efecto antipsicótico gracias al bloqueo de receptores dopaminérgicos tipo D<sub>2</sub> en regiones como el núcleo accumbens y corteza

prefrontal. Sin embargo, el bloqueo de estos receptores en regiones como el caudado putamen, resemble a la enfermedad de Parkinson por severos efectos secundarios como tremor, rigidez y bradicinesia. Seeman (1974) demostró que la potencia con la que estos neurolepticos bloquean receptores D<sub>2</sub> correlaciona directamente con la efectividad para disminuir la sintomatología psicótica (Seeman, 1987).

Estudios posteriores mostraron que drogas como las anfetaminas, que incrementan la disponibilidad sináptica de monoaminas, inducían síntomas psicóticos como alucinaciones en sujetos sanos (Howes y Kapur, 2009). Por otro lado, se comparo la respuesta a la administración de anfetaminas entre pacientes con esquizofrenia y sujetos control; los primeros mostraron un incremento sustancial en la transmisión dopaminérgica y una exacerbación de los síntomas positivos (Abi-Dargham, 2004).

Otras evidencias han correlacionado variantes del gen que codifica para la enzima Catecol-O-Metiltransferasa (COMT) con riesgo de desarrollar psicosis; esta enzima es fundamental en la degradación de catecolaminas incluida la dopamina. También se ha evidenciado mayor síntesis dopaminérgica estriatal con la ayuda de L-dopa radiomarcada y, mediante técnicas de imagenología, se ha confirmado una mayor liberación dopaminérgica en estriado. Los pacientes con esquizofrenia muestran una densidad elevada de receptores D<sub>2</sub> que es independiente del uso de antipsicóticos (Howes y Kapur, 2009).

La hipótesis dopaminérgica se ha reformulado con el paso del tiempo, ahora se intenta describir cómo impacta en síntomas cognitivos y negativos. Por ejemplo, la hipofrontalidad que se ha relacionado con deficiencias cognitivas se asocia a menores niveles de metabolitos de dopamina en regiones frontales. Debido a esto, la teoría describe una hiperdopaminergia en porciones subcorticales que son responsables de síntomas positivos, coexistiendo con una hipodopaminergia en porciones frontales responsable de síntomas negativos y cognitivos (Howes y Kapur, 2009). Los receptores D<sub>1</sub> tienen una vasta densidad en corteza. En esquizofrenia se ha mostrado un incremento en la densidad de estos receptores

en la corteza prefrontal dorsolateral, sugiriendo un mecanismo compensatorio ante la menor transmisión dopaminérgica de esta región (Abi-Dargham, 2004).

Aunque con menor impacto, también se han desarrollado hipótesis etiológicas de la esquizofrenia que involucran a otros sistemas de neurotransmisión. Por ejemplo, implicaciones del sistema serotoninérgico dado que la medicación antipsicótica atípica como la clozapina, olanzapina o risperidona bloquea con mayor potencia receptores tipo 5-HT<sub>2</sub>-like que receptores D<sub>2</sub>. Los antipsicóticos atípicos dan tratamiento tanto a sintomatología positiva como negativa y tienen menores efectos secundarios que la medicación clásica. Se han observado reducciones del receptor 5-HT<sub>2A</sub> e incrementos del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en cerebros de pacientes confirmado mediante estudios de imagenología y *post-mortem* (Reynolds, 2008).

Por otro lado, existe evidencia que sugiere una actividad disminuida del receptor glutamatérgico NMDA en esquizofrenia. Por ejemplo, el consumo de fenciclidina (PCP) o de ketamina, potentes bloqueadores de receptores NMDA, causan estados psicóticos en sujetos sanos, mientras que el consumo de estas drogas en pacientes con esquizofrenia logra exacerbar los síntomas (Sawa y Snyder, 2002). En hipocampo, corteza temporal, estriado y corteza frontal, se ha observado una reducción de transmisión glutamatérgica. También se ha reportado consistentemente pérdida de neuronas GABAérgicas en corteza e hipocampo, mostrado, con menor cantidad de enzima GAD, menor señal de proteínas que se unen a calcio y deficiencias en parvalbumina (Reynolds, 2008).

### **3.1.2.1 HIPÓTESIS ETIOLÓGICA DE NEURODESARROLLO**

Es indudable la vasta cantidad de evidencia sobre el papel del sistema dopaminérgico en esquizofrenia. Sin embargo, la interacción de otros sistemas de neurotransmisión logrando explicar una mayor cantidad de síntomas apunta a que la etiología de la esquizofrenia no se encuentra en un sólo sistema. Por otro lado, evidencias como el hecho de que la medicación antipsicótica es inefectiva en 20 a

30% de los pacientes (OMS, 1998) han retado la concepción actual de la esquizofrenia, guiando así la investigación hacia nuevos paradigmas.

Una nueva concepción sobre la etiología de la esquizofrenia es la Hipótesis del Neurodesarrollo. Ésta apunta que los cambios cerebrales asociados al trastorno se deben a detrimentos en el desarrollo del encéfalo en momentos pre o perinatales que predisponen a los pacientes a un patrón definido de malfuncionamiento cerebral en la vida adulta (Pantelis, Yücel, Wood, McGorry y Velakoulis, 2003). Rapoport y colaboradores (2012), dictan que la esquizofrenia es el punto final de un proceso de neurodesarrollo anormal que inicia varios años antes del comienzo de la enfermedad.

Una clara evidencia a favor de esta hipótesis es el hecho de que eventos perinatales adversos como preclampsia, bajo peso del neonato, atonía uterina, anoxia o hipoxia fetal, infecciones prenatales, entre otras, se relacionan con el riesgo a desarrollar esquizofrenia. Por ejemplo, la hipoxia fetal correlaciona con la cantidad reducida de materia gris y el incremento de fluido cerebroespinal en pacientes con esquizofrenia (Rapoport, Addington, Frangou y Psych, 2005).

Otra evidencia a favor de la Hipótesis de Neurodesarrollo es el hecho de que los pacientes con esquizofrenia muestran “anormalidades físicas menores”, es decir anormalidades morfológicas con poca significancia funcional en la cara, manos o pies y que suelen reflejar daños en etapas intrauterinas de desarrollo (Tandon *et al.*, 2009). También se han encontrado evidencias en estudios retrospectivos, donde se muestran signos premórbidos sutiles en niños que desarrollaron esquizofrenia, como problemas motores, cognitivos, de lenguaje y en interacción social desde la infancia temprana (Weinberger, 1996). Se ha mostrado que infantes que desarrollarán esquizofrenia muestran pobres relaciones con pares, aislamiento y ansiedad social, bajo rendimiento académico y puntajes bajos en evaluaciones cognitivas. Otro dato relevante indica que el 53% de los pacientes con esquizofrenia tuvieron otro diagnóstico psiquiátrico previo a los 15 años, como depresión, TDAH, desorden desafiante oposicionista o ansiedad (Rapoport *et al.*, 2005).

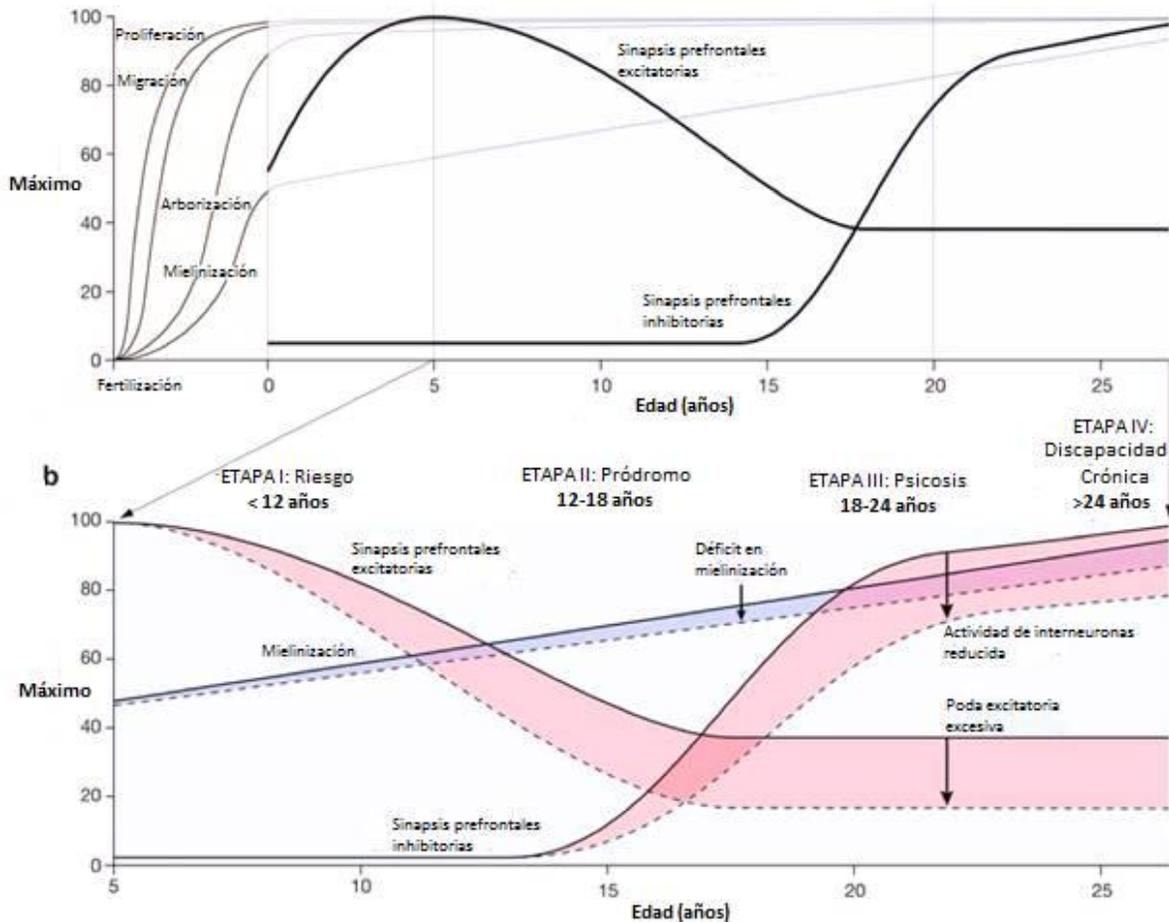
La sintomatología clínica típica de la esquizofrenia se manifiesta hasta periodos de adolescencia o adultez temprana. Esto debido a que, particularmente en regiones corticales frontales, hay procesos finales de maduración cerebral en dichos periodos; como eliminación programada de sinapsis (deficiente en estos pacientes), o decremento en el factor de crecimiento nervioso (Andreasen, 2010). La *Figura 2* intenta modelar el curso normal de desarrollo cerebral contra el curso patológico de pacientes con esquizofrenia. Como se puede observar, el periodo de adultez temprana es crítico en la formación de sinapsis funcionales en corteza, por lo que aberraciones en este momento del desarrollo desencadenarían la sintomatología del trastorno.

Los giros y surcos de la corteza se completan alrededor del tercer semestre de gestación. En estos pacientes se ha evidenciado reducción de circunvoluciones así como una reducción de la asimetría sulcal de la corteza cingular anterior (Pantelis *et al.*, 2003). En tinciones de Nissl, hechas a cerebros de pacientes con esquizofrenia, se mostraron anormalidades citoarquitectónicas, como problemas en la organización laminar, menor cantidad de células en la capa I y II y cúmulos celulares en capas profundas de corteza que normalmente se encuentran en la capa II. Esto apunta a problemas en la corticogénesis y migración celular (Weinberger, 1996).

Las anormalidades en la morfología y funcionalidad cerebral bien podrían ser considerados artefactos debido a la medicación antipsicótica o mala calidad de vida de estos pacientes. Sin embargo, técnicas de imagenología han permitido constatar que son inherentes al trastorno, evidenciando que tanto el alargamiento ventricular, como el decremento en el volumen de la corteza frontal y temporal se encuentran en periodos tempranos del trastorno (Weinberger, 1996; Pantelis *et al.*, 2003) y en pacientes libres de medicación (Andreasen *et al.*, 1996).

Por otro lado, algunos genes que han sido relacionados con el riesgo a desarrollar esquizofrenia suelen codificar para proteínas involucradas en el desarrollo cerebral. Por ejemplo, el gen Neuroregulina (*NRG1*) se relaciona con migración neuronal sobretodo en periodos prenatales, señalización celular y mielinización. El

gen *DISC-1* (Disrupted-in-schizophrenia 1) se relaciona altamente con el desarrollo del hipocampo (Rapoport *et al.*, 2005).



**Figura 2.** Modelo de desarrollo normal comparado contra modelo de desarrollo patológico en esquizofrenia. En el panel superior se puede observar que durante el periodo de gestación se llevan a cabo importantes procesos de proliferación, migración, arborización y mielinización. El desarrollo continúa a través de la vida del sujeto a manera de formación y eliminación de sinapsis que atraviesan por un periodo de alta demanda entre los 18 a 25 años. La hipótesis del neurodesarrollo sugiere que el desarrollo del encéfalo sufre anomalías que se mantienen desde periodos perinatales hasta la edad adulta. La génesis de sinapsis corticales, sobretudo prefrontales, da lugar a la expresión del trastorno en periodos de adultez temprana. La expresión clínica del trastorno se acompaña de deficiencias en la mielinización, reducción de actividad de interneuronas inhibitorias y mayor eliminación de sinapsis excitatorias. Tomado de Rapoport *et al.*, 2012.

### **3.2 MODELO DE ESQUIZOFRENIA NVHL**

Es indudable la utilidad de los modelos animales para el estudio de trastornos psiquiátricos; permiten investigar bases neurobiológicas del trastorno, monitorear el progreso de la patología así como realizar procedimientos invasivos para evaluar cambios estructurales y moleculares (Jones, Watson y Fone, 2011).

Para que un modelo animal arroje resultados confiables debe cumplir con tres criterios de validez (Genis y Lopez-Rubacava, 2011):

- 1) Criterio de validez predictiva. Si un fármaco modifica de manera consistente la conducta o fisiología en la enfermedad humana, este fármaco debe replicar esta modificación en el modelo animal del trastorno dado.
- 2) Criterio de validez aparente. Se deben reproducir en el modelo animal las características más representativas del trastorno, debe contar con homología de síntomas.
- 3) Criterio de validez de constructo. Dicta que la hipótesis que mejor explique la etiología del trastorno psiquiátrico debe servir como fundamento al modelo animal.

El problema radica en recrear símiles de conductas humanas y características complejas en un animal sano tras una manipulación experimental. Por ejemplo, incremento en locomoción y conductas estereotipadas nos dan información sobre los síntomas positivos, mientras que conductas de aislamiento y agresividad emulan síntomas negativos. Estas conductas tienen un correlato directo con las características clínicas del trastorno (Ratajczak, Wozniak y Nowakowska, 2013).

Un modelo animal de esquizofrenia debe poder reproducir características neurobiológicas ampliamente descritas en el trastorno. Características como deficiencia de función hipocampal y/o cortical, desregulación dopaminérgica en regiones límbicas, hipoactividad glutamatérgica, alargamiento de ventrículos, entre otras (Jones *et al.*, 2011). En la *Tabla 1* se hace una relación de la sintomatología en esquizofrenia y su correlato en animales.

El organismo *Schizophrenia Research Forum*, en su actualización más reciente (2014), enlista más de 120 modelos animales de esquizofrenia, cada uno con sus ventajas y desventajas. Cabe recalcar que cada modelo mimetiza de mejor manera cierta categoría de síntomas, es decir, ninguno logra capturar todas las características clínicas y neurobiológicas del trastorno. Los modelos animales han sido generados con administraciones farmacológicas, lesiones, modificaciones genéticas y modelos de neurodesarrollo. La mayoría de los modelos se desarrollan en roedores y en menor cantidad en primates no humanos.

Sintomatología Clínica de Esquizofrenia	Observaciones en modelos animales de esquizofrenia
<b>Síntomas psicóticos</b>	Conductas relacionadas al incremento de transmisión dopaminérgica por ejemplo: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Locomoción y estereotipias inducidas por dopamina</li> <li>• Reducción de catalepsia inducida por haloperidol</li> </ul>
<b>Empeoramiento de síntomas psicóticos con agonistas dopaminérgicos y antagonistas NMDA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antagonismo NMDA induce mayor locomoción</li> <li>• Anfetaminas inducen hiperactividad</li> </ul>
<b>Vulnerabilidad a estrés</b>	Hiperlocomoción inducida por estrés
<b>Problemas en procesamiento de información</b>	Deficiencias en inhibición prepulso y ondas p50
<b>Deficiencias cognitivas</b>	Déficits en inhibición latente, memoria espacial, memoria de trabajo
<b>Retraimiento social</b>	Reducción de contacto con otros animales

*Tabla 1.* Aspectos clínicos en esquizofrenia y conductas relevantes en modelos animales. Modificado de Lipska y Weinberger, 2000.

En los modelos farmacológicos se administran drogas de forma aguda o crónica en periodos de adultez. Con la administración crónica de agonistas dopaminérgicos, como anfetaminas o cocaína, se induce hiperactividad, pero existen problemas para reproducir síntomas negativos (Jones *et al.*, 2011).

Los modelos animales de lesión se han generado con daños al hipocampo, corteza frontal, corteza prefrontal dorsolateral y amígdala, replicando deficiencias

sociales y conductas dependientes de dopamina (Schizophrenia Research Forum, 2014).

En el desarrollo de modelos genéticos se generan animales con modificaciones en genes involucrados en plasticidad neuronal, sinaptogénesis y sistemas glutamatérgicos o dopaminérgicos asociados con el riesgo a desarrollar esquizofrenia. Por ejemplo, se han realizado modificaciones en la expresión del gen *DISC-1* (Disrupted-in-schizophrenia 1) que codifica para una proteína sináptica expresada en el desarrollo temprano, involucrada en la formación neuronal, migración y plasticidad (Young-Pearse, Suth, Luth, Sawa, y Selkoe, 2010). Se han generado siete cepas con diferentes mutaciones de este gen. Estos animales muestran alargamiento de ventrículos, reducción de grosor cortical y de volumen cerebral, así como menor complejidad dendrítica (Jaaro-Peled, 2009). Es poco probable que se represente la complejidad del trastorno tras la modificación de un solo gen. Modificaciones de varios genes, restringidas a localizaciones anatómicas de importancia pueden generar más información, evitando el efecto de mecanismos compensatorios (Jones *et al.*, 2011).

Los modelos de neurodesarrollo utilizan manipulaciones ambientales o administración de drogas durante periodos críticos perinatales, produciendo cambios irreversibles en el desarrollo del sistema nervioso. Estos modelos son buenos replicando la cronología de la sintomatología en esquizofrenia. Algunos ejemplos son la administración prenatal de la neurotoxina Acetato de Metilazoximetanol (MAM), un agente que metila ADN y afecta la proliferación de neuroblastos en el sistema nervioso sin afectar las células gliales, produce deficiencias conductuales a largo plazo así como alargamiento de ventrículos (Lodge y Grace, 2009).

Existe un modelo animal, desarrollado en ratas, que ha demostrado reproducir robustamente las características fenomenológicas y neurobiológicas del trastorno. El modelo Neonatal de Lesión del Hipocampo Ventral (NVHL, por sus siglas en inglés) ha sido utilizado en más de 100 investigaciones originales para el estudio del trastorno (Tseng, Chambers y Lipska, 2009).

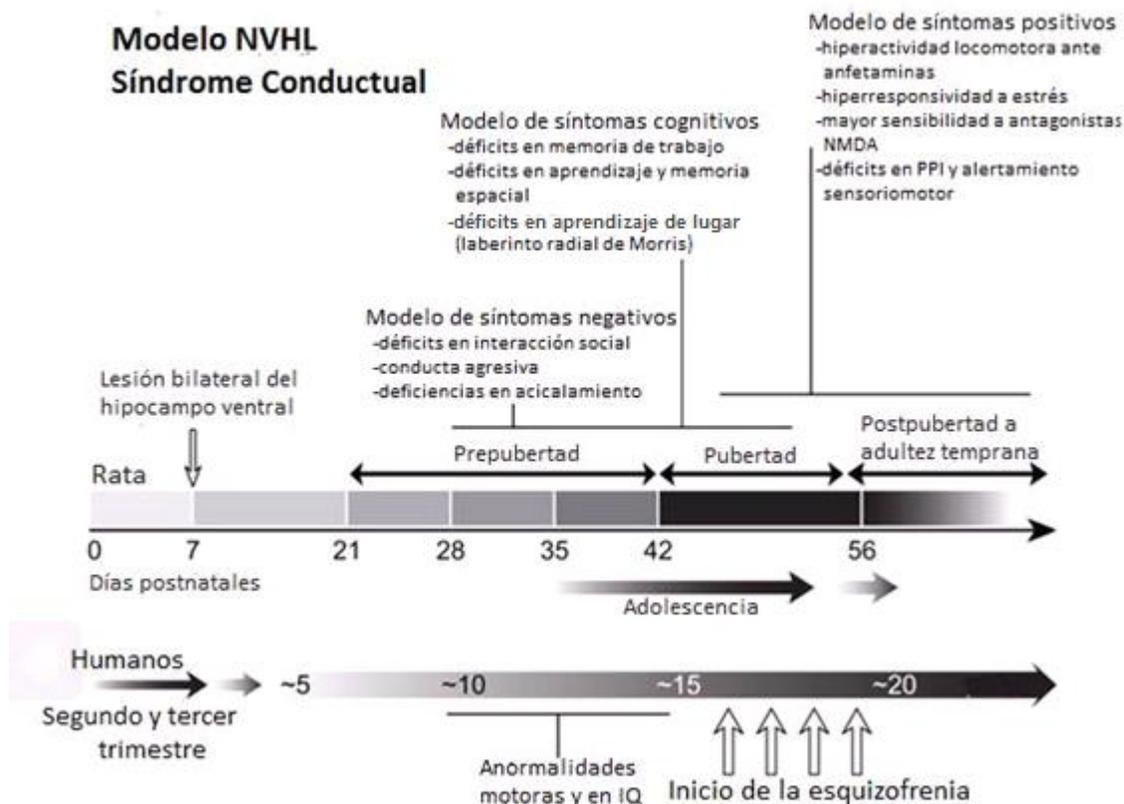
El modelo NVHL, desarrollado por Lipska y Weinberger, busca interrumpir el desarrollo del hipocampo, área consistentemente descrita en la patofisiología de la esquizofrenia (Adriano *et al.*, 2011; Heckers, 2001; Tamminga *et al.*, 2010). Esta interrupción afecta la circuitería cortical y subcortical que mantiene comunicación con el hipocampo y replica el alargamiento ventricular consistentemente reportado en esquizofrenia. La porción ventral del hipocampo en ratas corresponde a la porción anterior del hipocampo en humanos (Lipska y Weinberger, 2002).

Para generar el modelo NVHL se realiza una lesión excitotóxica bilateral del hipocampo ventral en el día postnatal 7 de la rata; este periodo es homólogo al tercer trimestre de gestación en humanos (Tseng *et al.*, 2009). El modelo NVHL se considera un modelo heurístico ya que ha generado nueva información conductual y neurobiológica no esperada por la mera manipulación del hipocampo (Lipska y Weinberger, 2002).

La lesión neonatal ha mostrado la emergencia tardía de anomalías en conductas dependientes de incrementos de dopamina en regiones mesolímbicas y nigroestriatales. Al evaluarse en periodos de infancia (día postnatal 35), las ratas lesionadas muestran conductas motoras normales ante estrés y agonistas dopaminérgicos, pero son menos sociales que las control. Durante la adolescencia o adultez (día postnatal 56), estos animales responden con hiperactividad ante los mismos estímulos y muestran mayor cantidad de estereotipias. Los animales NVHL muestran deficiencias cognitivas desde edades pre-pubertales, que incluyen déficits en inhibición prepulso y memoria de trabajo (Tseng *et al.*, 2009).

La expresión retardada de conductas similares a los síntomas positivos y la expresión de deficiencias cognitivas y negativas mostradas en periodos previos a la adolescencia mimetiza en buena medida la cronología del trastorno. Este retardo en conductas similares de síntomas positivos no es dependiente de hormonas gonadales; la depleción de éstas previo a la pubertad no afecta el curso de aparición de estas deficiencias conductuales en NVHL (Lipska y Weinberger, 2002). Si la lesión se hace en días postnatales 14, 21 o posteriores, no se

reproduce la cronología de síntomas, las anomalías son menos pronunciadas y cualitativamente diferentes (Tseng *et al.*, 2009). En la *Figura 3* se muestra una comparación entre la expresión de síntomas en esquizofrenia y la aparición de características conductuales en NVHL.



*Figura 3.* Línea del tiempo que describe los cambios conductuales en el modelo NVHL y la comparación con la emergencia de síntomas en el trastorno de esquizofrenia. La lesión del hipocampo ventral se hace en el séptimo día postnatal de la rata, asemejándose al periodo entre el segundo y tercer trimestre de gestación en humanos. Los síntomas negativos y cognitivos se caracterizan por preceder a la sintomatología psicótica, los primeros se expresan en las ratas desde los días postnatales 35 y se mantienen hasta la adultez del animal. Mientras que características conductuales que asemejan a los síntomas positivos, se muestran en la rata alrededor de los periodos de adultez temprana (día postnatal 56). Esto muestra el poder del modelo NVHL para replicar los tres grupos de sintomatología presentes en el trastorno, así como la cronología de aparición de los síntomas. Tomado de Tseng *et al.*, 2009.

Una buena crítica a este modelo es el hecho de que en los pacientes con esquizofrenia no se observa una “lesión” en el hipocampo. Por ello se ha probado la inactivación del hipocampo ventral en el día postnatal 7 con Tetrodotoxina, bloqueador de canales de sodio dependientes de voltaje. Con dicha manipulación, se mostró que las deficiencias conductuales así como el patrón temporal de aparición se mantienen aunque con menor magnitud. No obstante, la generación del modelo NVHL se sigue haciendo con una neurotoxina ya que permite confirmar la localización del daño (Tseng *et al.*, 2009).

El modelo NVHL cumple con los tres criterios de validez antes mencionados. En cuanto a la validez predictiva, se ha mostrado respuesta a medicación antipsicótica, así como irreversibilidad de la sintomatología sin tratamiento. Cumple con características que mimetizan los síntomas positivos, negativos y cognitivos típicos de la esquizofrenia, mostrando validez aparente. Finalmente el modelo se basa en la hipótesis de neurodesarrollo de esquizofrenia evidenciando que una lesión neonatal puede causar afectaciones en periodos adultos de la vida del animal (Lipska y Weinberger, 2000).

### **3.2.1 CARACTERÍSTICAS CONDUCTUALES DEL MODELO NVHL**

Lipska y colaboradores en 1993, realizaron uno de los trabajos pioneros que demuestran la existencia de deficiencias conductuales en NVHL asociadas a síntomas positivos. En dicho estudio mostraron que en periodos tempranos (día postnatal 35) no hay diferencia en la motricidad de ratas NVHL ante un ambiente novedoso o administración de d-anfetamina. Sin embargo, las ratas NVHL muestran hiperactividad ante estos estímulos si son evaluadas en periodos de adultez (Día postnatal 56). Los animales NVHL también muestran hiperresponsividad ante estrés en edades de adultez. Sin embargo, si la lesión del hipocampo ventral se genera en ratas adultas no se mantiene el mismo perfil conductual (Lipska, Jaxkiw y Weinberger, 1993).

Entre otras características conductuales que se asemejan a los síntomas positivos, en las ratas NVHL encontramos menor respuesta cataleptica ante haloperidol y mayor sensibilidad a apomorfina. Estos sujetos también muestran mayor sensibilidad a antagonistas glutamatérgicos como MK-801 y PCP (*Tseng et al.*, 2009).

Como muestras de modelamiento de síntomas negativos se ha reportado un decremento significativo en tiempo invertido en interacciones sociales y un incremento en conductas agresivas. Asimismo, se demostró que las ratas NVHL mostraban la emergencia de estos síntomas en periodos de pubertad. Se compararon estos datos con ratas lesionadas en periodos de adultez y con lesiones en el hipocampo ventral o dorsal; estos grupos de animales no desplegaban deficiencias en interacción social (Becker, Grecksch, Bernstein, Höllt y Bogerts, 1999).

Los animales NVHL muestran varias deficiencias cognitivas. Tomemos como ejemplo la tarea de inhibición latente que arroja un índice sobre la capacidad de ignorar estímulos irrelevantes. En dicha tarea, las ratas control mostraron una menor adquisición de una respuesta condicionada cuando el estímulo condicionado había sido previamente mostrado sin consecuencia alguna. Por su parte, las ratas NVHL mostraron una rápida adquisición de la respuesta condicionada, evidenciando una menor capacidad para filtrar la irrelevancia del estímulo previo al condicionamiento (Grecksch, Bernstein, Becker, Höllt y Bogerts, 1999).

Otro estudio muestra que las ratas tienen deficiencias en inhibición prepulso, deficiencia que es reiteradamente reportada en personas con esquizofrenia. A estas ratas se les realizó resonancia magnética funcional para observar las áreas cerebrales relacionadas con ese déficit, mostrando una mayor perfusión en el núcleo accumbens y una menor perfusión en la corteza temporal (*Risterucci et al.*, 2005).

Otra característica presente en el modelo NVHL son las deficiencias en potenciales evocados. Los animales muestran menor amplitud de la onda N-40 (componente negativo registrado en corteza) encontrado de 40 a 60 milisegundos después de la presentación de un estímulo auditivo. Esta onda se correlaciona con el filtrado de información sensorial que se ha mostrado consistentemente afectado en esquizofrenia (Romero-Pimentel *et al.*, 2014).

Asimismo, se evaluó la ejecución de las ratas NVHL en una tarea de memoria de trabajo dependiente de la comunicación entre el hipocampo y la corteza prefrontal. Se entrenó a los animales en un laberinto radial en edades prejuveniles (día postnatal 25), juveniles (día postnatal 40) y en la edad adulta (día postnatal 80). Las deficiencias en la exactitud de elección de brazo fueron evidentes desde edades tempranas y se mantuvieron hasta la edad adulta; hallazgo congruente con los reportes de deficiencias cognitivas en pacientes (Chambers, Moore, McEvoy y Levin, 1996).

El modelo NVHL también replica el abuso de sustancias, mostrado en los pacientes con esquizofrenia. Por ejemplo, se ha mostrado una rápida adquisición de auto-administración de cocaína, mayores efectos de síndrome de abstinencia y mayor readquisición de consumo. Se reportan mayores niveles de impulsividad, previo y posterior al consumo de cocaína, así como mayor sensibilización ante cocaína y alcohol (Conroy, Rodd y Chambers, 2007).

Además, se ha evaluado la respuesta de sensibilización motriz ante la administración crónica de nicotina (0.5mg/kg). Durante los primeros días de administración no se mostraba diferencia entre las ratas NVHL o sham; tras el paso de las administraciones, las ratas NVHL con administración de nicotina mostraron mayor respuesta locomotriz. Tras un periodo sin administración se volvió a inyectar a los sujetos experimentales, las ratas NVHL pre-expuestas a nicotina mostraron una exacerbada respuesta motora. El trabajo demuestra que las ratas NVHL mantienen una respuesta incrementada ante la droga (Berg y Chambers, 2008).

El tratamiento antipsicótico puede revertir ciertas anomalías conductuales en NVHL. El haloperidol y la clozapina revierten la actividad locomotora incrementada por estímulos que promueven la transmisión dopaminérgica como estrés, anfetaminas o estímulos novedosos. Dosis bajas de risperidona reducen la hiperlocomoción causada por el antagonismo de drogas NMDA (O'Donnell, 2012). Como ya se ha mencionado, la medicación antipsicótica se ha mostrado inefectiva para el tratamiento de síntomas cognitivos. Esto último se replica en el modelo NVHL; el tratamiento con clozapina no mejora las deficiencias en ejecución de laberinto radial e incluso empeora la ejecución de ratas NVHL machos, mostrando efectos adversos en la memoria de trabajo (Levin y Christopher, 2006).

### **3.2.2 CARACTERÍSTICAS NEUROBIOLÓGICAS**

Varias evidencias en el modelo sugieren que existe una desconexión y malfuncionamiento entre la corteza prefrontal y el hipocampo ventral. En la corteza prefrontal de ratas NVHL se muestran niveles menores de BDNF, menor cantidad de RNAm de GAD67, incremento en densidad de receptores GABA-A e incremento en Oxido Nítrico (Tseng *et al.*, 2009).

En estudios electrofisiológicos también se ha mostrado esta desconexión. La estimulación del área ventral tegmental incrementa dramáticamente el patrón de disparo de células piramidales corticales en ratas NVHL. Con la misma manipulación, en ratas sham se observa una supresión de la tasa de disparo de estas neuronas; esto se interpreta como una pérdida de la modulación dopaminérgica de interneuronas inhibitorias en corteza. El aumento de disparo ante estimulación del área ventral tegmental también ha sido reportado en el núcleo accumbens de ratas adultas NVHL, pero no juveniles, y es revertido por haloperidol (O'Donnell, 2012). Estos resultados apuntan a una maduración anormal del balance excitatorio e inhibitorio de corteza en periodos de periadolescencia y puede ser el mecanismo responsable de las deficiencias

cognitivas observadas tanto en el modelo como en los pacientes con esquizofrenia.

Existen otros marcadores que indican malfuncionamiento cortical en animales NVHL. Por ejemplo, niveles reducidos de N-acetilaspártato (NAA, un marcador de integridad neuronal), menor expresión cortical de EAAC1 (transportador glutamatérgico) y reducción de liberación de potasio en presencia de glutamato (Jones *et al.*, 2011). También se ha reportado menor liberación cortical de dopamina en respuesta a estrés y alteración en la expresión de factores de transcripción como c-fos. Estos datos manifiestan que las alteraciones corticales son resultado de un complejo desbalance entre dopamina, glutamato y GABA (Lipska y Weinberger, 2000).

También se han encontrado consecuencias de la lesión neonatal en regiones subcorticales. Se describió una menor expresión del transportador de dopamina (DAT) en mesencéfalo, asimismo, se ha reportado mayor cantidad de dinorfina (opiode que colocaliza con receptores D<sub>1</sub>) en estriado (Lipska y Weinberger, 2000). En el modelo, con o sin historia de aislamiento social (8 semanas), se evaluó el contenido de dopamina y su metabolito DOPAC en regiones límbicas; la lesión en sí misma ocasionó incremento de dopamina en hipocampo. Las ratas NVHL a las que se les sumó aislamiento social, mostraron incremento de dopamina en corteza prefrontal medial, núcleo accumbens e hipocampo y decremento de este neurotransmisor en el caudado-putamen (Alquicer, Silva-Gómez, Peralta y Flores, 2004).

Utilizando técnicas de imagenología se dio seguimiento a la lesión de ratas NVHL con evaluación a los 21, 42 y 63 días postnatales. El volumen de la lesión incrementó de manera lineal con el paso del tiempo y se mostró proporcionalmente mayor al incremento general del volumen del encéfalo. Mediante rayos X se mostró una reducción del tamaño del cráneo en ratas NVHL comparado con ratas sham (Sandner, Angst, Guiberteau, Guignard y Brasse, 2010).

En neuronas piramidales de la corteza prefrontal de ratas NVHL, se encontró una reducción de longitud de las dendritas, menor arborización y menor densidad de espinas dendríticas. Neuronas medianas espinosas del núcleo accumbens sólo mostraron decremento de tamaño en las espinas dendríticas (Flores *et al.*, 2005). El aislamiento social sumado al modelo NVHL, hizo aún más importante el decremento de longitud de dendritas en corteza prefrontal (Alquicer, Morales-Medina, Quirion y Flores, 2008). Otras deficiencias celulares son mostradas con la tinción de violeta de cresilo que demuestran una reducción significativa de células en la corteza auditiva temporal de manera bilateral (Romero-Pimentel *et al.*, 2014). Estos datos nos permiten concluir que la lesión neonatal en hipocampo da lugar a cambios morfológicos en regiones distantes a la lesión, pero con las que mantiene comunicación.

### **3.3 SISTEMA COLINÉRGICO EN ESQUIZOFRENIA**

La acetilcolina es un neurotransmisor que actúa en los sistemas nerviosos central y periférico. De manera periférica se encuentra en ganglios autonómicos y en la unión neuromuscular; entre sus funciones se encuentra la modulación de la tasa cardiaca, flujo sanguíneo, motilidad gástrica y producción de sudor. En el sistema nervioso central se asocia a percepción, funciones motoras, activación, nociocepción, recompensa y procesamiento cognitivo como memoria o atención (Picciotto, Higley y Mineur, 2012).

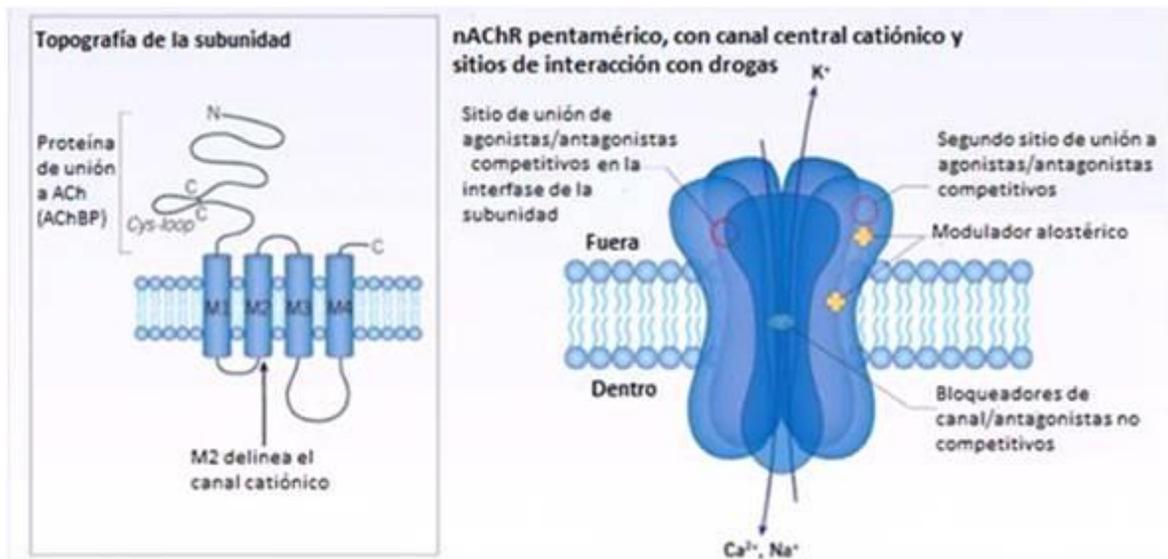
La acetilcolina se sintetiza en las neuronas a partir de acetil-coenzima A y colina en una reacción catalizada por la enzima colina acetiltransferasa. Después de su síntesis, la acetilcolina se almacena en vesículas sinápticas y es liberada al espacio sináptico donde tendrá efecto en receptores pre o post-sinápticos o será hidrolizada por la enzima colinesterasa (Readler y Freedman, 2009).

A partir de la función y estructura, se pueden diferenciar dos grandes familias de receptores colinérgicos: muscarínicos y nicotínicos. Los receptores muscarínicos son receptores asociados a proteína G, se encuentran 5 subtipos en el sistema

nervioso. Los receptores nicotínicos son receptores de canal iónico activados por ligando y se conforman por 5 subunidades que atraviesan la membrana celular para crear un poro. Cada subunidad de receptor nicotínico cuenta con 4 segmentos transmembranales; en el dominio terminal extracelular se encuentra un “cys-loop”, es decir, dos residuos de cistina separados por 13 aminoácidos que forman un bucle donde se unen los agonistas para permitir la apertura del canal. Se ha establecido que existen 4 formas de las subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ; el principal sitio de unión se encuentra en el dominio terminal de la subunidad  $\alpha$ . Una vez que se une un agonista al receptor, éste se transforma para pasar de un estado cerrado de reposo a un estado abierto que permite el flujo de  $\text{Na}^+$ , y en algunos casos de  $\text{Ca}^{2+}$ , hacia el interior de la neurona, acompañado de un flujo de  $\text{K}^+$  hacia el espacio extracelular. A pesar de la presencia del agonista, el canal nicotínico se cierra en periodos de segundos a minutos, pasando a un estado desensitizado; en esta condición el receptor se encuentra en un periodo refractario de activación (Wonnacott, 2014).

Existen 11 diferentes tipos de subunidades de receptor nicotínico neuronal,  $\alpha 2$ -  $\alpha 7$ ,  $\alpha 9$ ,  $\alpha 10$  y  $\beta 2$ -  $\beta 4$ . La conformación heteromérica de un receptor se compone de subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ , principalmente  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  o  $\alpha 6$  con  $\beta 2$  o  $\beta 4$ . En contraste, las subunidades  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$ ,  $\alpha 9$  se caracterizan por formar receptores homoméricos (Picciotto *et al.*, 2012). En la *Figura 4* se observa la conformación típica de un receptor nicotínico neuronal.

En el cerebro existe una distribución heterogénea de receptores nicotínicos. Los receptores con subunidades  $\alpha 4$ ,  $\beta 2$  y  $\alpha 7$  son los más abundantes. Los receptores con conformación  $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$  tienen alta afinidad a la nicotina, se encuentran de manera presináptica en regiones mesolímbicas, tálamo y corteza. Por su parte, los receptores  $\alpha 7$  son prominentes en hipocampo y corteza, donde se asocian con interneuronas GABAérgicas y sinapsis glutamatérgicas; niveles altos de nicotina activan este tipo de receptores, aunque son menos sensitivos a dosis bajas (Wonnacott, 2014).



*Figura 4.* Estructura general de un receptor nicotínico. En el panel de la izquierda, se ejemplifica la topografía de una subunidad, caracterizada por los dos grupos residuales de cistina que forman un bucle en la terminal extracelular correspondiente al sitio de unión con el agonista. En el panel de la derecha, se muestran las 5 subunidades que conforman un receptor nicotínico. También se ejemplifican dos sitios de unión a agonistas, consistentes con una conformación heteromérica del receptor, mismos sitios que pueden ocuparse por antagonistas competitivos. Se muestra el sitio donde se alojan los bloqueadores de canal y los antagonistas no competitivos, así como posibles sitios de unión a moduladores alostéricos. Tomado de Wonnacott, 2014.

Existen tres grandes grupos de neuronas colinérgicas en el cerebro de primates. La invasión colinérgica a la corteza prefrontal e hipocampo proviene de regiones prosencefálicas que incluyen el núcleo basal de Meynert, núcleo preóptico y de la banda diagonal, núcleo septal y sustancia innominata. Otro grupo de proyecciones hacia el área ventral tegmental, sustancia nigra, cerebelo, tálamo e hipotálamo, provienen de neuronas colinérgicas del núcleo pontomesencefálico. Finalmente, existe un gran grupo de interneuronas colinérgicas en los ganglios basales que modula la actividad de glutamato, dopamina y GABA en el estriado (Berman, Talmage y Role, 2007).

Varias evidencias apuntan a implicaciones del sistema colinérgico en la patofisiología de la esquizofrenia. En el estriado se ha identificado un decremento en la densidad de neuronas marcadas con colina acetiltransferasa (Holt *et al.*, 1999).

En cuanto a densidad de receptores, se observa menor cantidad del receptor m1 en corteza frontal, regiones parietales, temporales, hipocampo y estriado (Berman *et al.*, 2007). Por su parte, los receptores nicotínicos han mostrado decremento en hipocampo, mientras que la subunidad  $\alpha 7$  se ve disminuida en corteza frontal, pero no parietal. Se ha reportado que el consumo crónico de nicotina causa un aumento de estos receptores en sujetos sanos; al comparar controles fumadores versus pacientes fumadores, se mantiene el resultado de reducción en la densidad de receptores nicotínicos en corteza frontal, caudado e hipocampo de los pacientes, sugiriendo que estas anormalidades son inherentes a la esquizofrenia, y no se deben al alto consumo de nicotina (Hyde y Crook, 2001).

Se han resaltado las interacciones que existen entre la disfunción dopaminérgica, presente en el trastorno, con la transmisión colinérgica. Como ya se mencionó, las regiones telencefálicas son la mayor fuente de inervaciones colinérgicas hacia la corteza; la excitabilidad del telencéfalo está modulada por inervaciones GABAérgicas provenientes del núcleo caudado así como por influencias dopaminérgicas que provienen del área ventral tegmental. Dado que la dopamina muestra un estado de hiperactividad en este trastorno, la inhibición de las regiones del telencéfalo se encuentra anormal, provocando una desregulación del tono colinérgico en corteza. Esta hipótesis se apoya del hecho que la administración de amfetamina o ketamina incrementa el flujo colinérgico en corteza (Sarter, Nelson y Bruno, 2005).

La actividad colinérgica en corteza produce una combinación de efectos inhibitorios y excitatorios. Marcadores colinérgicos están presentes en la vecindad de neuronas piramidales y no-piramidales de la corteza prefrontal, particularmente en espinas y dendritas, indicando los efectos moduladores de este neurotransmisor en los circuitos corticales. Los altos niveles de este

neurotransmisor en corteza, producto de la desregulación dopaminérgica, puede dar lugar a problemas en el balance inhibitorio-excitatorio de corteza mostrado en este trastorno (Sarter *et al.*, 2005).

Muchos antipsicóticos han demostrado tener efectos anticolinérgicos, lo que da lugar a efectos secundarios como alteraciones en función gastrointestinal, náusea y cambios en apetito dependientes de la alteración en la transmisión colinérgica periférica. Sin embargo, este efecto anticolinérgico también afecta receptores centrales, provocando cambios en la excitabilidad de circuitos en regiones prefrontales e hipocampo. Por ejemplo, la acetilcolina en estas regiones se asocia a la actividad del ritmo teta oscilatorio que es un marcador de cooperación temporal y cortical, el cual subyace a funciones cognitivas como la memoria. También se ha reportado un incremento en sintomatología positiva cuando se suma medicación anticolinérgica para tratamiento de síntomas extrapiramidales, producto de los fármacos antipsicóticos (Berman *et al.*, 2007).

La administración crónica de inhibidores de acetilcolinesterasa, produce síntomas psicóticos en sujetos con alto riesgo a desarrollar esquizofrenia. Lo anterior permite especular que, un alto tono colinérgico también puede contribuir a la sintomatología positiva. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones apunta a implicaciones del sistema colinérgico en la expresión de déficits cognitivos, debido a que funciones como la atención, memoria o aprendizaje dependen de la integridad del sistema colinérgico. Por ejemplo, lesiones en vías colinérgicas, como la septal-hipocampal o del núcleo de Meynert a la corteza, producen déficits en memoria y aprendizaje, mientras que el bloqueo de receptores colinérgicos en sujetos sanos producen déficits en atención y problemas de memoria (Hyde y Crook, 2001).

Por otro lado, se ha visto que el aumento del tono colinérgico, por la administración de inhibidores de la acetilcolinesterasa en sujetos sanos, produce respuestas a estímulos irrelevantes. Dicho hallazgo implica un sobreprocesamiento de información que puede subyacer a los problemas de atención y poca capacidad para inhibir distractores que caracteriza a estos pacientes. Estas

evidencias sugieren que tanto un aumento o disminución del tono colinérgico, afectan de manera importante el papel de la corteza en la regulación de funciones cognitivas (Sarter *et al.*, 2005).

### **3.3.1 NICOTINA COMO FÁRMACO PRO-COGNITIVO**

La nicotina es un ingrediente natural del tabaco, es el principal alcaloide presente en esta planta y su principal componente psicoactivo. La administración de nicotina generalmente se hace por inhalación, mediante la combustión de tabaco, en forma de cigarrillos comerciales; otras fuentes menos utilizadas son el uso de parches transdermales o masticando tabaco. Un cigarrillo comercial contiene de 10 a 14 mg de nicotina y de manera sistémica, se absorbe de 1 a 1.5 mg de nicotina mientras se consume. Las concentraciones en sangre de nicotina llegan a un pico al finalizar el consumo de un cigarrillo; existe una rápida absorción por los pulmones, por la amplia área alveolar y el pH de 7.4 que facilita el paso a través de las membranas. Después de una inhalación, la nicotina llega al cerebro entre 10 y 20 segundos, más rápido que la administración intravenosa. Esto produce una rápida respuesta de recompensa afectando la vía dopaminérgica mesocortical que mantiene la conducta de tabaquismo. La cantidad de consumo de nicotina depende del volumen de la inhalación, la tasa de inhalaciones así como la intensidad (Benowitz, Hukkanen y Jacob, 2009).

La concentración sanguínea de nicotina en fumadores se encuentra entre 10 y 37 ng/ml. La vida media en plasma es de 2 horas. La nicotina es degradada en el hígado mediante la oxidación por la enzima CYP2A6. Se encuentran 6 metabolitos principales tras la degradación de nicotina, siendo la cotinina el más abundante dando cuenta del 80% de la degradación de nicotina (Matta *et al.*, 2006).

Después de la absorción, la nicotina entra al sistema circulatorio repartiéndose en hígado, riñones, pulmones y con baja afinidad a tejido adiposo. La nicotina se une a receptores nicotínicos del sistema colinérgico con gran afinidad; la afinidad aumenta en fumadores crónicos, este incremento en afinidad se debe a mayor

número de estos receptores en el cerebro tras una larga exposición a nicotina (Benowitz *et al.*, 2009).

La asociación entre los receptores nicotínicos y funciones cognitivas ha sido demostrada utilizando diversos modelos animales. Por ejemplo, ha sido evidente el efecto favorecedor de la nicotina en la atención de roedores, como en tareas de detección de señales, donde se ha mostrado que dosis bajas de nicotina aumentan la cantidad de respuestas correctas. La administración de mecamilamina, un antagonista de receptores nicotínicos, provoca deficiencias en la ejecución de estos paradigmas (Levin, McClernon y Rezvani, 2005).

Por otro lado, la infusión aguda en hipocampo ventral de antagonistas específicos a receptores  $\alpha 7$  o  $\alpha 4\beta 2$ , causa deficiencias en la ejecución de laberinto radial (Felix y Levin, 1997). La administración sistémica de nicotina no revirtió totalmente las deficiencias causadas por el antagonismo de receptores  $\alpha 7$ , pero sí las deficiencias causadas por el antagonismo de receptores  $\alpha 4\beta 2$ . Este dato sugiere que los receptores  $\alpha 7$  son los principales responsables de los efectos benéficos en memoria de trabajo causados por la nicotina (Bancroft y Levin, 2000; Bettany y Levin, 2001). La corteza prefrontal también está involucrada en los efectos pro-cognitivos de esta droga ya que, infusiones locales en esta región, causan mejoras en una tarea de atención (Levin *et al.*, 2005).

Existen pocas evidencias en humanos sobre los efectos de la nicotina en cognición. Inicialmente la investigación mostraba detraimientos cognitivos tras periodos de abstinencia de consumo de cigarro en fumadores crónicos; la crítica a estos trabajos radica en que las deficiencias podían deberse a la ansiedad asociada a los periodos de abstinencia y no a efectos pro-cognitivos de la nicotina *per se*. En adultos no fumadores se mostró que, tras la administración de nicotina mediante parches transdermales se reducía el número de errores y los tiempos de reacción en la tarea de ejecución continua, la cual evalúa atención sostenida. En sujetos sanos, la atención ha sido la función cognitiva que ha mostrado mayores efectos benéficos de la nicotina (Swan y Lessov-Schlaggar, 2007).

Hay datos que sugieren que la nicotina no mejora de manera uniforme las funciones cognitivas. Por ejemplo, en el pez cebra, se ha demostrado que dosis bajas de nicotina mejoran la memoria, mientras que dosis altas la alteran. Por otro lado la administración crónica de nicotina en ratas en periodos de vejez no mejora la ejecución en tareas de memoria de trabajo (Levin *et al.*, 2005).

Si bien, hay evidencias de mejora cognitiva en sujetos experimentales sanos, existe un amplio cuerpo de evidencia que muestra que la nicotina genera un efecto pro-cognitivo en modelos de déficits en memoria y aprendizaje. Algunos ejemplos son animales con lesiones en proyecciones colinérgicas prosencefálicas que muestran amplias deficiencias en memoria y atención revertidas con la administración de nicotina (Levin *et al.*, 2005); sujetos experimentales con deficiencias por antagonismo de receptores NMDA, también muestran mejoras tras la estimulación farmacológica de receptores nicotínicos (Levin, 2013).

En humanos se mantiene el hecho de poca ganancia cognitiva en sujetos sanos, pero una clara mejora en condiciones de patología (Sacco, Bannon y George, 2004). En varias enfermedades neuropsiquiátricas también ha sido evidente la capacidad pro-cognitiva de la nicotina. Por ejemplo, se ha mostrado que fumadores crónicos tienen menos riesgo a desarrollar enfermedad de Alzheimer y el principal tratamiento de esta enfermedad inhibe la actividad de la acetilcolinesterasa; en adultos con trastorno por déficit de atención e hiperactividad se han mostrado mejoras en la atención tras la administración de nicotina; en la enfermedad de Parkinson también se han mostrado alivios en la sintomatología con la administración de nicotina (Dome, Lazary, Kalapos y Rihmer, 2010).

### **3.3.2 AUTOMEDICACIÓN DE NICOTINA EN PACIENTES CON ESQUIZOFRENIA**

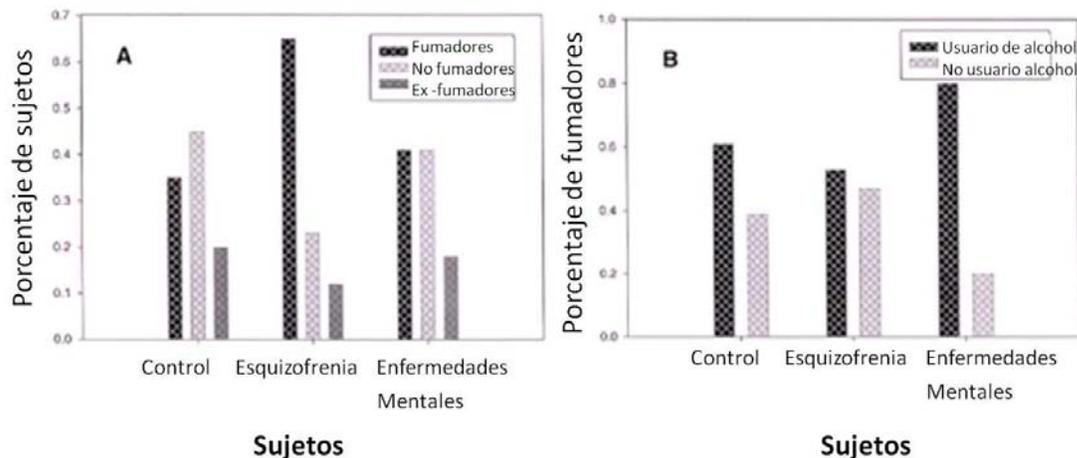
En un estudio meta-analítico, englobando análisis de 20 países diferentes, se demostró que los pacientes con esquizofrenia tienen tasas más altas de consumo

de tabaco; es 5 veces más probable que un paciente con esquizofrenia sea fumador que una persona sin este padecimiento. Los pacientes con esquizofrenia también fuman en mayor cantidad al compararse con fumadores control, consumiendo de 3 a 4 veces más; es menos probable que estos pacientes dejen el consumo de cigarro que en otras poblaciones psiquiátricas o en la población general (Leon y Diaz, 2005).

Se mantiene el mayor consumo de tabaco en pacientes de primer episodio que aún no han utilizado medicación antipsicótica, lo cual indica que el alto consumo de tabaco es independiente del tratamiento farmacológico (Kalman, Morissette y George., 2005). Si bien se ha descrito mayor comorbilidad del abuso de nicotina con trastornos psiquiátricos como depresión o trastorno bipolar, los niveles encontrados en pacientes con esquizofrenia son significativamente mayores, pero no se mantiene el mayor abuso de alcohol también reportado en pacientes con enfermedades mentales (Leonard *et al.*, 2000). En la *Figura 5* se muestran las distribuciones del uso de estas sustancias en individuos controles, pacientes con esquizofrenia y pacientes con otros trastornos mentales.

Al controlar la cantidad de cigarros consumidos en un día entre fumadores control y pacientes con esquizofrenia, se encontró que en los últimos había significativamente más cantidad de cotinina en saliva. Lo anterior demuestra que estos pacientes recurren a mejores técnicas para auto-administrarse mayores niveles de nicotina. En este estudio también se encontró una mejora de síntomas negativos asociadas al consumo de tabaco (Strand y Nybäck, 2005).

En un estudio se comparó el perfil de consumo de tabaco de pacientes con esquizofrenia con la severidad de síntomas positivos y negativos; se demostró que los pacientes que tenían un consumo moderado (alrededor de 20 cigarros al día) mostraban menor severidad de síntomas que aquellos pacientes altamente dependientes del tabaco (alrededor de 40 cigarros al día) o pacientes no fumadores (Aguilar, Gurpegui, Diaz y Leon, 2005).



*Figura 5.* Comparación entre el consumo de nicotina y alcohol de sujetos controles, pacientes con esquizofrenia y pacientes con otras enfermedades mentales. En el panel de la izquierda se describen los historiales de consumo de tabaco reportados en sujetos control, pacientes con esquizofrenia y pacientes con otras enfermedades mentales, que incluyen depresión y trastorno bipolar. Se puede observar que los pacientes con esquizofrenia mantienen un significativo aumento en el abuso de esta sustancia. Por otro lado en el panel de la derecha, se señala que la población con otras enfermedades mentales, distintas de esquizofrenia, mantienen un alto consumo de alcohol asociado al consumo de tabaco, lo cual no se replica en esquizofrenia. Tomado de Leonard *et al.*, 2000.

Estas evidencias han dado lugar a la hipótesis de automedicación con nicotina en esquizofrenia. Ésta sugiere que las altas tasas de consumo de tabaco en estos pacientes se debe a un intento de mejorar la sintomatología presente en el trastorno. El inicio de consumo de tabaco en pacientes con esquizofrenia se asocia a las razones por las que fuma la población en general, pero se suman reportes de mejoras en síntomas, así como empeoramiento de éstos en periodos de abstinencia. La administración de nicotina ayuda a reducir los efectos colaterales de medicación neuroléptica como los efectos parkinsonianos (Kumari y Postma, 2005).

Como se ha indicado previamente, la medicación antipsicótica puede dar lugar a deficiencias cognitivas. Se ha mostrado que la nicotina mejora estas deficiencias

de manera dosis dependiente. A pacientes fumadores, privados del consumo de nicotina y bajo administración del antipsicótico haloperidol, se les pusieron parches transdermales placebo o con bajas, medianas o altas dosis de nicotina (7, 14 ó 21 mg/día respectivamente). Los pacientes con parches placebo mostraron deficiencias en tareas de igualdad a la muestra y mayores tiempos de reacción; los pacientes que recibieron nicotina mostraron mejoras significativas en la ejecución. El historial de uso de haloperidol modificó el efecto pro-cognitivo de la nicotina (Levin, Wilson, Rose y McEvoy, 1996).

Otra serie de evidencias que sugiere que la nicotina tiene efectos pro-cognitivos en esquizofrenia, proviene del hecho que mejora los problemas de inhibición sensorial fuertemente asociados a este trastorno. Los pacientes con esquizofrenia muestran deficiencias en la inhibición prepulso, así como anomalías en la onda electroencefalográfica P50. Estos déficits también se mantienen en los familiares de los pacientes. Posterior a la administración de nicotina mediante tabaco, se ha mostrado una mejora en la respuesta de inhibición prepulso, así como normalización de la onda P50 tanto en los pacientes como en sus familiares. Por otro lado se ha mostrado que, tras abstinencia de tabaco, los pacientes con esquizofrenia muestran mayores deficiencias en inhibición prepulso (Leonard, Mexas y Freedman, 2007).

A partir de evaluaciones de seguimiento ocular se tiene más evidencia de los efectos benéficos de la nicotina en la esquizofrenia. Dichas evaluaciones se hacen clásicamente con medidas de seguimiento lento de objetos y respuestas antisacádicas. La primera evalúa la exactitud del movimiento de ojos al perseguir un objeto, las segundas evalúan una respuesta inhibitoria donde el sujeto se orienta en oposición al objetivo. Ambas medidas tienen valores deficientes en pacientes con esquizofrenia, pero tras la administración de nicotina se regularizan, igualando las ejecuciones control. La evaluación en resonancia magnética funcional, encuentra que los efectos benéficos de la nicotina dependen del hipocampo y el giro cingulado (Kumari y Postma, 2005).

Al abstener del consumo de tabaco a pacientes y a sujetos control se encuentran deficiencias atencivas en ambas poblaciones, evaluado por el test de ejecución continua. A los pacientes con esquizofrenia se les sumaron deficiencias en una tarea de memoria de trabajo visoespacial. Cuando volvieron a fumar, tanto controles como pacientes mejoraron la ejecución, pero la administración de mecamilamina hizo que resurgieran las deficiencias aunque los pacientes se mantuvieran fumando *ad-libitum* (Sacco *et al.*, 2005).

La administración de nicotina a pacientes, mediante spray nasal, mejoró la memoria verbal. La administración por parches transdermales mejoró la memoria de trabajo y medidas de atención. También se mostró mayor conectividad entre la corteza cingular anterior y el tálamo; este efecto no fue encontrado en controles, sugiriendo que los pacientes con esquizofrenia obtienen mayores beneficios de la nicotina que los controles, así como patrones de activación cerebral diferentes ante este fármaco (Kumari y Postma, 2005).

Varios genes de receptores nicotínicos se han ligado con la mayor predisposición al tabaquismo en la población general, pero también se han asociado con mayor predisposición a desarrollar esquizofrenia. Los genes 8p21, 1q21 y 15q14 que codifican para las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\beta 2$  y  $\alpha 7$  han sido los más reportados en el solapamiento genético entre tabaquismo y esquizofrenia (Leonard *et al.*, 2007).

Se ha sugerido que el receptor  $\alpha 7$  media los efectos benéficos de la nicotina en el trastorno. Se describen deficiencias en la inhibición sensorial, similares a las presentes en el trastorno, cuando se bloquean receptores  $\alpha 7$  en animales experimentales, así como en animales transgénicos con menor expresión de este receptor en hipocampo; éstas deficiencias se normalizan con la administración de un agonista específico de este receptor. También se han ligado las deficiencias en la onda P50, presentes en estos pacientes y sus familiares, con polimorfismos de un sólo nucleótido en la región promotora del gen que codifica para la subunidad  $\alpha 7$  (Olinic y Stevens, 2007; Martin y Freedman, 2007).

En fumadores controles crónicos se ha demostrado un incremento en receptores nicotínicos de hasta un 50%, como resultado de un efecto compensatorio tras la desensibilización de estos receptores por la estimulación repetida. En pacientes con esquizofrenia fumadores este aumento no es reportado; contrario a esto, en estudios *post-mortem* de pacientes con esquizofrenia, se han mostrado decrementos de receptores  $\alpha 7$  en hipocampo, corteza cingular, regiones del lóbulo frontal y el núcleo reticular del tálamo (Leonard *et al.*, 2007).

Los receptores nicóticos se desensibilizan rápidamente, provocando que los efectos pro-cognitivos pierdan fuerza con el paso del tiempo. Por ello se han buscado alternativas farmacológicas para el tratamiento en esquizofrenia. El fármaco DMXBBA es un agonista parcial de receptores  $\alpha 7$ ; en modelos animales ha mejorado los problemas en filtrado sensorial al incrementar el disparo de interneuronas. En una pequeña muestra de pacientes con esquizofrenia no fumadores, la droga DMXBBA mostró efectos benéficos en el rendimiento de una batería neuropsicológica que evaluaba atención, memoria inmediata y retardada, lenguaje, así como normalizaciones en la onda P50 (Olinicy y Stevens, 2007).

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

La herencia de la hipótesis dopaminérgica en el estudio de la esquizofrenia, ha dejado de lado nuevas evidencias que apuntan a aberraciones en varios sistemas de neurotransmisión y diferentes regiones cerebrales. Estos hechos apuntan a que la esquizofrenia probablemente se relaciona con deficiencias en el desarrollo temprano del cerebro que afectan de manera global la circuitería cerebral. Es por eso que, la utilización del modelo animal NVHL nos provee información sobre la pertinencia de la hipótesis etiológica de neurodesarrollo.

A lo largo del texto se ha mencionado que el tratamiento farmacológico actual en esquizofrenia se centra en la reducción de síntomas psicóticos mediante fármacos que bloquean principalmente receptores dopaminérgicos. Este tipo de medicación es inefectiva en el tratamiento de síntomas negativos e incluso empeora la gravedad de las amplias deficiencias cognitivas demostradas en este trastorno.

Uno de los sistemas que ha mostrado afectaciones en esquizofrenia es el colinérgico, el cual ha recibido atención reciente. El hecho de que los pacientes se administren altas tasas de nicotina mediante el consumo de tabaco, sugiere un intento de auto-medicación de síntomas que no están siendo contemplados por la medicación antipsicótica. La evidencia apunta a que la mejora se observa mayormente en las deficiencias cognitivas. Tanto el hipocampo como la corteza prefrontal han sido ampliamente asociados a la fisiología del trastorno, estas regiones expresan receptores nicotínicos y podrían orquestar los efectos pro-cognitivos de esta droga.

La importancia del tratamiento de los síntomas cognitivos radica en que este tipo de sintomatología predice el pronóstico funcional de estos pacientes, es decir, la adaptabilidad social, laboral y bienestar de estos pacientes. Un tratamiento farmacológico amplio de este trastorno, que incluya a las deficiencias cognitivas, puede dar lugar a menores costos económicos de este trastorno, así como subyacer a mejoras en sintomatología negativa e incluso positiva, dando como resultado mejor calidad de vida en los pacientes con esquizofrenia.

## **5. OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo es, evaluar el efecto de la administración sostenida de nicotina en el modelo de esquizofrenia NVHL.

Objetivos particulares:

Evaluar la integridad de la memoria de trabajo en el modelo de esquizofrenia, NVHL, según su ejecución en un laberinto radial.

Conocer el efecto de la administración crónica de nicotina en la memoria de trabajo del modelo animal de esquizofrenia, NVHL.

Determinar si la lesión temprana del hipocampo genera cambios celulares a largo plazo en esta región y en regiones interconectadas como porciones corticales frontales.

Observar si la administración crónica de nicotina modifica la morfología celular en el hipocampo ventral y en porciones corticales frontales.

## **6. HIPÓTESIS**

La evaluación de los efectos de la administración crónica de nicotina sobre la memoria de trabajo del modelo animal NVHL genera las siguientes hipótesis.

- 1) Si las ratas NVHL modelan los déficits en memoria de trabajo presentes en el trastorno, entonces estas ratas mostrarán deficiencias en la ejecución de una tarea de laberinto radial al compararse con la ejecución de ratas sham.
- 2) Si la nicotina tiene efectos pro-cognitivos, entonces la administración crónica de este fármaco mejorará la ejecución del laberinto radial en las ratas NVHL pero no tendrá efectos sobre el grupo sham.
- 3) Si existen re-arreglos en la circuitería cerebral tras una lesión temprana del cerebro, entonces las ratas NVHL sin historial de administración de nicotina mostrarán diferencias en la morfología de neuronas en corteza e hipocampo.

- 4) Si la corteza y el hipocampo son fundamentales en la mediación del efecto pro-cognitivo de la nicotina, entonces las ratas NVHL con historial de administración de nicotina mostrarán normalización en la morfología neuronal en regiones corticales e hipocampales.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 SUJETOS EXPERIMENTALES**

Para llevar a cabo los objetivos de este proyecto se utilizaron 19 ratas gestantes Sprague-Dawley. A partir del día 14 y hasta el día 20 gestacional se dio manipulación manual a estos animales con el objetivo de que se acostumbraran al manejo por parte del experimentador y de esta manera evitar el rechazo de las crías tras la cirugía experimental.

Las ratas adultas y sus crías permanecieron sin manipulación durante 5 días posteriores al parto. En el día posnatal 5, las ratas recién nacidas fueron sexadas. Las crías hembras fueron sacrificadas mediante hipotermia, los machos permanecieron con su madre hasta el momento de la cirugía experimental en el día postnatal 7.

### **7.2 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA**

La cirugía estereotáxica, para generar el modelo NVHL y ratas con lesión falsa (sham), se llevó de acuerdo a los reportes iniciales de Lipska, Jaxkiw y Weinberger (1993). La cirugía experimental se llevó a cabo en el día postnatal 7, periodo importante del desarrollo del hipocampo, que se correlaciona con el tercer trimestre de gestación en humanos (Tseng *et al.*,2009). Las crías se sometieron a cirugía sólo si tenían un peso entre 15 a 20 gramos. Los animales fueron anestesiados mediante hipotermia, se mantuvieron en hielo en periodos de 15 a 20 minutos de acuerdo al peso que mostraban. Se corroboró la eficacia de la anestesia mediante la coloración del animal y su respuesta a estímulos mecánicos. Una vez anestesiados fueron asegurados a un equipo estereotáxico.

Se realizó una pequeña incisión en la parte dorsal del cráneo y se identificó la posición de Bregma. A partir de esta posición anatómica se localizó la posición bilateral del hipocampo ventral en las coordenadas AP: -3.0 mm, ML: +-3.5 mm, VD: -5.0mm. Se realizó la trepanación del cráneo mediante la inserción de la punta de una aguja de diámetro pequeño (20ga).

En estas coordenadas, se introdujo una aguja Hamilton que liberaría 3  $\mu$ l de ácido iboténico (concentración de 10  $\mu$ g/ $\mu$ l) con líquido cerebroespinal artificial como vehículo, para generar el modelo NVHL. Para generar animales con lesión falsa se administró 3  $\mu$ l de líquido cerebroespinal artificial. La administración se realizó de manera constante durante dos minutos y la aguja permaneció en la misma posición durante 3 minutos más, para evitar la retracción del líquido provocando que la lesión no correspondiera al hipocampo ventral.

Una vez que se hicieron las administraciones de manera bilateral, se prosiguió a la sutura de los animales. Se retiraron del equipo estereotáxico y se mantuvieron bajo una lámpara para aumentar la temperatura corporal. Posteriormente fueron regresados con su madre. En una misma camada se realizaron tanto lesiones NVHL como sham, para diferenciarlas se marcaron con plumón permanente.

Las ratas se mantuvieron sin manipulación y con sus madres hasta el momento del destete, día postnatal 25, donde se realojaron según la condición de la cirugía. Se mantuvo el registro de sus pesos desde este momento hasta el inicio de las evaluaciones conductuales. Se mantenían con acceso libre a agua y comida y en un ciclo de luz-oscuridad normal.

Finalmente se contó con 68 sujetos experimentales, de los cuales 33 pertenecían al grupo de lesión falsa y 35 al modelo de esquizofrenia NVHL.

### ***7.3 EVALUACIÓN CONDUCTUAL Y ADMINISTRACIÓN DE NICOTINA***

La evaluación cognitiva se realizó mediante la ejecución de Laberinto Radial. Esta tarea da evidencia de la capacidad de memoria de trabajo en los animales experimentales. Esto es la representación de una señal en un periodo de retraso en el cual dicha señal no está presente, la señal provee información relevante para generar una respuesta subsecuente; la información que ofrece esta señal es relevante durante la ejecución misma, pero no se mantiene su importancia entre diferentes sesiones (Dudchenko, 2004).

Esta tarea fue descrita inicialmente por Olton y Samuelson (1976). La tarea clásica consiste en un laberinto de 8 brazos conectados únicamente mediante una plataforma central; desde la plataforma puede accederse a la entrada de cualquiera de los brazos y para cambiar a un nuevo brazo es forzoso regresar a esta plataforma. Que el animal tenga que regresar al punto de salida cada vez que va a elegir un nuevo brazo, hace que todas las alternativas de respuesta estén disponibles en cada elección, incluyendo los brazos que ya visitó. La contingencia en este laberinto es el reforzamiento de la primera visita a un brazo, pero las visitas subsecuentes a este mismo brazo se consideran errores; una buena ejecución se determina cuando el sujeto entra a nuevos brazos en cada elección. La ejecución de laberinto radial se ha mostrado sensible a la evaluación conductual de compuestos farmacológicos (Olton, 1987).

En el caso de este trabajo, se utilizó una versión modificada del laberinto radial que contaba con 6 brazos extendiéndose radialmente alrededor de una plataforma central. Cada uno de los brazos contaba con un contexto diferente; es decir diferentes texturas se encontraban en las paredes de los brazos, esto proveía más información al sujeto experimental aparte de la mera información de localización espacial.

La evaluación conductual se inició en periodos postpubertales hasta periodos de adultez temprana, días postnatales 50 a 70. A los animales experimentales se les privó de alimento con acceso a comida 1 hora durante el día, esto se inició una semana previa a la evaluación conductual y se mantuvo durante todas las sesiones. Durante 4 días previos a la ejecución de la tarea, los animales fueron habituados al reforzador (cereal de chocolate) para evitar efectos de neofobia en la ejecución.

Las sesiones se realizaban en un cuarto silencioso que contaba con señales espaciales constantes fuera del laberinto capaces de guiar la conducta de los sujetos; el laberinto permaneció en la misma posición a través de todas las sesiones. Después de la sesión con un animal, el laberinto era limpiado con alcohol al 10%, para evitar que señales olfativas guiaran la conducta. La conducta

de los sujetos fue videograbada y contabilizada mediante el programa Any-Maze, versión 4.99m (San Diego Instruments Co. San Diego. USA).

Se determinaron 3 fases de evaluación: 1) entrenamiento en elección libre; 2) entrenamiento con interrupciones y; 3) entrenamiento con administración de nicotina.

- 1) Entrenamiento en elección libre: Se realizaron 9 sesiones en total. A modo de habituación, la primera sesión se mantuvo a los animales en el laberinto durante 10 minutos, ningún brazo se encontraba reforzado. En las siguientes sesiones los 6 brazos contaban con cereal de chocolate como reforzador. Los animales eran posicionados en la plataforma central durante 10 segundos, después de este periodo se levantaba la guillotina de esta plataforma y se permitía que los animales recorrieran el laberinto. Los animales terminaban la sesión una vez que habían entrado a los 6 diferentes brazos o a los 300 segundos.

Las medidas conductuales que arrojó este grupo de sesión son las siguientes:

- Tiempo total de ejecución.
- Tiempo promedio de visita a un brazo.
- Errores, es el número de repeticiones de entradas a brazos. Se considera un error ya que estos brazos no cuentan con reforzador una vez que han sido visitados por primera ocasión.
- Tiempo de error, se calcula el tiempo promedio que un sujeto experimental gastó en la visita de brazos sin reforzador.
- Entradas antes de repetir brazo, esta medida es un indicador de la capacidad de memoria de trabajo. Si un animal visita una mayor cantidad de brazos nuevos antes de cometer un error, indica que ha almacenado mayor cantidad de información respecto a los brazos que ya visitó, haciendo más eficiente su conducta.

2) Entrenamiento con interrupciones. Reportes previos ya habían evaluado el efecto de la introducción de demoras en la ejecución de laberinto radial. La introducción de demoras en la sesión generalmente se hace tras la elección del tercer brazo. Esto aumenta el grado de dificultad de la tarea dado que los animales tienen que mantener la información de los brazos visitados sin que estén disponibles durante este periodo. Como es de esperarse, se ha reportado que interrupciones largas afectan de manera importante la ejecución de esta tarea (Dudchenko, 2004).

En este caso, los animales se confinaban en la plataforma central tras la elección del tercer brazo. Se introdujeron demoras de 10, 30, 90 ó 180 segundos, mientras las ratas estaban confinadas podían observar el carril de cada brazo. También se hizo una evaluación con una demora de 180 segundos en la que la guillotina de la plataforma central era opaca y no permitía que los animales observaran los brazos. Todos los animales ejecutaron la tarea con todas las demoras de manera contrabalanceada. Después de pasado el tiempo de demora o gap, la plataforma central era levantada y se permitía que hicieran elecciones subsecuentes. El animal era retirado una vez que visitaba los 6 brazos o si pasaba 300 segundos en ejecución (sin tomar en cuenta el tiempo de la interrupción). Las medidas de esta fase, mostradas a continuación, se analizaron tomando en cuenta cada uno de los valores del retraso:

- Tiempo de completamiento de laberinto
- Tiempo promedio de visita
- Errores totales
- Tiempo de error
- Entradas antes de repetir brazo
- Tiempo de ejecución previo a confinamiento
- Tiempo de ejecución posterior a confinamiento
- Errores de brazos visitados previos a confinamiento
- Errores de brazos visitados posterior a confinamiento

Las medidas asociadas al tiempo de ejecución previo o posterior al confinamiento nos dan indicadores sobre la modificación en la motricidad del sujeto tras una interrupción. Por otro lado, las evaluaciones de los errores divididos antes y después de la interrupción nos indican como almacenan la información los sujetos experimentales. Es decir, si es más probable cometer errores de los primeros 3 brazos visitados, significaría mayor olvido de la primera información adquirida, y mejor retención de los últimos brazos visitados. Por el contrario, si se comenten más errores de los brazos visitados después de la interrupción nos indicaría un efecto de primacía, es decir, se almacenaría de mejor manera las características de los primeros 3 brazos visitados.

- 3) Entrenamiento con administración de nicotina. En esta fase se inició la administración crónica de nicotina o de solución salina como control. Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente a cualquiera de los dos historiales de administración. Se dieron inyecciones subcutáneas de 0.5mg/kg, 2 veces al día durante toda esta fase de entrenamiento. En este momento las ratas se mantenían bajo el paradigma de laberinto radial con interrupciones de 10, 30, 90 ó 180 segundos, se omitió la evaluación de 180 segundos con confinamiento opaco.

Para ser administrada, la nicotina se preparó mediante la ecuación propuesta en Matta et al. (2006), asegurando que la administración de nicotina correspondiera con la dosis de 0.5mg/kg. Previamente se ha mostrado que la administración subcutánea de 1mg/día de nicotina genera niveles plasmáticos de 25ng/ml, una concentración correspondiente a niveles plasmáticos de nicotina en fumadores crónicos (Matta *et al.*, 2006). Esto nos permite asegurar que nuestras ratas se encontraban en un paradigma de administración crónica de nicotina similar al alto consumo de tabaco presente en los pacientes con esquizofrenia.

Se normalizó el pH de la droga con hidróxido de sodio, permitiendo asegurar que los efectos no se debieran a la aversión dada por la administración de nicotina debido a su acidez.

Finalmente se contaba con 4 grupos experimentales: ratas NVHL con administración de nicotina (n=19), ratas NVHL con administración de solución salina (n=16), ratas sham o control con administración de nicotina (n=17) y ratas sham con administración de salina (n=16). Las medidas conductuales obtenidas fueron las mismas que en la fase de entrenamiento anterior, dividiendo las ejecuciones según estos 4 grupos experimentales (Ver *Tabla 2*).

<b>Grupo/Droga</b>	<b>NICOTINA</b>	<b>SALINA</b>	
<b>NVHL</b>	19	16	=35
<b>SHAM</b>	17	16	=33
	=36	=32	Total=68

Tabla 2. Se muestra la cantidad total de sujetos experimentales (n=68) y la cantidad de animales según el grupo experimental por cirugía, historial de administración de fármaco y la combinación de ambas variables.

#### **7.4 CORROBORACIÓN DE LESIÓN**

La obtención del cerebro de los animales se hizo mediante perfusión intracardíaca con paraformaldehído al 4%. Se les administró pentobarbital y, una vez anestesiados, se les expuso la cavidad intracardíaca. En el ventrículo izquierdo se insertó una cánula por la cual se liberó solución salina al 0.9% para promover la salida de sangre y permitir el paso del paraformaldehído; se agregó heparina a la solución salina únicamente en las ratas que se usarían para tinción de Golgi con el fin de observar menor grosor en los vasos sanguíneos.

Después de la fijación, los cerebros fueron sacados del cráneo rápidamente y dejados en post-fijación durante 3 horas. Los cerebros que serían utilizados para la corroboración de lesión siguieron un procedimiento de crioprotección, con dosis progresivas de sacarosa en PBS (10%, 20% y 30%), y almacenados a 4 grados.

Se procedió a la congelación de los tejidos en hielo seco y almacenamiento a -80 grados.

Los cerebros fueron cortados en criostato, obteniendo rebanadas de 40 µm de grosor. Los cortes se realizaron siguiendo el hipocampo desde porciones anteriores hasta la sección posterior ya que la lesión puede extenderse desde -3.80 hasta -5.65 mm a partir de Bregma. Los tejidos se tiñeron con hematoxilina-eosina, esta tinción permite la distinción de células al marcar el núcleo con hematoxilina y el citoplasma con eosina.

Para realizar la tinción se sumergen los tejidos en xileno, se llevan a cabo hidrataciones progresivas con alcohol, en concentraciones de 100%, 95%, 80%. Se pasan los tejidos por agua destilada y posteriormente se añade la hematoxilina. Se lavan los tejidos con agua corriente para eliminar el exceso de hematoxilina y se agrega alcohol al 95%. Se prosigue a la aplicación de eosina y se deshidrata el tejido progresivamente con alcohol al 95%, 100% y finalmente xileno.

### ***7.5 TINCIÓN DE GOLGI***

Los cerebros que se utilizaron para la tinción de Golgi rápido no siguieron los pasos de crioprotección, en vez de esto se mantuvieron en postfijación con paraformaldehído por 24 horas. Se utilizaron 3 cerebros de cada grupo experimental.

Con ayuda de un bloqueador se cortaron rebanadas coronales de 3 mm de grosor, por cada cerebro se obtuvieron 3 rebanadas que contenían al hipocampo completo y corteza frontal de las ratas. Estas rebanadas se mantuvieron en una solución de Golgi conformada por dicromato de potasio al 4.5% y ácido ósmico al 1% en una proporción 8:2. La solución triplicaba el volumen de los tejidos, se mantuvieron en agitación, oscuridad y temperatura constante (30 grados) durante un periodo de 2 semanas; sólo se hizo un cambio de esta solución 6 horas después de introducir los tejidos para promover una mejor penetración en las neuronas.

Pasadas las 2 semanas, se transfirieron los tejidos a una solución de nitrato de plata al 0.75%, cambiando la solución hasta no haber precipitaciones; una vez que se mostraba limpia, se dejaba reposar en el líquido por 48 horas. Los tejidos se retiraron del nitrato de plata y se cepilló la superficie de los cortes con alcohol al 50%. Se deshidrataron las rebanadas con alcoholes al 70%, 80%, 96%, 100% y finalmente una mezcla 1:1 de alcohol absoluto/éter. Se polimerizaron los tejidos, embebiéndose en colodión, en vacío y vapores de cloroformo. Una vez formados los bloques, se cortaron rebanadas más delgadas de 120  $\mu\text{m}$  de grosor utilizando un micrótopo. Estas rebanadas se deshidrataron progresivamente en alcoholes al 80%, 96%, isopropanol y xilol. Los tejidos se montaron, utilizando *Permout* como medio de montaje.

Los tejidos fueron observados y fotografiados en un estereoscopio para ver la conformación general del tejido y observar si la lesión estaba presente en los animales NVHL.

Con un microscopio invertido (Olympus Ckx41) se tomaron fotos de las neuronas piramidales de la corteza, así como de neuronas granulares del hipocampo. Se utilizaron objetivos de 10x para tomar la neurona en su totalidad y 40x para obtener más detalles de la célula, con este objetivo se tomaron varias fotos con distintos focos para seguir las prolongaciones de la neurona.

Las imágenes fueron analizadas en el software ImageJ v. 1.47. Se creó un stack con todas las imágenes tomadas de una misma célula y se sumó la señal para obtener en un mismo plano todas las características fotografiadas. Con este mismo software se cuantificó el diámetro mayor y área del núcleo, así como el número y longitud de dendritas; las imágenes se convirtieron a 8 bits y se ajustaron a una función (IsoData) para eliminar el ruido y cuantificar solo señal.

## **7.6 ANÁLISIS DE DATOS**

Se utilizó el software Sigma Plot 11.0 para realizar todos los análisis estadísticos. En el caso de las comparaciones en la ejecución de laberinto radial, en la fase de elección libre, se realizó un ANOVA de dos vías, teniendo como factores al grupo

(NVHL o sham) y el número de sesión. Para el análisis del entrenamiento con interrupciones, el ANOVA incluía los factores de grupo y duración de la interrupción (10s, 30s, 90s, 180s, 180s en oscuridad). Finalmente, en el análisis de la fase de administración de drogas, se realizó un ANOVA de 3 vías en donde se tomaron como factores el grupo, la duración de la interrupción, así como el fármaco administrado (solución salina o nicotina).

Para analizar las diferencias celulares, tanto en neuronas granulares del hipocampo, como en neuronas piramidales de la corteza, se llevó a cabo un ANOVA de dos vías tomando en cuenta el grupo y el historial de administración de fármaco. Todas las comparaciones post-hoc se llevaron a cabo con el test de Tukey.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 CORROBORACIÓN DE LESIÓN

Los animales a los que se les administró ácido iboténico, durante la cirugía estereotáxica, mostraron alteraciones en la morfología del hipocampo, así como alargamiento del ventrículo lateral. Las ratas con infusión de líquido cerebrospinal artificial mostraron morfología normal. En la *Figura 6* se muestran las comparaciones entre los grupos.

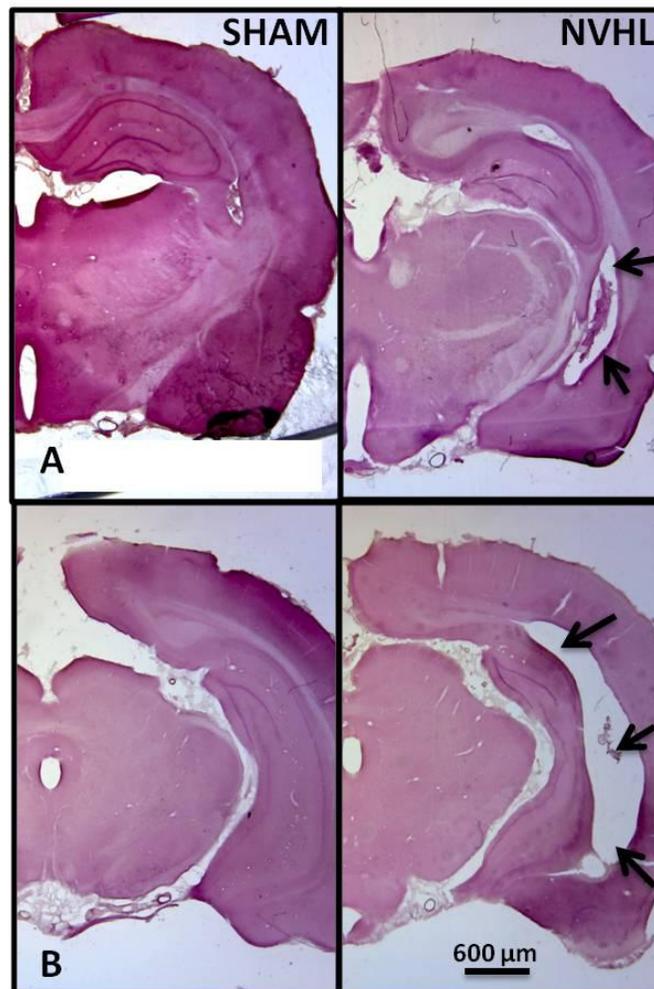


Figura 6. Las imágenes de la izquierda corresponden a los animales con lesión falsa, mientras que del lado derecho al modelo NVHL. En el panel A se muestra el hipocampo a -2.8 mm AP relativo a Bregma y en el panel B a una distancia de -3.6 mm AP relativo a Bregma. Las flechas señalan las regiones en donde se encuentra la lesión.

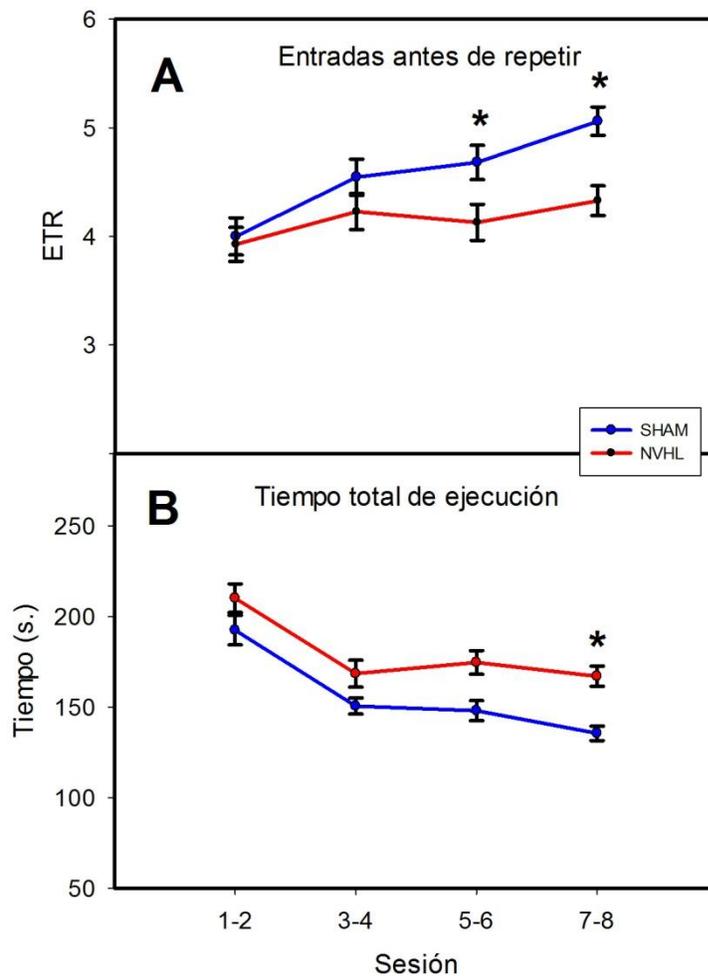
En los animales NVHL se evidenció que la lesión es mayor hacia el eje antero-posterior del hipocampo, consistente con una lesión en la porción ventral del hipocampo y mostrándose sin alteración las porciones dorsales del mismo. Sólo se encontró un caso de lesión unilateral y un caso con una lesión muy extendida que incluía todo el hipocampo y tálamo, estos datos fueron excluidos del análisis estadístico.

## **8.2 EJECUCIÓN DE LABERINTO RADIAL**

Tanto en la fase de elección libre, como en el entrenamiento con interrupciones se evidenciaron deficiencias en la memoria de trabajo en las ratas NVHL. En la fase de elección libre hubo diferencias en el número de entradas antes de repetir brazo; en las últimas sesiones las ratas control entraban a 5 brazos diferentes antes de cometer un error, mientras que las ratas NVHL a visitaban 4 diferentes brazos. Se mostró un efecto por grupo ( $F[1,540]= 14.128, p < 0.001$ ) y por sesión ( $F[3,540]= 7.249, p < 0.001$ ). Las comparaciones *post-hoc* mostraron diferencias significativas en la ejecución de las ratas sham y NVHL en las últimas 4 sesiones. Ver *Figura 7A*.

El tiempo de ejecución fue disminuyendo al paso de las 8 sesiones. Tanto el grupo ( $F[1,540]= 26.946, p < 0.001$ ), como las sesiones ( $F[3,540]= 24.300, p < 0.001$ ) mostraron efecto, pero no la interacción de ambas variables (ver *Figura 7B*). También se mostró una disminución en el tiempo promedio de visita a un brazo al paso de las sesiones ( $F[3,540]= 9.457, p < 0.001$ ), pero el grupo no mostró diferencia, es decir, ambos grupos pasaban en promedio 18 segundos en su visita a cada brazo en las últimas sesiones.

Las ratas NVHL cometieron más errores a través de las sesiones repitiendo la visita a brazos sin reforzador, en promedio 4 errores por sesión. Las ratas sham disminuyeron la cantidad de errores a través de las sesiones, se mostró efecto por grupo ( $F[1,540]= 45.583, p < 0.001$ ) y las comparaciones *post-hoc* mostraron diferencias en los grupos desde la sesión 3 hasta el final del entrenamiento. Los resultados se muestran en la *Figura 8*.



*Figura 7.* ETR y tiempo total en fase de elección libre. La línea azul muestra la ejecución del grupo sham, mientras que la línea roja los valores del grupo NVHL, la misma nomenclatura se mantendrá en los gráficos subsecuentes. En el panel A se grafican las entradas a nuevos brazos antes de cometer un error (ETR), ambos grupos comenzaron con valores similares, pero al paso de los sesiones se mostró una mejoría en la ejecución del grupo sham. El grupo NVHL se mantuvo en valores bajos, mostrando una deficiencia en la capacidad de almacenamiento de la memoria de trabajo, siendo significativamente distinta en las últimas 4 sesiones ( $p < 0.001$ ). En el panel B se observa que tanto el grupo sham, como el grupo NVHL, disminuyeron los tiempos de completamiento del laberinto a lo largo de las sesiones. Consistente con el aprendizaje de la tarea, el tiempo de ejecución fue significativamente menor para el grupo sham en el último par de sesiones ( $p < 0.001$ ).

El tiempo de error nos permite evaluar cuánto tiempo de ejecución era gastado en la comisión de errores. El ANOVA mostró un efecto por sesión ( $F[3,541]= 11.721$ ,  $p < 0.001$ ), así como mayores latencias de error en las ratas NVHL que las sham ( $F[1,541]= 44.553$ ,  $p < 0.001$ ), efecto que se mantuvo en todas las sesiones mostrado por la comparación *post-hoc* de Tukey (ver *Figura 8*).

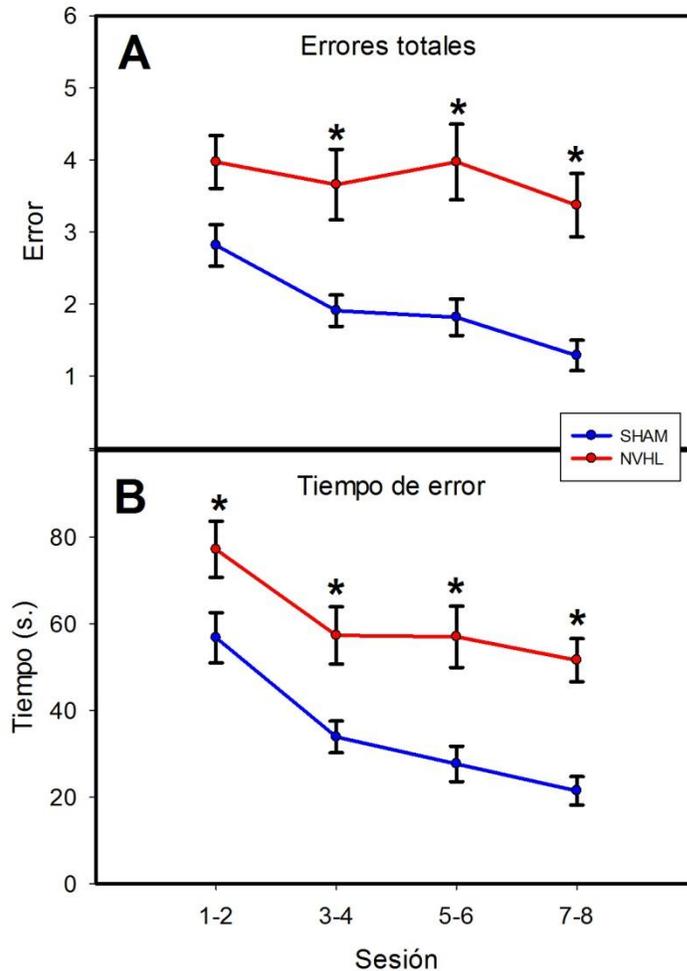
La introducción de interrupciones, después de la tercera elección de brazo, puso un reto mayor en la ejecución del laberinto. De esta manera, se obligó a los animales experimentales a almacenar durante mayor tiempo la información de los brazos visitados y que ya no preverían reforzador. En esta fase de entrenamiento, la medida ETR no mostró efecto por grupo, tampoco por la duración de la interrupción, ni la interacción de ambas variables. El tiempo total de ejecución mostró diferencia según el grupo ( $F[1,338]= 5.861$ ,  $p < 0.05$ ), pero es independiente de la duración del confinamiento. Por su parte, el tiempo promedio de visita a un brazo, tampoco mostró diferencias estadísticamente significativas, confirmando que la condición del grupo, o la duración de confinamiento, no afectan el tiempo que una rata tardará en su estancia en un brazo.

En cuanto a la comisión total de errores, en la fase de entrenamiento con interrupciones, se encontró que la varianza era explicada por la condición del grupo ( $F[1,338]= 23.653$ ,  $p < 0.001$ ), pero no por el valor de la interrupción. El análisis *post-hoc* mostró que cuando el confinamiento duraba 10 ó 30 segundos las ratas NVHL cometían significativamente más errores que los sujetos sham. Sin embargo, en las interrupciones de 90 ó 180 segundos no se mostró diferencia. Los valores del tiempo de error mostraron efecto según el grupo ( $F[1,338]= 23.267$ ,  $p < 0.001$ ) y se mantuvieron las diferencias significativas sólo en las interrupciones con valores de 10 y 30 segundos. Los datos se ejemplifican en la *Figura 9*.

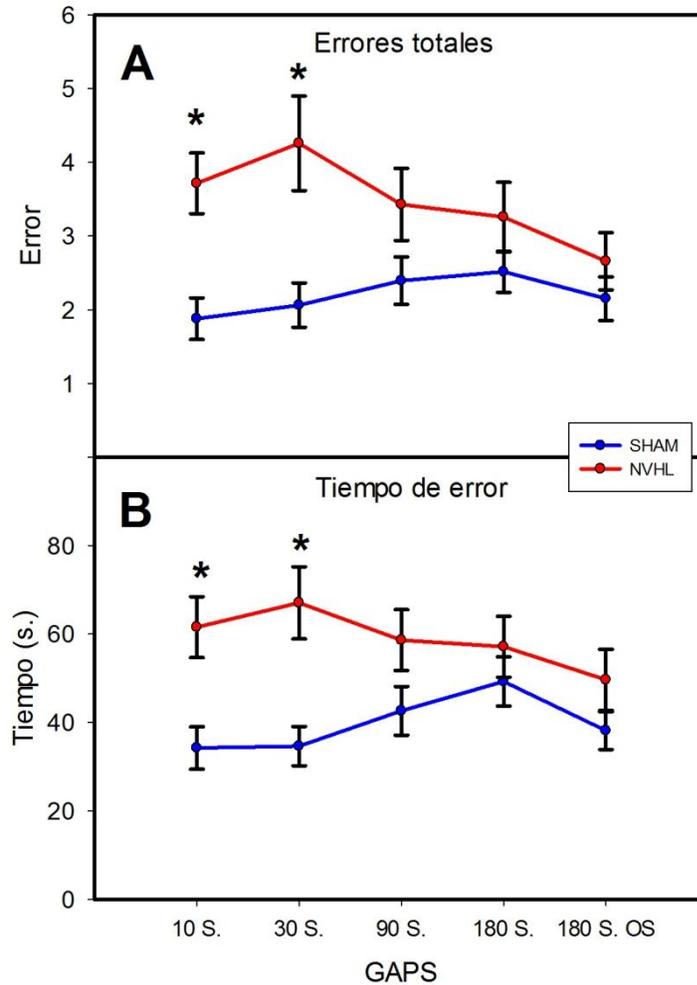
En esta fase de entrenamiento también se realizó análisis del tiempo de ejecución dividiéndolo en dos momentos, de manera previa y posterior al confinamiento, esto con la finalidad de observar si tras la interrupción, los animales tardarían más en completar la tarea. El tiempo gastado en la elección de los primeros tres brazos o tiempo previo al confinamiento, no mostró efecto por grupo. El tiempo de ejecución

posterior al confinamiento mostró un efecto diferencial por grupo, siendo mayor en los animales NVHL ( $F[1,338]= 4.691$   $p < 0.05$ ). La duración del gap no mostró efecto en el tiempo de ejecución.

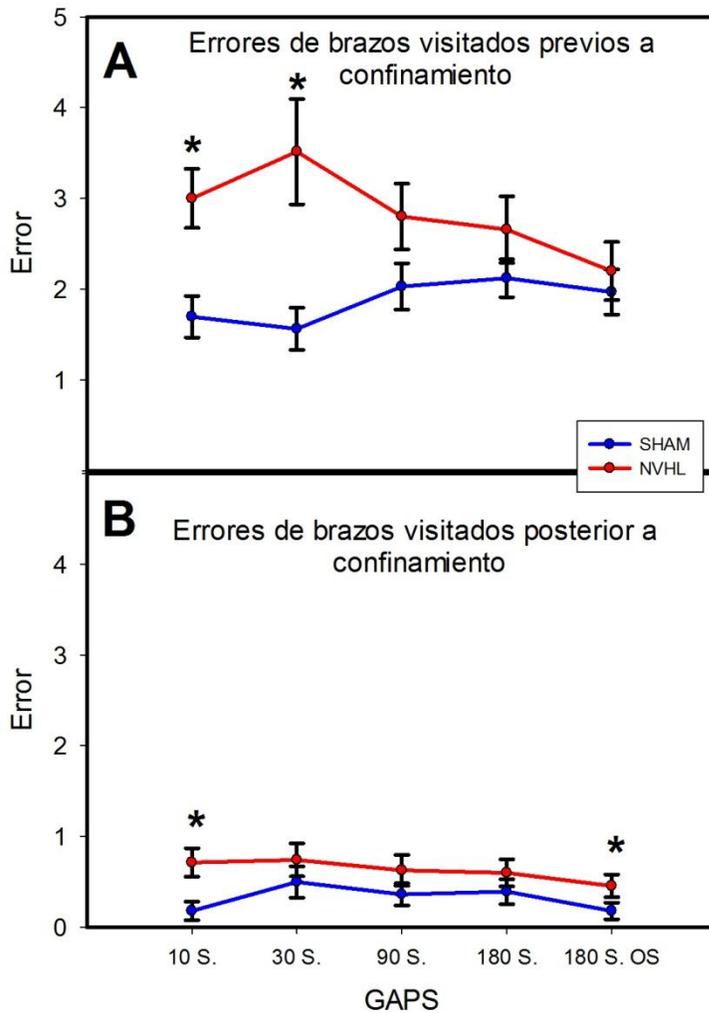
Por otro lado, también se analizaron los errores de manera diferencial. Es decir, si era más frecuente cometer un error al repetir un brazo visitado dentro de las primeras tres elecciones, o si se cometían más errores al repetir brazos que fueron visitados posterior al confinamiento. Se encontró que el primer tipo de error es el más común, tanto para el grupo sham como para el grupo NVHL, mostrando que es más probable olvidar la información de los primeros brazos visitados. Se encontró un efecto por grupo para los errores de brazos visitados previos a confinamiento ( $F[1,338]= 20.420$ ,  $p < 0.001$ ) así como para los errores de brazos visitados posterior al confinamiento ( $F[1,338]= 11.098$ ,  $p < 0.001$ ). Ninguna de las dos medidas arrojó un efecto por la duración del gap, es decir, el tiempo de interrupción de la tarea no modificaba la cantidad de errores que se cometían. (Ver *Figura 10*).



**Figura 8.** Errores totales y tiempo de error en fase de elección libre. En el panel A se muestra la cantidad de errores cometidos durante las sesiones. Ambos grupos comenzaron el entrenamiento cometiendo una cantidad similar de errores, pero a lo largo de las sesiones el grupo sham disminuyó la cantidad de visitas a brazos sin reforzador. El grupo NVHL se mantuvo cometiendo una alta cantidad de errores sin mostrar una mejoría desde los valores iniciales; la prueba *post-hoc* mostró diferencias significativas entre los grupos de la sesión 3 a la 8 ( $p < 0.001$ ). El tiempo que una rata tardaba en la visita a un brazo no mostró diferencias para ambos grupos (18 segundos en promedio). Sin embargo, cuando se pondera el tiempo según la visita a brazos erróneos, se encuentra que las ratas NVHL gastan más tiempo cometiendo equivocaciones ( $p < 0.001$ ), la diferencia fue significativa en todas las sesiones. La gráfica también muestra que ambos grupos fueron disminuyendo el tiempo de error a lo largo del entrenamiento, mostrando mayor eficiencia en la ejecución del mismo.



*Figura 9.* Errores totales y tiempo de error en la fase de entrenamiento con interrupciones. En el panel A, se muestran las diferencias entre el grupo NVHL y el grupo sham según el intervalo de interrupción dado. Sólo existen diferencias significativas cuando las interrupciones son cortas, como 10 ó 30 segundos, pero las interrupciones largas, de 90 ó 180 segundos anulan la disparidad en la ejecución ( $p < 0.001$ ). Esta tendencia se mantiene en el tiempo de error mostrado en el panel B, donde las diferencias estadísticamente significativas se presentan en los gaps pequeños ( $p < 0.001$ ).



*Figura 10.* Errores de brazos visitados previo y posterior al confinamiento en la fase de entrenamiento con interrupciones. Al dividir los errores según el momento de adquisición de la información, se deja ver que es más probable olvidar los brazos que fueron visitados antes de interrumpir la tarea y repetir la visita a estos brazos aunque ya no cuenten con reforzador. Existe un efecto por grupo para ambos tipos de errores, en el panel A se observa mayor cantidad de errores del grupo NVHL, cuando la interrupción dura 10 ó 30 segundos ( $p < 0.001$ ). En los errores de brazos visitados posterior a confinamiento, graficados en el Panel B, también se encuentran mayor cantidad de errores del grupo NVHL, significativamente mayores cuando el gap dura 10 segundos ó 180 segundos con confinamiento oscuro ( $p < 0.001$ ).

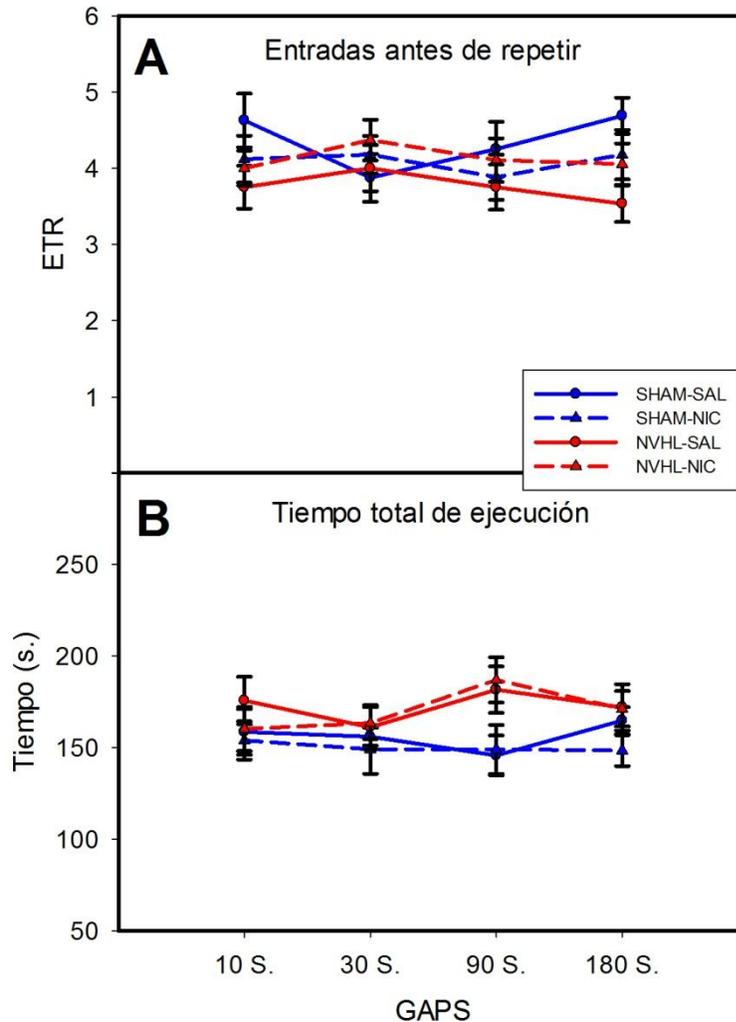
### **8.3 EJECUCIÓN DE LABERINTO RADIAL BAJO LA ADMINISTRACIÓN DE NICOTINA**

Durante esta fase del entrenamiento las ratas se mantuvieron bajo la administración crónica de 0.5 mg/kg de nicotina dos veces al día o solución salina como control. La ejecución del laberinto se mantenía bajo el paradigma con interrupciones.

El número de entradas a nuevos brazos antes de repetir, mostró un efecto por la interacción de las variables Grupo y Droga ( $F[1,270]= 4.936, p < 0.05$ ). La duración de la interrupción no tuvo efecto en la ejecución, en la *Figura 11A* se puede observar que, el grupo NVHL con historial de administración de nicotina muestra un aumento en la entrada a nuevos brazos. El tiempo total para completar el laberinto mostró efecto por grupo ( $F[1,270]= 11.385 p < 0.001$ ).

De manera consistente a lo encontrado en las otras fases de entrenamiento, el tiempo promedio gastado en la visita de un brazo no reveló efecto por grupo, duración de la interrupción, droga o la interacción de las variables.

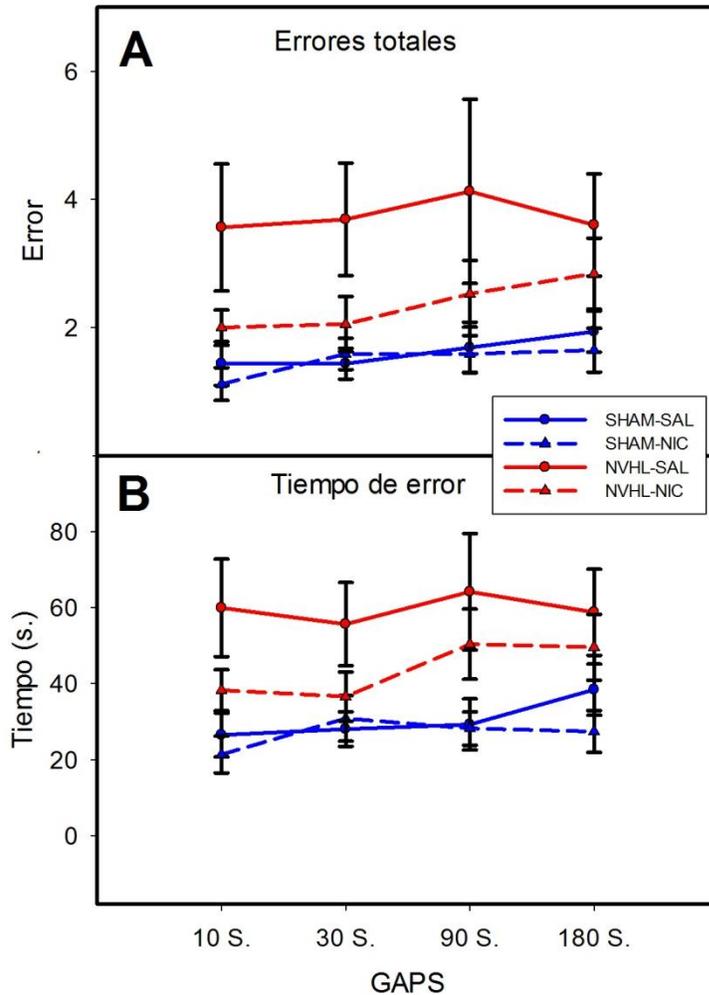
En cuanto a los errores cometidos a lo largo de toda la sesión, se encontró un efecto por grupo ( $F[1,270]= 25.089, p < 0.001$ ), historial de administración de droga ( $F[1,270]= 6.560, p < 0.05$ ) y la interacción de estas dos variables ( $F[1,270]= 4.380, p < 0.05$ ). En el caso del tiempo gastado en la comisión de errores, también se observó efecto por grupo ( $F[1,270]= 30.6, p < 0.001$ ) e historial de administración de droga ( $F[1,270]= 5.556 p < 0.05$ ); en este caso no hubo resultado por la interacción de ambas variables. En la *Figura 12* se observa que el grupo NVHL comete mayor cantidad de errores y tiene mayor tiempo de error, pero tras la administración de nicotina la ejecución del grupo se acerca a los valores del grupo sham; por otro lado, también es claro que la administración de nicotina en el grupo sham no afecta su ejecución, teniendo valores bastante similares al grupo sham con administración de solución salina.



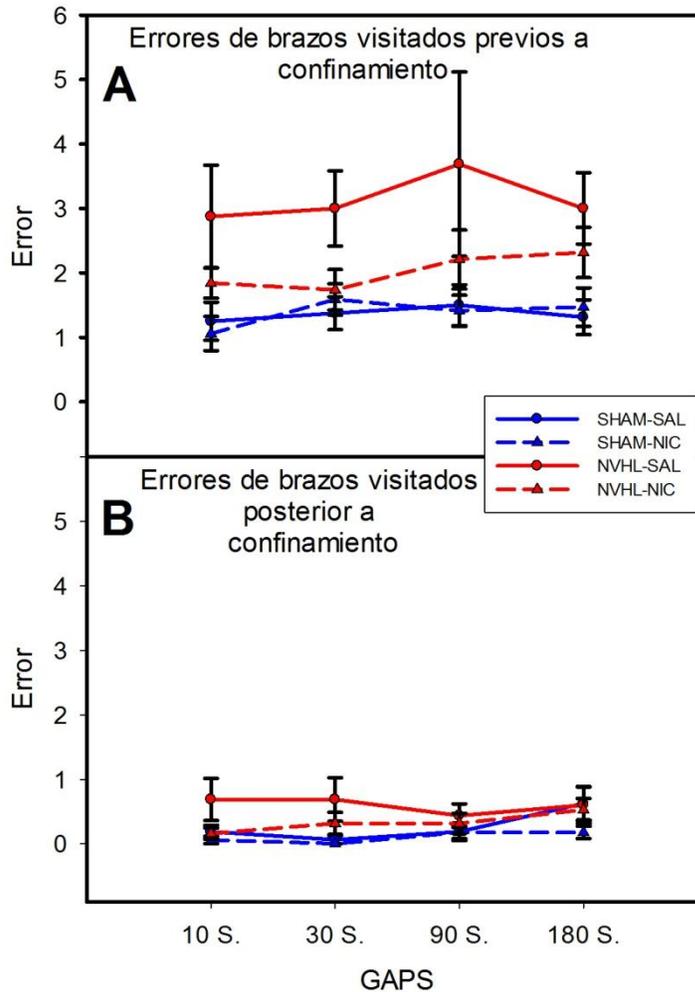
*Figura 11.* ETR y tiempo total de ejecución en fase de administración de nicotina. Las líneas rojas indican la ejecución del grupo NVHL, mientras que las líneas azules la ejecución del grupo sham. Cuando la línea es continua indica que el grupo fue tratado con solución salina, mientras que las líneas punteadas muestran un historial de administración crónica de nicotina. En el panel A se grafican las entradas a nuevos brazos antes de repetir, como se puede observar, el grupo NVHL con administración de nicotina muestra una mejora respecto al grupo NVHL-Salina. En cuanto al tiempo total de ejecución, mostrado en el panel B, se muestra un efecto por grupo, siendo las ratas NVHL las que despliegan mayores tiempos de ejecución ( $p < 0.001$ ), sin mostrar diferencia por la droga administrada, indicando que la nicotina no interfirió con la motricidad de los animales experimentales.

El tiempo que los animales gastaban en la elección de los tres primeros brazos sólo mostró efecto por grupo ( $F[1,270]= 8.961, p < 0.05$ ). El tiempo de ejecución posterior al confinamiento también mostró diferencia según la condición sham o NVHL de las ratas ( $F[1,270]= 7.791, p < 0.05$ ), pero no se encontró efecto por la duración del confinamiento o la droga administrada. Esto confirma que la nicotina no tuvo injerencia en la motricidad de los animales.

Al dividir los errores según el momento de adquisición de la información del brazo, ya sea de manera previa o posterior al confinamiento, de nuevo resultó que los animales cometían más errores al repetir la entrada a brazos que fueron las primeras 3 elecciones. Tanto el grupo ( $F[1,270]= 22.589, p < 0.001$ ), la droga administrada ( $F[1,270]= 4.574, p < 0.05$ ) y la interacción del grupo y la droga ( $F[1,270]= 4.968, p < 0.05$ ) explica la cantidad de errores de brazos visitados previos al confinamiento. La repetición de brazos que fueron visitados por primera vez después del confinamiento, muestra un efecto por grupo ( $F[1,270]= 9.788, p < 0.05$ ) y droga ( $F[1,270]= 5.883, p < 0.05$ ). En la *Figura 13* se muestran estos resultados.



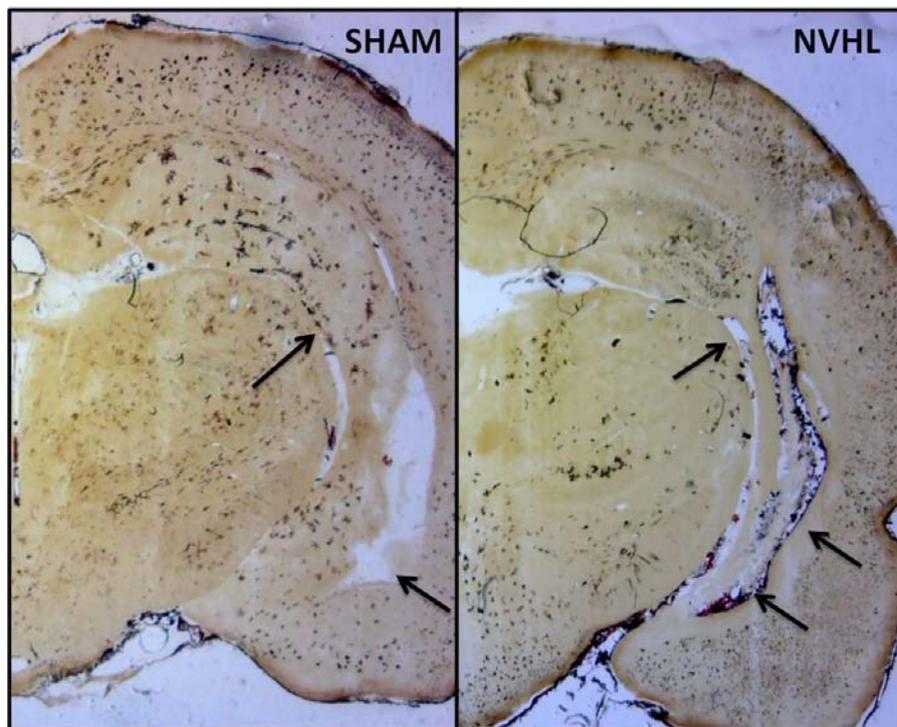
*Figura 12.* Errores totales y tiempo de error en la fase de administración de nicotina. En el panel A se observa la cantidad de errores cometidos en toda la sesión. Se puede ver que las ratas NVHL cometen más errores que el grupo SHAM. Sin embargo la administración crónica de 0.5 mg/kg de nicotina logró disminuir la cantidad de errores en el grupo NVHL, asemejándose a los valores del grupo SHAM; el resultado es más claro cuando la interrupción era corta (10 ó 30 segundos). En el caso de las interrupciones largas también se observa una tendencia hacia la reducción en la cantidad de errores. El grupo sham no muestra diferencia según la droga administrada. El panel B ejemplifica el tiempo de error, la nicotina logra disminuir los altos valores del grupo NVHL, siendo más evidente cuando la interrupción dura 10 ó 30 segundos; el grupo SHAM no obtiene beneficio de esta droga.



*Figura 13.* Errores de brazos visitados previo y posterior al confinamiento en la fase de administración de nicotina. En la gráfica A, se muestra la cantidad de repeticiones de los primeros 3 brazos que eligieron los animales experimentales y que fueron visitados previo a la interrupción de la ejecución. Las ratas NVHL muestran mayor cantidad de este tipo de errores y de nuevo la nicotina es eficaz al revertir esta deficiencia. En la segunda parte de la sesión, una vez que terminaba la interrupción, los animales experimentales se encontraban con 3 brazos que aun no habían sido visitados y contaban con reforzador. En la gráfica B se observa la cantidad de repeticiones correspondiente a estos brazos visitados posterior al confinamiento; de nuevo se observa que el grupo NVHL comete más errores de este tipo y la nicotina mejora su ejecución. En ninguno de los dos tipos de error se observa efecto de la nicotina sobre el grupo sham.

#### 8.4 COMPARACIONES CELULARES

En los tejidos teñidos con la técnica de Golgi rápido, también se pudo confirmar la localización y extensión de la lesión en los animales NVHL y la anatomía conservada de los sujetos sham. Los cortes correspondientes a animales NVHL mostraban una reducción en el tamaño del hipocampo ventral, así como mayor tamaño del ventrículo lateral, en la *Figura 14* se observan imágenes representativas de cada grupo.



*Figura 14.* Cortes coronales teñidos con Golgi rápido. La región representada corresponde aproximadamente a  $-2.8$  mm AP a partir de Bregma. En la imagen de la izquierda se observa la estructura intacta del hipocampo de un animal con lesión falsa. En la imagen de la derecha se señala, con la flecha superior, la reducción de volumen de la porción ventral del hipocampo, y en las flechas inferiores se localiza el ventrículo lateral que se muestra más amplio en los animales que recibieron ácido iboténico en el día postnatal 7.

Para observar si existían diferencias en la morfología celular de los animales experimentales, se analizaron tanto neuronas piramidales de la corteza, como neuronas granulares del hipocampo. Para el análisis de datos también se tomó en cuenta el historial de administración de nicotina o solución salina. Se obtuvieron y analizaron 45 neuronas de corteza y 40 neuronas de hipocampo del grupo sham-Nicotina, 31 neuronas de corteza y 18 neuronas de hipocampo de ratas sham-Salina, 53 neuronas de corteza y 35 neuronas de hipocampo del grupo NVHL-Nicotina y finalmente 40 neuronas de corteza y 19 neuronas de hipocampo del grupo NVHL-Salina.

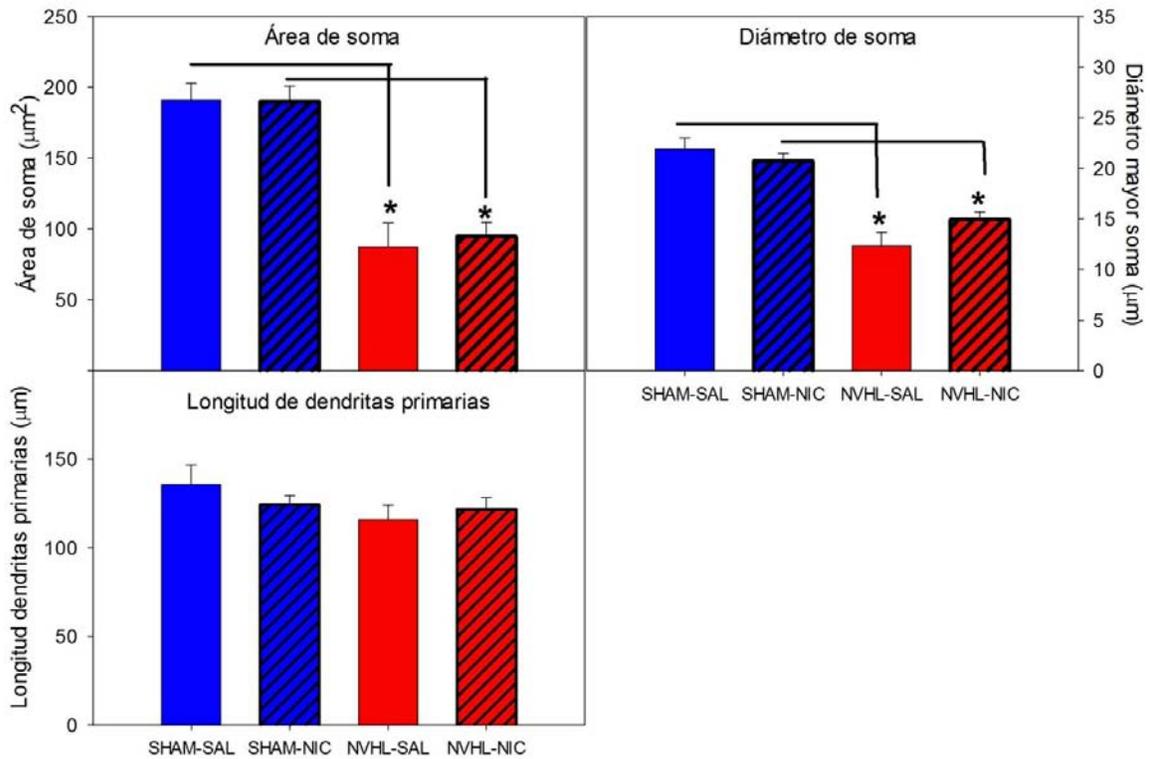
Los parámetros evaluados en las neuronas granulares fueron el área del soma, diámetro mayor del soma, longitud de las dendritas primarias, así como la longitud horizontal. La longitud horizontal se refiere a la distancia entre los extremos finales de las dendritas más distantes entre sí, este valor indica si la comunicación de la neurona abarca un área amplia o reducida. Se encontró que las neuronas granulares tenían de 2 a 4 dendritas primarias. El tamaño del soma ( $F[1,103]= 59.474$ ,  $p < 0.001$ ) y el diámetro mayor del soma ( $F[1,103]= 62.377$ ,  $p < 0.001$ ) mostraron ser dependientes del grupo, pero no de la administración de nicotina (Ver *Figura 15*). La longitud de las dendritas primarias y la longitud horizontal no mostraron efecto por grupo, droga, ni por la interacción de ambas. En la *Figura 16* se muestran neuronas representativas de cada grupo.

También se evaluaron el área de soma, diámetro mayor de soma y longitud de dendritas primarias basales de las neuronas piramidales de la corteza. Se encontró que las neuronas piramidales tenían de 3 a 5 dendritas primarias proyectando desde el soma.

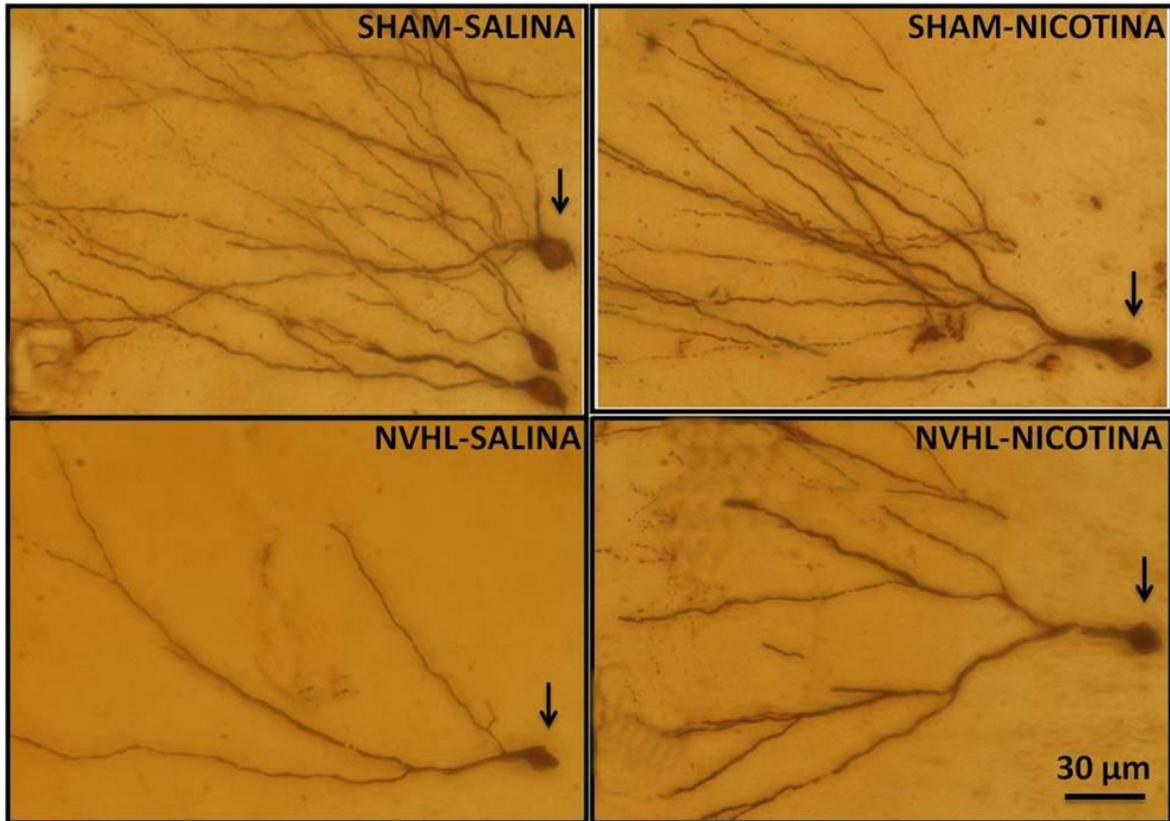
Los resultados del ANOVA indican que la longitud promedio de las dendritas basales fue diferente tomando en cuenta el grupo ( $F[1,155]= 9.332$ ,  $p < 0.05$ ). Sin embargo, al comparar con T de Student, las medias de longitud entre los grupos, también se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las ratas NVHL-Nicotina y NVHL-salina ( $p < 0.05$ ). De acuerdo con el ANOVA, el área del

soma mostró ser dependiente de la interacción entre las variables droga y grupo ( $F[1,155]= 3.954, p < 0.05$ ). La comparación *post-hoc* indicó diferencias puntuales entre el grupo NVHL tratado con solución salina y NVHL con tratamiento de nicotina. El diámetro mayor del soma también mostró efecto de interacción de las variables droga y grupo ( $F[1,150]= 10.648, p=0.001$ ), ver *Figura 17*.

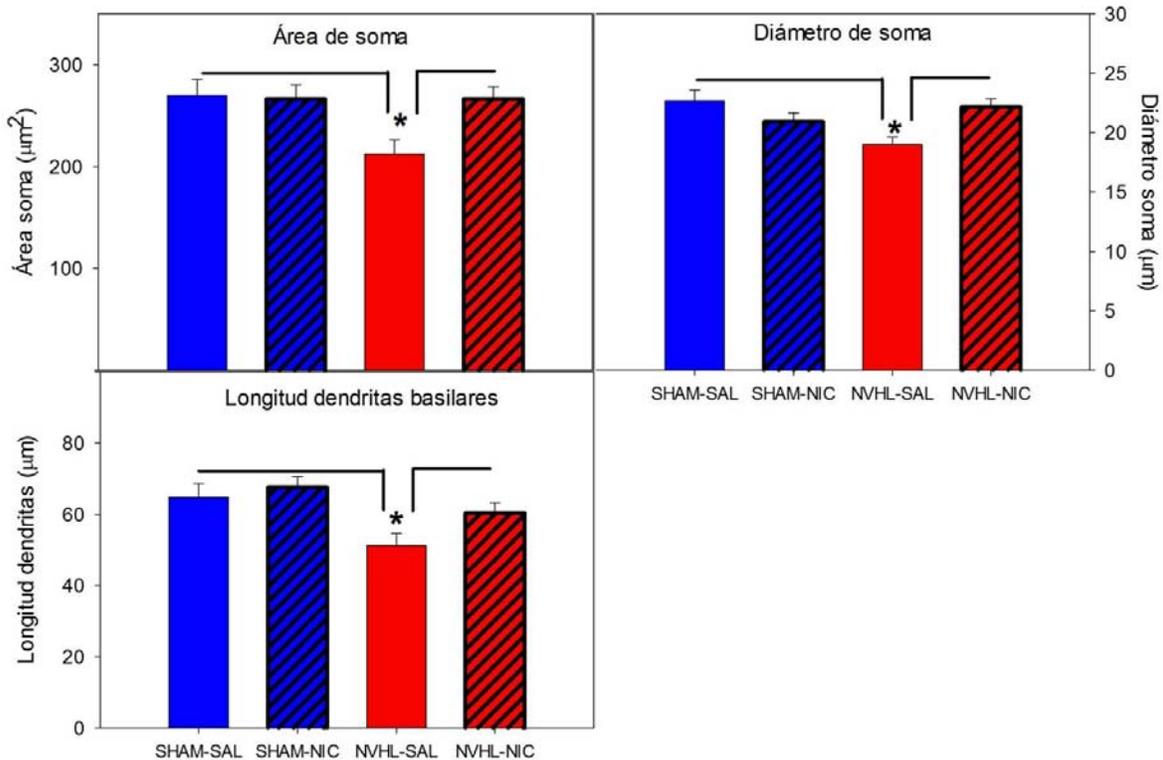
Como se puede observar, el área del soma, el diámetro mayor del soma y la longitud promedio de las dendritas, mostraron alteraciones cuando se dio una lesión en el hipocampo ventral en etapas tempranas del desarrollo. La nicotina logró revertir estas alteraciones igualando las medidas hasta los valores de las ratas con lesión falsa. Por otro lado, la administración de nicotina no mostró efecto en el grupo SHAM. En la *Figura 18* se muestran neuronas piramidales representativas de cada grupo.



*Figura 15.* Análisis cuantitativo de neuronas granulares del hipocampo. En el panel A se muestra el diámetro del soma, con un valor promedio de  $190.534 \mu\text{m}^2$  ( $\text{SEM}= 9.316 \mu\text{m}^2$ ) para el grupo sham y  $91.021 \mu\text{m}^2$  ( $\text{SEM}= 8.929 \mu\text{m}^2$ ) en el grupo NVHL. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, pero la administración de fármaco no causó efecto en esta medida. Los valores del diámetro mayor de soma se muestran en el panel B. En las ratas sham se observa un diámetro de  $21.316\mu\text{m}$  ( $\text{SEM}= 0.703 \mu\text{m}$ ), mientras que en las ratas NVHL el promedio es de  $13.627 \mu\text{m}$  ( $\text{SEM}=0.674 \mu\text{m}$ ). Se confirma que no hay efecto por la administración de nicotina. En el panel C se cuantifica la longitud de las dendritas primarias, el análisis estadístico no mostro efecto por grupo de lesión, ni por historial de administración de droga. La longitud promedio de las dendritas en el grupo NVHL fue de  $118.772 \mu\text{m}$  ( $\text{SEM}=5.207 \mu\text{m}$ ), y en el grupo sham de  $130.003 \mu\text{m}$  ( $\text{SEM}=5.433 \mu\text{m}$ ).



*Figura 16.* Imágenes representativas de neuronas granulares del hipocampo, pertenecientes a los 4 grupos experimentales. En cada imagen la flecha señala el soma de las neuronas, el área y el diámetro que fue significativamente mayor en los sujetos sham que en los NVHL. La administración de fármaco no tuvo efecto en ninguno de los parámetros evaluados.



**Figura 17.** Análisis cuantitativo de neuronas piramidales de corteza. En el panel A, se muestran los resultados del área de soma. Los valores son los siguientes: sham-SAL 269.714  $\mu\text{m}^2$  (SEM=17.750  $\mu\text{m}^2$ ), sham-NIC 266.206  $\mu\text{m}^2$  (SEM=13.749  $\mu\text{m}^2$ ), NVHL-SAL 212.230  $\mu\text{m}^2$  (SEM= 14.106  $\mu\text{m}^2$ ), NVHL-NIC 266.460  $\mu\text{m}^2$  (SEM=11.833  $\mu\text{m}^2$ ). 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 observa la medición del diámetro mayor del soma, en el grupo sham-SAL la media fue de 22.690  $\mu\text{m}$  (SEM=0.916  $\mu\text{m}$ ), sham-NIC 20.922  $\mu\text{m}$  (SEM=0.710  $\mu\text{m}$ ), NVHL-SAL 18.980  $\mu\text{m}$  (SEM=0.728  $\mu\text{m}$ ), NVHL-NIC 22.144  $\mu\text{m}$  (SEM=0.641  $\mu\text{m}$ ). La medición de la longitud de las dendritas primarias basilares está indicada en el panel C, los datos que se obtuvieron por grupo son: sham-SAL 64.723  $\mu\text{m}$  (SEM=4.252  $\mu\text{m}$ ), sham-NIC 67.540  $\mu\text{m}$  (SEM=3.194  $\mu\text{m}$ ), NVHL-SAL 51.214  $\mu\text{m}$  (SEM=3.279  $\mu\text{m}$ ), NVHL-NIC 60.357  $\mu\text{m}$  (SEM=2.619  $\mu\text{m}$ ).

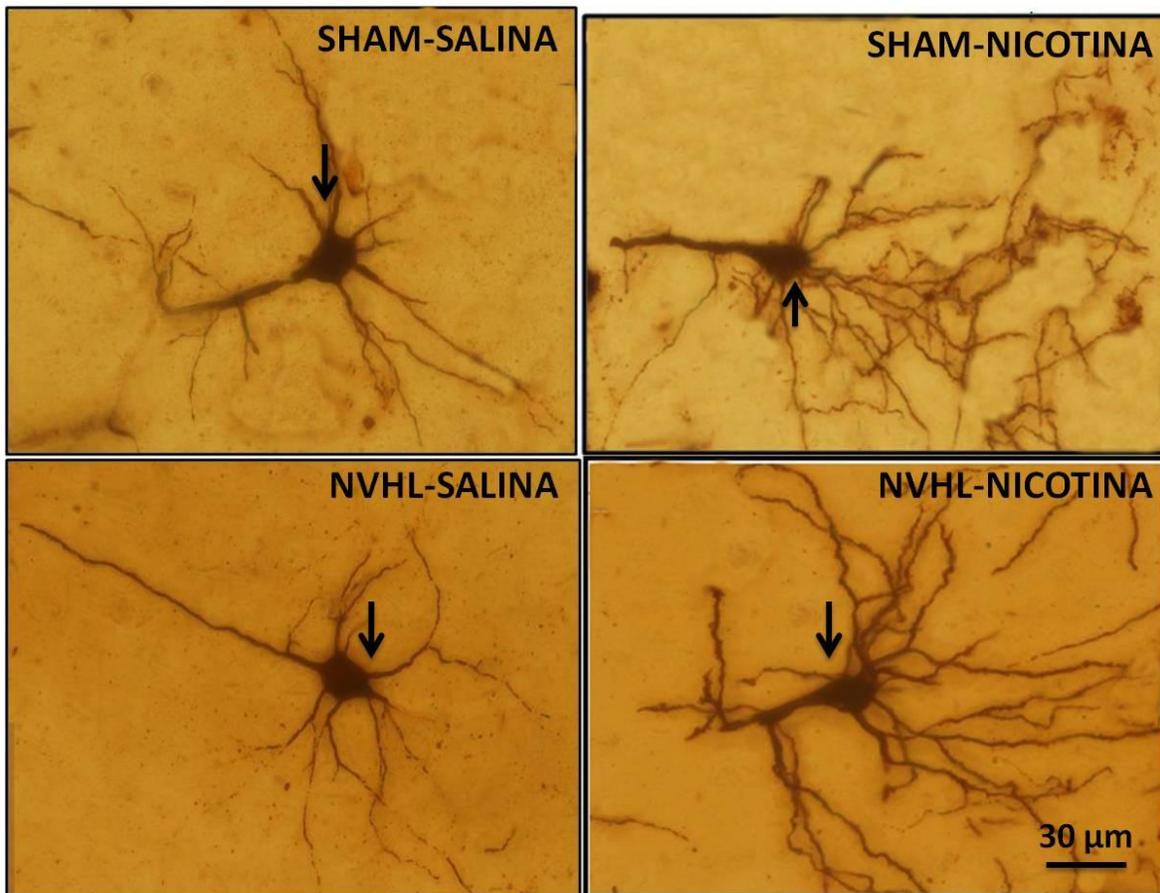


Figura 18. Imágenes representativas de neuronas piramidales de la corteza, pertenecientes a los 4 grupos experimentales. A pesar de que la lesión en el grupo NVHL se realizó en el hipocampo ventral, las consecuencias se pueden observar en neuronas corticales interconectadas con esta región. Otro factor a tomar en cuenta es que la lesión se llevó a cabo en etapas tempranas del desarrollo y sus efectos permanecieron hasta la etapa adulta, momento en el que fueron obtenidos los encéfalos para esta tinción. En el grupo NVHL con administración de solución salina se encontró menor área y diámetro de soma, así como menor promedio de longitud en dendritas basilares. La nicotina logro revertir este efecto tras ser administrada de manera crónica en el grupo NVHL.

## **9. DISCUSIÓN**

La presente investigación tuvo como objetivo principal evaluar la administración crónica de nicotina en un modelo animal de esquizofrenia ampliamente validado. Teniendo esto presente, primero se buscaba demostrar, tal como se ha reportado con anterioridad, que el modelo NVHL presenta deficiencias en la ejecución de tareas cognitivas particularmente en la ejecución de laberinto radial (Chambers *et al.*, 1996), tarea que evalúa la integridad de la memoria de trabajo en animales experimentales.

Tras un entrenamiento de 8 días, las ratas NVHL mostraron serias deficiencias en la ejecución del laberinto radial, visitando menor cantidad de brazos nuevos antes de hacer una repetición, medida relacionada con la capacidad de almacenamiento de información de la memoria de trabajo. También se encontró que las ratas NVHL se mantuvieron cometiendo alrededor de 4 errores por sesión durante todo el entrenamiento, mientras que en las ratas sham hubo un decremento en el número de errores a través de las sesiones.

El hecho de que no existieran diferencias en el tiempo promedio de visita a un brazo, indica que las diferencias encontradas entre el grupo sham y NVHL no pueden ser atribuidas a problemas de motricidad, ansiedad o diferencias en los tiempos de adquisición de información de cada brazo. Sin embargo, al ponderar la cantidad de tiempo en la visita a brazos que ya no contaban con reforzador, las ratas NVHL tomaron más tiempo en la visita a brazos erróneos, indicando un claro problema en el almacenamiento y mantenimiento de información, necesarios en la memoria de trabajo.

La introducción de demoras en la ejecución de la tarea aumentó la dificultad en la resolución de la misma, dado que se forzó a los animales a mantener en línea la información de los brazos visitados sin tener acceso al resto del laberinto. La introducción de demoras en la ejecución del laberinto radial ya había sido descrita previamente y se habían demostrado deficiencias en la ejecución de animales

experimentales sanos con demoras de 2.5 minutos, 60 y 120 minutos (Dudchenko, 2004).

En esta investigación encontramos que con interrupciones cortas de 10 y 30 segundos los animales NVHL mostraron mayores deficiencias en la ejecución del laberinto; cuando la demora era larga, de 90 ó 180 segundos, la cantidad de errores entre sujetos NVHL o SHAM no era diferente. Esto sugiere que, al poner un reto mayor en la tarea, se logró afectar la memoria de trabajo del grupo sham, llevándola a una deficiencia similar a la mostrada por el grupo NVHL. Al aumentar la cantidad de entrenamiento, en la fase de administración de nicotina, las ratas sham disminuyen la cantidad de errores independientemente del intervalo de demora.

En la etapa de entrenamiento con interrupciones también se encontró que la mayor cantidad de errores provenían de repeticiones de brazos visitados previos al confinamiento. Esto nos habla de un fenómeno de recencia en la ejecución del laberinto, es decir, una mayor capacidad para mantener la información de los últimos ítems presentados, en contraposición al efecto de primacía o mayor capacidad para mantener la información de los primeros estímulos adquiridos (Stephane *et al.*, 2010). Se ha encontrado que las demandas de la tarea es lo que determina si la codificación de la información será mejor sobre los primeros o los últimos ítems presentados (Morrison, Conway y Chein, 2014). La importancia de estos efectos en la ejecución del laberinto radica en que se requiere memorizar un orden secuencial y, dado el confinamiento durante la ejecución, se interrumpe la codificación de información de los primeros brazos visitados.

En una tarea de memoria de trabajo con demoras, realizada a pacientes con esquizofrenia, se ha mostrado que muestran un menor efecto de primacía, independiente a la duración de la demora. Se hipotetiza que se debe a un decaimiento más rápido de la información almacenada (Stephane y Pellizzer, 2007). Estos resultados mimetizan lo que se observó con el modelo NVHL.

En investigaciones previas se han demostrado efectos controversiales de la nicotina en el modelo NVHL. Berg y Chambers (2008), demostraron una mayor sensibilización locomotora en animales NVHL vs animales sham tras la administración crónica de 0.5 mg/kg de nicotina. La administración se realizó una vez al día y previo a una evaluación en campo abierto durante 2 semanas. Los animales NVHL mostraron un incremento progresivo de actividad. Se interrumpió la administración de droga o vehículo durante 2 semanas y se llevó a cabo una evaluación final con la administración aguda de 0.5 mg/kg de nicotina a todos los animales; los animales NVHL con historial de administración de nicotina mostraron mayor sensibilización al fármaco.

En otro trabajo, se investiga la ejecución de laberinto radial en animales NVHL, así como la administración de nicotina. Esta droga fue administrada de manera aguda probando dosis de 0.1, 0.2 y 0.4 mg/kg inyectadas 20 minutos antes de la sesión. Sólo se evaluaron las entradas antes de repetir brazo y ninguna de las dosis tuvo efecto en el grupo NVHL o sham (Chambers, Moore, McEvoy y Levin, 1996).

También se ha intentado comparar si el efecto de la nicotina en el modelo NVHL está relacionado con mayor propensión a consumir la droga o a efectos benéficos en la cognición. Berg y colaboradores (2014b) evaluaron grupos diferentes de ratas NVHL en un paradigma de autoadministración de nicotina y en la tarea de laberinto radial. En el laberinto radial solo se evaluó el tiempo total de ejecución, la cantidad de reforzadores consumidos y las entradas antes de repetir. Se administró 0.5 mg/kg de nicotina subcutáneamente 30 minutos antes de la sesión por periodos variables del entrenamiento y no se encontró beneficio de la droga en las deficiencias de ejecución del grupo NVHL. En el paradigma de autoadministración se inició con una administración crónica de nicotina en periodos de peri-adolescencia del animal, este tratamiento previo no interfirió con la autoadministración de los animales en el periodo de adultez; las ratas NVHL mostraron más cantidad de presión de palanca para obtener la infusión de nicotina, mayor resistencia a la extinción, así como mayor respuesta locomotora ante la droga. Los autores concluyen que la hipótesis de automedicación se

relaciona con una mayor propensión al consumo de la droga y no con los efectos benéficos en la cognición de los pacientes.

Finalmente, existe otra evidencia sobre la relación de la nicotina y su efecto en las deficiencias en cognición de los animales NVHL. Berg y colaboradores (2014a) colocaron a los sujetos experimentales parches transdermales que liberaban 0.5 mg/kg de nicotina al día, durante 10 días; se retiró el parche y se comenzó con la evaluación conductual en el laberinto radial. En las sesiones finales de entrenamiento se dieron inyecciones agudas de nicotina. Los resultados apuntan a que el historial de administración de nicotina con parches no hizo la diferencia en la ejecución del grupo NVHL. Sin embargo, en las últimas sesiones donde se re-administró la droga sí se encontró un modesto efecto pro-cognitivo de la droga. También se encontró menor densidad de receptores  $\alpha 4\beta 2$  en la corteza frontal de los animales NVHL, fenómeno que fue revertido por el fármaco (Berg *et al.*, 2014).

Las evidencias referenciadas previamente indican que la nicotina no tiene claros efectos en la cognición, esto puede deberse a varios hechos. En primer lugar sólo reportan medidas como las entradas antes de repetir, el tiempo de ejecución y la cantidad de reforzadores obtenidos en la sesión. Si bien estas medidas son importantes en la descripción de la ejecución del laberinto, medidas como la cantidad de errores y la latencia de error nos permitieron diferenciar con mayor claridad las deficiencias cognitivas del grupo NVHL. Por otro lado, la forma de administración de los artículos previos no mimetiza el patrón de consumo de los pacientes con esquizofrenia y del cual podrían estarse beneficiando cognitivamente, en algunos casos la administración era aguda o no correspondía con el momento de evaluación en el laberinto.

En este trabajo pudimos constatar que la nicotina no interfirió con el tiempo total de ejecución, ni con las latencias, lo cual nos permite concluir que no afectó la motricidad de los animales NVHL o sham. Sin embargo, el historial de administración de nicotina sí fue un factor determinante en la medida de capacidad de almacenamiento de la memoria de trabajo; también decrementó la cantidad de errores y el tiempo gastado en la visita de brazos sin reforzador en las ratas

NVHL, pero no en las sham. Estas evidencias nos permiten discutir varios puntos. En primer lugar fue necesario que la administración de nicotina se diera de manera crónica para poder observar su efecto pro-cognitivo. Por otro lado, el efecto sólo se observó en aquellas ratas que desplegaban una deficiencia, pero en las ratas con lesión falsa no afectó la ejecución. Lo anterior apoya el hecho de que la nicotina es pro-cognitiva sólo en el caso de deficiencias en cognición; este efecto no sólo se ha observado en esquizofrenia, sino en trastornos como Alzheimer o Parkinson (Levin *et al.*, 2005).

La mejora en ejecución de ratas NVHL fue significativa cuando la interrupción era corta (10 ó 30 segundos), pero cuando el confinamiento era más largo (90 ó 180 segundos), se mostró una clara tendencia hacia la disminución de errores. Dado que las duraciones largas significaban un reto mayor en la memoria de trabajo de estos animales, que en sí misma ya mostraba deficiencias, se sugiere que una dosis mayor de nicotina pudo haber sido benéfica en el caso de las interrupciones largas.

Otro de los objetivos se centraba en la evaluación de la morfología celular. Se llevó a cabo para averiguar si una lesión postnatal dejaría consecuencias a lo largo del tiempo y en regiones alejadas al sitio original de lesión, así como para evaluar la pertinencia de la hipótesis etiológica de neurodesarrollo del trastorno.

Si ésta fuese una enfermedad neurodegenerativa, se esperaría que con el paso del tiempo y mientras los síntomas se agudiza, se perdiera más cantidad de volumen cerebral y en una tasa más acelerada que la esperada por envejecimiento. En estudios longitudinales se ha encontrado que el tamaño ventricular se mantiene estable, regiones como el hipocampo, la amígdala y los lóbulos temporales tampoco muestran cambio (Pantelis *et al.*, 2003). La gliosis ha sido asociada con enfermedades neurodegenerativas, es decir, trastornos en los que existe un proceso de muerte celular crónica. En el caso de la esquizofrenia no se ha reportado la presencia de gliosis o decremento en la relación neurona:glia. Sin embargo, se ha encontrado reducción en la arborización dendrítica, menor

tamaño neuronal y adelgazamientos corticales que apuntan a aberraciones en el neurodesarrollo (Andreasen, 2010).

Las neuronas granulares del grupo SHAM mostraron medidas de área, número de dendritas primarias y longitud de dendritas similar a reportes previos (Buckmaster, 2012). Sin embargo, se encontró que las neuronas granulares del hipocampo de ratas lesionadas mostraban área y diámetro en soma mucho menores a los esperados, esta disminución no fue revertida por la administración de nicotina.

Como ya se ha descrito, existen muchas evidencias que sugieren que el hipocampo está afectado en esquizofrenia (Adriano *et al.*, 2011; Heckers, 2001; Tamminga *et al.*, 2010). Se ha reportado que el giro dentado de esta población muestra mayor excitabilidad y menor relación de neuronas granulares maduras (Yu, Marchetto y Gage, 2014). Las diferencias morfológicas de neuronas granulares reportadas en este trabajo, podrían subyacer a la inmadurez del giro dentado dado que son el principal tipo celular en esta región.

La evaluación morfológica de neuronas piramidales corticales responde al hecho de que las deficiencias cognitivas en esquizofrenia y en el modelo NVHL han sido asociadas con la actividad de la corteza frontal (Placek, Dippel, Jones y Brady, 2013). Se propone que existen alteraciones en el balance excitatorio e inhibitorio de la corteza de pacientes con esquizofrenia. En el modelo NVHL se confirmó esta hipótesis al evaluar la respuesta electrofisiológica de neuronas piramidales de la capa 5 de la corteza; los autores encontraron que había mayor amplitud en corrientes postsinápticos excitatorias y un decremento de frecuencia en corrientes postsinápticos inhibitorias (Ryan, Bhardwaj, Tse, Srivastava y Wong, 2013).

Reportes previos ya habían demostrado diferencias en la morfología de neuronas piramidales en ratas NVHL (Flores *et al.*, 2005). Nuestros resultados mostraron un decremento en el área de soma, diámetro de soma y longitud de dendritas basales en el grupo NVHL, confirmando que una lesión en periodos tempranos del desarrollo puede afectar regiones distantes pero interconectadas con la zona de la lesión, apoyando la hipótesis de neurodesarrollo en esquizofrenia.

Un resultado importante apunta que la administración crónica de nicotina pudo revertir las deficiencias morfológicas de las neuronas piramidales del grupo NVHL, pero en el grupo sham no hubo efecto del fármaco. Este efecto podría subyacer al hecho de que la nicotina se muestra benéfica cuando existe detrimento cognitivo como en la esquizofrenia, pero sin efecto cuando se administra en sujetos sanos.

Finalmente, al integrar los resultados conductuales y morfológicos del efecto de la nicotina en animales NVHL, podemos especular que el fármaco sirvió como un modulador en el desbalance inhibitorio-excitatorio de la corteza. Esta hipótesis se basa en el hecho de que los animales NVHL muestran deficiencias en la actividad moduladora de neuronas piramidales corticales (Ryan, *et al.*, 2013), dando lugar a la expresión de déficits cognitivos. Por otro lado, se conoce que la actividad colinérgica es fundamental para mantener el balance inhibitorio-excitatorio en corteza, dado que existen marcadores colinérgicos en las neuronas piramidales corticales que mantienen este balance (Sarter, *et al.*, 2005)

Nuestros resultados indican que la administración crónica de nicotina normalizó la morfología de las neuronas piramidales de animales NVHL. Esta normalización posiblemente impactó en la actividad cortical de estos animales, regulando el desbalance inhibitorio-excitatorio de esta región. Este efecto se vio reflejado en la mejora en la ejecución del laberinto radial por parte de los animales NVHL.

## **10. CONCLUSIONES**

Los resultados de esta investigación nos permiten hacer varias conclusiones. En primer lugar, recalcar la funcionalidad del modelo NVHL en la descripción de fenómenos conductuales y neurobiológicos relacionados a la esquizofrenia.

En la evaluación de la memoria de trabajo de los sujetos experimentales se encontró una clara deficiencia de los animales NVHL al compararlos con sujetos sham, modelando los problemas cognitivos presentes en el trastorno.

La modificación hecha al paradigma conductual nos permitió obtener más conclusiones sobre el procesamiento de información en los animales NVHL. Por un lado se encontró que, al interrumpir la ejecución de la tarea las deficiencias cognitivas aumentaban. La diferencia en ejecución entre los grupos fue más marcada cuando la interrupción era corta, de 10 a 30 segundos. Por otro lado, al realizar un confinamiento durante la ejecución de la tarea, se promueve un decaimiento de la información almacenada y se olvidan los primeros brazos que fueron visitados. La administración crónica de nicotina utilizada en esta investigación imita el alto patrón de consumo de nicotina que tiene los pacientes con esquizofrenia. Se demostró que la nicotina fue efectiva para revertir las deficiencias en memoria de trabajo asociadas al modelo, siendo determinante la cronicidad.

Se puede concluir que la lesión neonatal restringida al hipocampo tuvo consecuencias a largo plazo y se extendió la disfunción a regiones como la corteza en donde se encontró menor área y diámetro de soma, así como menor longitud de dendritas en el grupo NVHL, fenómeno que fue revertido por la administración de nicotina. Las neuronas granulares del hipocampo mostraron diferencias morfológicas importantes en el grupo NVHL, pero la nicotina no revirtió estas diferencias. El trabajo soporta la idea de que la alta tasa de consumo de tabaco de los pacientes con esquizofrenia puede deberse a un intento de automedicación y mejora cognitiva que acarrea consecuencias como mejor funcionalidad y adaptación.

## **11. REFERENCIAS**

1. Abi-Dargham, A. (2004). Do we still believe in the dopamine hypothesis? New data bring new evidence. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 7(5), S1–S5.
2. Adriano, F., Caltagirone, C., & Spalletta, G. (2011). Hippocampal volume reduction in first-episode and chronic schizophrenia: a review and meta-analysis. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 18(2), 180–200.
3. 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*, 186(3), 215–221.
4. Alquicer, G., Morales-Medina, J., Quirion, R., & Flores, G. (2008). Postweaning social isolation enhances morphological changes in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of psychosis. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 35(2), 179-187.
5. Alquicer, G., Silva-Gómez, A., Peralta, F., & Flores, G. (2004). Neonatal ventral hippocampus lesion alters the dopamine content in the limbic regions in postpubertal rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 22(2), 103-111.
6. Andreasen, N. (2010) The Lifetime Trajectory of Schizophrenia and the Concept of Neurodevelopment. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 12(3), 409-415
7. Andreasen, N., O’Leary, D., Cizadlo, T., Arndt, S., Rezaei, K., Ponto, L., Watkins, G., et al. (1996). Schizophrenia and cognitive dysmetria: a positron-emission tomography study of dysfunctional prefrontal-thalamic-cerebellar circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(18), 9985–9990.
8. Bancroft, A., & Levin, E. (2000). Ventral hippocampal  $\alpha 4\beta 2$  nicotinic receptors and chronic nicotine effects on memory. *Neuropharmacology*, 39(13), 2770-2778.
9. Barch, D., & Ceaser, A. (2012). Cognition in schizophrenia: core psychological and neural mechanisms. *Trends in Cognitive Sciences*, 16(1).

10. Becker, A., Grecksch, G., Bernstein, H., Höllt, V., & Bogerts, B. (1999). Social Behaviour in rats lesions with ibotenic acid in the hippocampus: quantitative and qualitative analysis. *Psychopharmacology*, *144*, 333-338
11. Benowitz, N., Hukkanen, J., & Jacob, P. (2009). Nicotine chemistry, metabolism, kinetics and biomarkers. *Handbook of experimental pharmacology*, (192), 29–60.
12. Berg, S., & Chambers, A. (2008). Accentuated Behavioral Sensitization to Nicotine in the Neonatal Ventral Hippocampal Lesion Model of Schizophrenia. *Neuropharmacology*, *54(8)*, 1201-1207.
13. Berg, S., Sentir, A., Bell, R., Engleman, E., & Chambers, R. (2014a). 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*.
14. Berg, S., Sentir, A., Cooley, B., Engleman, E., & Chambers, R. (2014b). 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.
15. Berman, J., Talmage, D., & Role, L. (2007). Cholinergic circuits and signaling in the pathophysiology of schizophrenia. *International review of neurobiology*, *78*, 193–223.
16. Bettany, J., & Levin, E. (2001). Ventral hippocampal  $\alpha 7$  nicotinic receptor blockade and chronic nicotine effects on memory performance in the radial-arm maze. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *70(4)*, 467-474.
17. Bob, P., Vlcek, P., & Raboch, J. (2014). Sensory disturbances, inhibitory deficits, and the P50 wave in schizophrenia. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *10*, 1309-1315.
18. Buckmaster, P. (2012). Mossy cell dendritic structure quantified and compared with other hippocampal neurons labeled in rats in vivo. *Epilepsia*, *53*, 9–17.
19. Chambers, A., Moore, J., McEvoy, J., & Levin, E. (1996). Cognitive Effects of Neonatal Hippocampal Lesions in Rat Model of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, *15(6)*, 587-594.

20. Conroy, S., Rodd, Z., & Chambers, R. (2007). Ethanol sensitization in a neurodevelopmental lesion model of Schizophrenia in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *86*(2), 386-394.
21. Dome, P., Lazary, J., Kalapos, M., & Rihmer, Z. (2010). Smoking, nicotine and neuropsychiatric disorders. *Neuroscience and biobehavioral reviews*, *34*(3), 295–342.
22. Dudchenko, P. (2004). An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *28*(7), 699-709.
23. Fatemi, S., Kroll, J., & Sary, J. (2001). Altered levels of Reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders. *NeuroReport*, *12*(15), 3209.
24. Felix, R., & Levin, E. (1997). Nicotinic antagonist administration into the ventral hippocampus and spatial working memory in rats. *Neuroscience*, *81*(4), 1009-1017.
25. Flores, G., Alquicer, G., Silva-Gómez, A., Zaldivar, G., Stewart, J., Quirion, R., & Srivastava, L. (2005). Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Neuroscience*, *133*(2), 463-470.
26. Franke, P., Maier, W., Hardt, T., Hain, C., & Cornblatt, C. (1994). Attentional Abilities and Measures of Schizotypy: Their Variation and Covariation in Schizophrenic Patients, Their Siblings, and Normal Control Subjects. *Psychiatry Research*, *54*, 259-272
27. Genis, A., & Lopez-Rubacava, C. (2011). ¿Es Posible Modelar Esquizofrenia en un modelo animal? *El Residente*, *7*(2), 120-126.
28. Grecksch, G., Bernstein, H., Becker, A., Höllt, V., & Bogerts, B. (1999). Disruption of Latent Inhibition in Rats with Postnatal Hippocampal Lesions. *Neuropsychopharmacology*, *20*(6), 525–532.
29. Hamm, A., Weike, A., & Schupp, H. (2001). The effect of neuroleptic medication on prepulse inhibition in schizophrenia patients: current status and future issues. *Psychopharmacology*, *156*(2-3), 259-265.
30. Heckers, S. (2001). Neuroimaging Studies of the Hippocampus in Schizophrenia. *Hippocampus*, *11*(2), 520–528.

31. Herold, C., Lässer, M., Schmid, L., Seidl, U., Kong, L., Fellhauer, I., Thomann, P., et al. (2015). Neuropsychology, Autobiographical Memory, and Hippocampal Volume in “Younger” and “Older” Patients with Chronic Schizophrenia. *Frontiers in Psychiatry*, 6, 1-16
32. Ho, B., Andreasen, N., Nopoulos, P., Arndt, S., Magnotta, V., Flaum, M. (2003) Progressive Structural Brain Abnormalities and Their Relationship to Clinical Outcome: A Longitudinal Magnetic Resonance Imaging Study Early in Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 60, 585-594
33. Holt, D., Herman, M., Hyde, T., Kleinman, J., Sinton, C., German, D., Hersh, L., et al. (1999). Evidence for a deficit in cholinergic interneurons in the striatum in schizophrenia. *Neuroscience*, 94(1), 21–31.
34. Howes, O., & Kapur, S. (2009). The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III—The Final Common Pathway. *Schizophrenia Bulletin*, 33(3), 549-562
35. Hyde, T., & Crook, J. (2001). Cholinergic systems and schizophrenia: primary pathology or epiphenomena? *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 22(1-2), 5363.
36. Jones, C., Watson, D., & Fone, K. (2011). Animal models of schizophrenia. *British journal of pharmacology*, 164(4), 1162–94.
37. Kalman, D., Morissette, S., & George, T. (2005). Co-Morbidity of Smoking in Patients with Psychiatric and Substance Use Disorders. *The American Journal of Addictions*, 14(2), 106-123.
38. Katsnelson, A. (2014). Drug development: The modelling challenge. *Nature*, 508(7494), S8S9.
39. Kawano, M., Sawada, K., Shimodera, S., Ogawa, Y., Kariya, S., Lang, D., Inoue, S., et al. (2015). Hippocampal Subfield Volumes in First Episode and Chronic Schizophrenia. *PLOS ONE*, 10(2), 1-14
40. Kumari, V., & Postma, P. (2005). Nicotine use in schizophrenia: The self medication hypotheses. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 29(6), 1021-1034.
41. Kuperber, G., & Heckers, S. (2000). Schizophrenia and Cognitive Function. *Curr Opin Neurobiol*, 10(2), 205-210

42. 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), 135-157.
43. Leonard, S., Mexal, S., & Freedman, R. (2007). Genetics of Smoking and Schizophrenia. *Journal of Dual Diagnosis*, 3(3-4), 43-59.
44. Leonard, S., Breese, C., Adams, C., Benhammou, K., Gault, J., Stevens, K., Lee, M, et al. (2000). Smoking and schizophrenia: abnormal nicotinic receptor expression. *European Journal of Pharmacology*; 393, 237-242
45. Levin, E. (2013). Complex relationships of nicotinic receptor actions and cognitive functions. *Biochemical pharmacology*, 86(8), 1145–52.
46. Levin, E., & Christopher, N. (2006). Effects of clozapine on memory function in the rat neonatal hippocampal lesion model of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 30(2), 223-229.
47. Levin, E., McClernon, F., & Rezvani, A. (2005). Nicotinic effects on cognitive function: behavioral characterization, pharmacological specification, and anatomic localization. *Psychopharmacology*, 184(3-4), 523-539.
48. Levin, E., Wilson, W., Rose, J., & McEvoy, J. (1996). Nicotine–Haloperidol Interactions and Cognitive Performance in Schizophrenics. *Neuropsychopharmacology*, 15(5), 429–436.
49. Lipska, B., & Weinberger, D. (2000). To Model a Psychiatric Disorder in Animals: Schizophrenia As a Reality Test. *Neuropsychopharmacology*, 23(3), 223–239
50. Lipska, B., & Weinberger, D. (2002). A neurodevelopmental model of schizophrenia: Neonatal disconnection of the hippocampus. *Neurotoxicity Research*, 4(5-6), 469-475.
51. 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

52. Lodge, D., & Grace, A. (2009). Gestational methylazoxymethanol acetate administration: a developmental disruption model of schizophrenia. *Behavioural brain research, 204*(2), 306–12.
53. Martin, L., & Freedman, R. (2007). Schizophrenia and the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *International review of neurobiology, 78*, 225–46.
54. 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.
55. Morrison, A., Conway, A., & Chein, J. (2014). Primacy and recency effects as indices of the focus of attention. *Frontiers in Human Neuroscience, 8*.
56. Mueser, K., & McGurk, S. (2004). Schizophrenia. *The Lancet, 363*(9426), 2063-2072.
57. O'Carroll, R. (2000). Cognitive impairment in schizophrenia. *Advances in Psychiatric Treatment, 6*(3), 161-168.
58. O'Donnell, P. (2012). Cortical disinhibition in the neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia: new vistas on possible therapeutic approaches. *Pharmacology & therapeutics, 133*(1), 19–25.
59. Olincy, A., & Stevens, K. (2007). Treating schizophrenia symptoms with an  $\alpha 7$  nicotinic agonist, from mice to men. *Biochemical Pharmacology, 74*(8), 1192-1201.
60. Olton, D. (1987). The Radial Arm Maze as a Tool in Behavioral Pharmacology. *Physiology & Behavior, 40*, 793-797.
61. Olton, D., & Samuelson, R. (1976) Remembrance of Places Passed: Spatial Memory in Rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes, 2*(2), 97-116.
62. OMS. Schizophrenia and public health. Geneva, Organización Mundial de la Salud, 1998. Recuperado de: [http://www.who.int/mental\\_health/media/en/55.pdf](http://www.who.int/mental_health/media/en/55.pdf)
63. OMS. Schizophrenia, Organización Mundial de la Salud, 2015. Recuperado de: [http://www.who.int/mental\\_health/management/schizophrenia/en/](http://www.who.int/mental_health/management/schizophrenia/en/)
64. Pantelis, C., Yücel, M., Wood, P., McGorry, P & Velakoulis, D. (2003) Early and Late Neurodevelopmental Disturbances in Schizophrenia and Their Functional Consequences. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry, 37*, 399-406

65. Picciotto, M., Higley, M., & Mineur, Y. (2012). Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior. *Neuron*, *76*(1), 116–29.
66. Placek, K., Dippel, W., Jones, S., & Brady, A. (2013). Impairments in set-shifting but not reversal learning in the neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia: Further evidence for medial prefrontal deficits. *Behavioural Brain Research*, *256*, 405413.
67. Rapoport, J., Addington, A., Frangou, S., & Psych, M. (2005). The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005. *Molecular Psychiatry*, *10*(5), 434–449.
68. Rapoport, J., Giedd, J., & Gogtay, N. (2012). Neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2012. *Molecular psychiatry*, *17*(12), 1228–38
69. Ratajczak, P., Wozniak, A., & Nowakowska, E. (2013). Animal models of schizophrenia: developmental preparation in rats. *Acta neurobiologiae experimentalis*, *73*(4), 472–84.
70. Readler, T., & Freedman, R. (2009). Cholinergic Mechanisms in Schizophrenia, 17-38. En *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Schizophrenia* (pp1-545). New York: Springer.
71. Reichenberg, A. (2010). The assessment of neuropsychological functioning in schizophrenia. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *12*(3), 383-392.
72. Reynolds, G. (2008). The Neurochemistry of Schizophrenia. *Psychiatry*, *7*(10), 425-429.
73. 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), 724734.
74. 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.
75. Rund, B., Landro, N., Orbeck, A. (1997). Stability in Cognitive Dysfunctions in Schizophrenic Patients. *Psychiatry Research*, *69*, 131-141

76. Ryan, R., Bhardwaj, S., Tse, Y., Srivastava, L., & Wong, T. (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.
77. Sacco, K., Bannon, K., & George, P. (2004). Nicotinic receptors mechanism and cognition in normal states and neuropsychiatric disorders. *J Psychopharmacology*, 18(4), 457-474.
78. Sacco, K., Termine, A., Seyal, A., Dudas, M., Vessicchio, J., Krishnan-Sarin, S., Jatlow, P., et al. (2005). Effects of Cigarette Smoking on Spatial Working Memory and Attentional Deficits in Schizophrenia: Involvement of Nicotinic Receptor Mechanisms. *Archives of General Psychiatry*, 62(6), 649–659.
79. Sanders, R., Scheupbach, D., Goldstein, G., Haas, G., Sweeney, J., & Keshavan, M. (2004). Relationships Between Cognitive and Neurological Performance in Neuroleptic-Naïve Psychosis. *Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 16(4), 480-487
80. Sandner, G., Angst, M.-J., Guiberteau, T., Guignard, B., & Brasse, D. (2010). MRI and X-ray scanning images of the brain of 3-, 6- and 9-month-old rats with bilateral neonatal ventral hippocampus lesions. *NeuroImage*, 53(1), 44–50.
81. Sarter, M., Nelson, C., & Bruno, J. (2005). Cortical Cholinergic Transmission and Cortical Information Processing in Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 31(1), 117–138.
82. Sawa, A., & Snyder, S. (2002). Schizophrenia: Diverse Approaches to a Complex Disease. *Science*, 296(5568), 692-695.
83. Schizophrenia Research Forum. Animal Models for Schizophrenia Research, 2014. Recuperado de: <http://schizophreniaforum.org/res/models/default.asp>
84. Seeman, P. (1987). Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse*, 1(2), 133–152
85. Sharma, T., & Antonova, L. (2003). Cognitive function in schizophrenia. Deficits, functional consequences, and future treatment. *The Psychiatric clinics of North America*, 26(1), 25–40.

86. Snitz, B., MacDonald, A., & Carter, C. (2006). Cognitive Deficits in Unaffected First-Degree Relatives of Schizophrenia Patients: A Meta-analytic Review of Putative Endophenotypes. *Schizophrenia Bulletin*, 32(1), 179–194.
87. Stephane, M., Ince, N., Kuskowski, M., Leuthold, A., Tewfik, A., Nelson, K., McClannahan, K., et al. (2010). Neural oscillations associated with the primacy and recency effects of verbal working memory. *Neuroscience letters*, 473(3), 172–7.
88. 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.
89. Swan, G., & Lessov-Schlaggar, C. (2007). The Effects of Tobacco Smoke and Nicotine on Cognition and the Brain. *Neuropsychology Review*.
90. Tamminga, C., Stan, A., & Wagner, A. (2010). The Hippocampal Formation in Schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 167(10), 1178-1193.
91. Tandon, R., Nasrallah, H., & Keshavan, M. (2009). Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophrenia Research*, 110.
92. Todd, J., Harms, L., Schall, U., & Michie, P. (2013). Mismatch Negativity: Translating the Potential. *Frontiers in Psychiatry*, 4, 1-22.
93. Tseng, K., Chambers, R., & Lipska, B. (2009). The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. *Behavioural brain research*, 204(2), 295–305.
94. Weinberger, D. (1996). On The Plausibility of “The Neurodevelopmental Hypothesis” of Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 14(3), 1-11.
95. Wong, A., & Tol, H. (2003). Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(3), 269-306.
96. Wonnacott, S. (2014) Nicotinic ACh Receptors. *Tocris Scientific Review Series*. 1-32
97. Young-Pearse, T., Suth, S., Luth, E., Sawa, A., & Selkoe, D. (2010). Biochemical and Functional Interaction of Disrupted-in-Schizophrenia 1 and Amyloid Precursor Protein Regulates Neuronal Migration during Mammalian Cortical Development. *The Journal of Neuroscience*, 30(31), 10431–10440.

98. Yu, D., Marchetto, M., & Gage, F. (2014). How to make a hippocampal dentate gyrus granule neuron. *Development*, *141*(12), 2366–2375.