



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

ACTIVACIÓN INMUNE MATERNAL Y SU EFECTO EN LA MEMORIA SOCIAL Y
ESPACIAL

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO(A) EN CIENCIAS

PRESENTA:
ZYANYA GLORIA MENA CASAS

DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

DRA. MARÍA DE LA LUZ TORNER AGUILAR
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, DIVISIÓN DE NEUROCIENCIAS
MORELOS, MICHOACÁN

DR. OCTAVIO CÉSAR GARCÍA GONZÁLEZ
FACULTAD DE PSICOLOGÍA, UNAM

SANTIAGO DE QUERÉTARO, DICIEMBRE 2020



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.

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

Los miembros del Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Zyanya Gloria Mena Casas, cuyo título es: “Activación inmune maternal y su efecto en la memoria social y espacial” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Presidente Dr. Roberto Agustín Prado Alcalá

Secretario (Tutor) Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda

Vocal Dr. Gustavo Pacheco López

Suplente Dra. Ma. de la Luz Torner Aguilar

Suplente: Dra. Isabel Cristina Méndez Hernández

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Marisela Luna Muñoz
Coordinadora del Programa

RESUMEN

Derivado de la relación entre infecciones prenatales y el desarrollo de enfermedades psiquiátricas, se ha propuesto el modelo de activación inmune maternal (AIM) en ratones para investigar las alteraciones en el desarrollo neuronal y la sinapsis, encontradas en estudios *post mortem* de pacientes con esquizofrenia, así como la disminución del volumen del hipocampo. En los modelos animales para el estudio de la esquizofrenia se han encontrado cambios en la inhibición sináptica del CA2 del hipocampo, región que se relaciona con la memoria social. Sin embargo, en los modelos de AIM son pocos y contradictorios los estudios centrados en la memoria de tipo social y espacial. Por otra parte, el tratamiento prenatal con el inmunógeno Poly I: C (como simulador de infección viral) representa un modelo ideal de desarrollo ambiental para esquizofrenia. En este estudio, se infectó a hembras gestantes de la cepa C57BL/6 con Poly I:C (5 mg/kg) i.v. en el día de gestación 12.5 (G12.5) y se analizó, en las crías macho de esas madres, la conducta repetitiva de enterramiento de objetos, la memoria espacial, interacción y memoria social en ratones de entre 3 y 4 meses (edad equivalente a la adulta en humano). Los resultados indican que el modelo AIM presenta alteraciones en la memoria social, más no en la espacial, así como en la conducta estereotipada, mismas que pueden verse alteradas en pacientes con esquizofrenia. Faltaría dilucidar en este modelo la relación con la pérdida de los contactos sinápticos en hipocampo y en corteza cerebral.

ABSTRACT

Derived from the relationship between prenatal infections and the development of psychiatric diseases, the maternal immune activation model (AIM) has been proposed in mice to investigate alterations in neuronal development and synapses, found in post-mortem studies, of patients with schizophrenia, as well as decreased hippocampal volume. Animal models for the study of schizophrenia have found changes in synaptic inhibition of CA2 in the hippocampus, a region that is related to social memory. However, studies focused on social and spatial memory are few and contradictory in AIM models. On the other hand, prenatal treatment with the Poly I: C immunogen (as a viral infection simulator) represents an ideal model of environmental development for schizophrenia. In this study, pregnant females of the C57BL/6 strain were infected with Poly I:C (5 mg/kg) i.v. on the day of gestation 12.5 (G12.5) and the repetitive burial behavior of objects, spatial memory, interaction and social memory in mice between 3 and 4 months (age equivalent to adult in humans) were analyzed in the male offspring of these mothers. The results indicate that the AIM model has alterations in social memory, but not spatial memory, as well as stereotyped behavior, which may be altered in patients with schizophrenia. The relationship with the loss of the contacts in the hippocampus and in the cerebral cortex remains to be elucidated in this model.

AGRADECIMIENTOS

A:

Donativos: CONACyT CB-255399, DGAPA, PAPIIT IN-204519

Apoyo en Bioterio:

MVZ José Martín García Servín y Dra. Alejandra Castilla León, Dra. María A. Carbajo Mata

Apoyo en todo el seguimiento y trámites realizados en la Unidad de Enseñanza:

Dra. Nuri Aranda López

Apoyo en las videoconferencias y enlaces en exámenes y clases:

Lic. Ma. Lourdes Lara Ayala

Y al:

Apoyo técnico-académico del laboratorio C02:

M. en C. Azucena Ruth Aguilar Vázquez

Agradecimientos personales:

-A mi familia, primeramente, por su apoyo y soporte en todo el proceso.

-A todo el laboratorio C-02, pero en especial a la Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda, al M. en C. Isaac Vargas Rodríguez y a la Dra. Paola Cristina Bello Median por su asesoramiento y guía durante todo el proceso. Gracias por creer en mí.

-A mis compañeros de generación Carlos y Francisca por su amistad y motivación a lo largo de la maestría.

-Nuevamente a Isaac Vargas por su amistad y ayuda con todas mis dudas, que fueron muchas.

-A Paola y Alexander que se incorporaron al laboratorio después, pero que me apoyaron y creyeron en mí. En especial me da gusto que Alexander pueda continuar con el modelo y que próximamente pueda publicar al respecto.

-A mis amigas Erika y Laura que estuvieron conmigo desde que llegué al laboratorio y que me enseñaron mucho.

-Y, finalmente, agradezco el apoyo de mi pareja Alfonso por su amor y acompañamiento en este proceso que no ha sido fácil.

| | |
|--|-----|
| ÍNDICE | |
| RESUMEN..... | ii |
| ABSTRACT | iii |
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| ANTECEDENTES | 2 |
| La esquizofrenia | 2 |
| La Formación Hipocampal (FM) | 4 |
| Tipos de memoria y memoria espacial | 10 |
| Poly I:C (ácido poliinosínico-policitídílico) | 12 |
| Activación inmune maternal (AIM) | 14 |
| JUSTIFICACIÓN | 19 |
| HIPÓTESIS | 19 |
| OBJETIVOS | 19 |
| Objetivo General | 19 |
| Objetivos Específicos..... | 20 |
| METODOLOGÍA..... | 20 |
| <i>Sujetos experimentales</i> | 20 |
| <i>Administración del inmunógeno: ácido poliinosínico- policitídílico (Poly I:C)</i> | 21 |
| <i>Bioactividad del Poly I:C</i> | 22 |
| <i>Pruebas conductuales</i> | 22 |
| <i>Prueba de enterramiento de canicas (EC)</i> | 22 |
| <i>Laberinto en “Y”</i> | 23 |
| <i>Prueba de Interacción y memoria social</i> | 24 |
| RESULTADOS | 25 |
| Bioactividad del Poly I:C | 25 |
| Prueba de enterramiento de canicas (EC) | 26 |
| Memoria espacial en el laberinto en “Y” | 27 |
| Prueba de Interacción Social | 29 |
| Prueba de Memoria social | 30 |
| DISCUSIÓN..... | 32 |
| CONCLUSIONES..... | 37 |

| | |
|---|----|
| REFERENCIAS | 37 |
| ÍNDICE DE FIGURAS | 44 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 44 |
| ANEXOS..... | 45 |
| Procedimiento Estándar Operativo (SOP)..... | 45 |
| I. PRUEBA CONDUCTUAL DE ENTERRAMIENTO DE CANICAS | 45 |
| II. PRUEBA DE LABERINTO EN “Y” | 48 |
| III. PRUEBA DE INTERACCIÓN Y MEMORIA SOCIAL | 51 |

INTRODUCCIÓN

La hipótesis del desarrollo neurológico de la esquizofrenia debido a la exposición prenatal a infecciones sugiere que ésta es capaz de desencadenar desórdenes psiquiátricos en edades adultas de modelos animales (Meyer et al., 2011). En el modelo en ratones de la activación inmune maternal (AIM, o MIA por sus siglas en inglés), se reproducen varios de los síntomas observados en patologías como esquizofrenia, desórdenes bipolares y autismo (Scola y Duong, 2017), y un reto inmunológico prenatal es suficiente para desencadenar los síntomas (Meyer et al., 2005).

La esquizofrenia es un trastorno mental grave que afecta a 21 millones de personas en el mundo, y se caracteriza por síntomas denominados positivos, negativos y de dominancia cognitiva (Moyer et al., 2015; Organización Mundial de la Salud, 2019). Las estructuras cerebrales afectadas en el humano y en el modelo animal, son la corteza cerebral, el cerebelo y el hipocampo (Pineda et al., 2013; Hill et al., 2014;). En estudios del cerebro *post mortem*, se han encontrado reducciones del volumen cerebral y en el hipocampo (Knable et al., 2004), reducciones de las ramas dendríticas de las neuronas positivas a la parvalbúmina (PV+) (Nelson et al., 1998; Glausier y Lewis, 2013). Además, en el *Cornus ammonis 2* (CA2) se reportó disminución de las espinas dendríticas (Law et al., 2004), que se asocian *in vivo* a cambios en la inhibición sináptica del CA2 del hipocampo, el cual ha sido asociado con la memoria social (Hitti y Siegelbaum, 2014) en modelos animales. Por otra parte, se ha visto que cuando existen retos inmunológicos tardíos (gestacional 17 o G17) en la gestación se desarrollan afecciones en la memoria de reconocimiento espacial en ratones, situación no reproducible en retos tempranos (G9) (Meyer et al., 2005, Meyer et al., 2006). Con base en lo anterior, se propone en el modelo AIM tratado con el inmunógeno Poly I:C (ácido poliinosínico-policitidílico) durante el día gestacional 12.5 (G12.5), evaluar los cambios en la memoria social y espacial, que se han visto afectadas en trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia.

ANTECEDENTES

La esquizofrenia

La esquizofrenia es una enfermedad crónica que afecta aproximadamente al 0.5-1% (21 millones de personas según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2019) de la población mundial, cuyos síntomas que lo caracterizan son de dominio positivos, negativos y cognitivos. Los síntomas referidos como positivos son añadidos a la enfermedad, mientras que los negativos se refieren a los que faltan en el paciente, pero que usualmente están en las personas sanas. Algunos síntomas positivos encontrados en pacientes con esquizofrenia son los psicóticos, como alucinaciones y conductas repetitivas. Dentro de los negativos se encuentran la ausencia o disminución de algunos comportamientos normales como el habla, la motivación, el placer y la expresión de emociones. Los de dominio cognitivo incluyen deficiencias en el rendimiento de la memoria, la función ejecutiva, la atención, el lenguaje, capacidad de lectura y cognición social deteriorada (OMS, 2019, Correll y Schooler, 2020). La esquizofrenia es altamente heredable (25-33% de los casos) y presentan algunos síntomas compartidos con otros trastornos como el comportamiento agresivo, ansiedad social, baja flexibilidad cognitiva, déficits de comunicación, diferencias perceptuales y daño en funciones sociales (Prata et al., 2017). Los pacientes que cursan con este trastorno tienen mayor riesgo (hasta 3 veces mayor) de morir a edades tempranas (por apneas del sueño y suicidio, entre otros).

Estudios *post mortem* demuestran alteraciones morfológicas como disminución del peso encefálico, dilatación del tercer ventrículo y ventrículos laterales, atrofia cortical y de los núcleos basales, alteraciones del sistema límbico y reducción de los lóbulos temporal y frontal (Ferrero et al., 2004). Se ha reportado reducción en el volumen de la sustancia gris cortical, siendo más marcada en aquellos que tienen una alta expresión de citocinas proinflamatorias (Zhang et al., 2016). La reducción cortical se podría atribuir a la disminución en la densidad dendrítica, más marcada en la capa 3 de la corteza, lo que ocurre de manera progresiva durante la patología por lo que es posible establecer relaciones entre cambios estructurales y el curso de la enfermedad (Glausier y Lewis, 2013; Moyer et al., 2015; Dietsche, Kircher y Falkenberg, 2017). Uno de los hallazgos *post mortem* consistentes en pacientes con esquizofrenia, es la menor expresión de la isoforma de 67 kDa del ácido glutámico decarboxilasa (GAD67), una enzima clave en la

biosíntesis de ácido gamma-aminobutírico (GABA), así como niveles de GABA reducidos en múltiples regiones cerebrales como el núcleo accumbens, tálamo, amígdala e hipocampo (Orthan et al., 2017). Estudios diversos demuestran que la pérdida de espinas dendríticas en la esquizofrenia presenta un comportamiento a lo largo del tiempo como se muestra en la figura 1 (Coley y Gao, 2018), mientras que estudios paralelos sugieren la participación tanto de microglía como de los astrocitos como causantes de la excesiva poda de espinas (Mallya y Deutch, 2018).

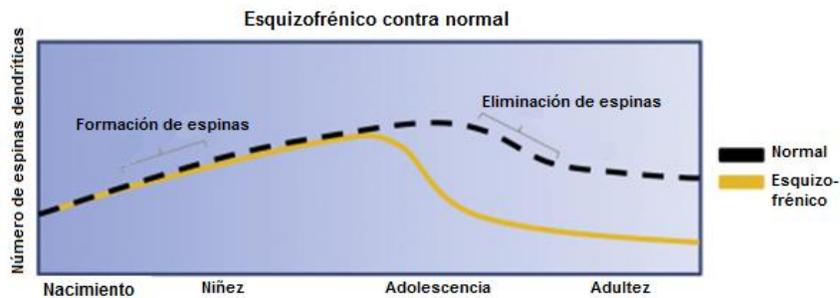


Figura 1. Cambios en espinas dendríticas en esquizofrenia (arriba) y autismo (abajo) (modificado de Coley y Gao, 2017).

La psicosis es un síntoma central en la esquizofrenia y aparece en la adolescencia temprana. Sin embargo, metaanálisis demuestran funciones cognitivas reducidas antes de la adolescencia (Woodberry et al., 2008), incluso existen datos de deficiencia cognitiva a la edad de 4 y 7 años (Agnew-Blais et al., 2015). Estos datos son relevantes, ya que tratamiento mejor dirigido a etapas tempranas podría aminorar el daño. De forma generalizada, se puede observar que los déficits cognitivos, así como la disfunción social y los síntomas negativos empiezan antes de los episodios psicóticos, que es cuando por lo general se diagnostica la esquizofrenia. Algunos de estos síntomas coinciden con procesos bioquímicos anormales, como detalla la figura 2 (Sommer et al., 2016). Lo anterior implica que el diagnóstico temprano de trastornos psiquiátricos pueda detectarse precozmente, algo que sería interesante investigar en modelos animales para dichas patologías. En cuanto a los mecanismos subyacentes a los síntomas, se hipotetiza en la figura 2b la relación del desarrollo de la deficiencia cognitiva con el funcionamiento de los receptores de ácido N-metil-D-aspartico (NMDAr), la expresión de ácido γ -aminobutírico GABA y el balance redox, por lo que anomalías en dichos mecanismos pudieran estar disminuyendo la función cognitiva. Los síntomas negativos, por su parte, parecen

relacionarse a la neuroinflamación y al funcionamiento del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) y, los episodios psicóticos, con problemas en la síntesis de dopamina (Sommer et al., 2016).

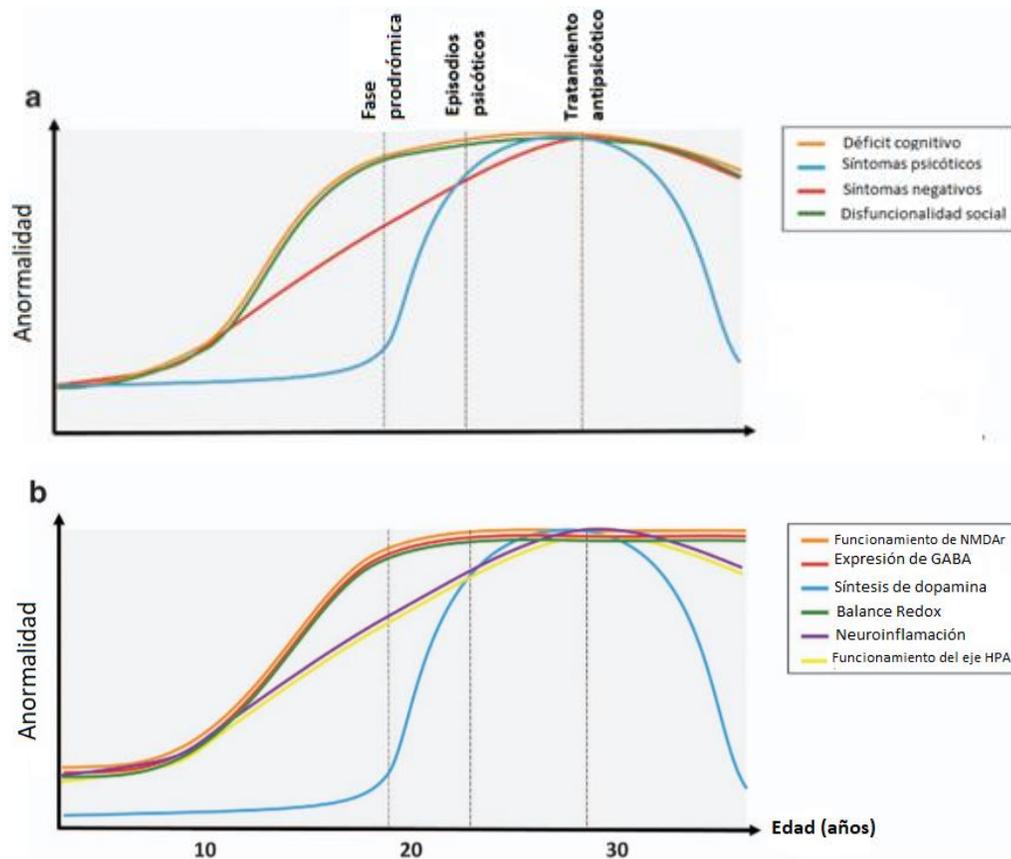


Figura 2. Hipótesis del curso de la esquizofrenia, a) curso clínico del trastorno, b) curso hipotetizado de los mecanismos moleculares subyacentes. Receptores de ácido N-metil-D-aspartico (NMDAr), ácido γ -aminobutírico (GABA), Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA). (modificado de Sommer et al., 2016).

La Formación Hipocampal (FM)

La FH, forma parte del sistema límbico cerebral y se ha relacionado con la formación de memorias episódicas. En su anatomía se distinguen dos regiones: el *Cornus Ammonis* (CA) o hipocampo y el giro dentado (GD). El hipocampo, se subdivide en 3 subregiones (CA1, CA2 y CA3), formadas por diferentes capas (o estratos) dadas por la organización en la arborización dendrítica: *stratum oriens* (SO), *stratum pyramidale* (SP), *stratum radiatum* (SR) y *stratum lacunosum moleculare* (SLM) (Kauselmann et al., 1999, figura 3A y 4A).

Se demostró que la inactivación de neuronas piramidales de CA2 genera pérdida en la memoria social (Hitti y Siegelbaum, 2014). Por otra parte, animales lesionados en el CA2, presentaron disfunción en la memoria social (Stevenson y Caldwell, 2014). En el 2016, se analizaron las alteraciones en el CA2, dependiente de la edad, en un modelo murino transgénico. Dentro de éstas, se destacan un decremento en la densidad de interneuronas parvalbúmina positivas (PV+) y cambios en las propiedades de neuronas piramidales de CA2, como se observa en la figura 3B (Piskorowski et al., 2016).

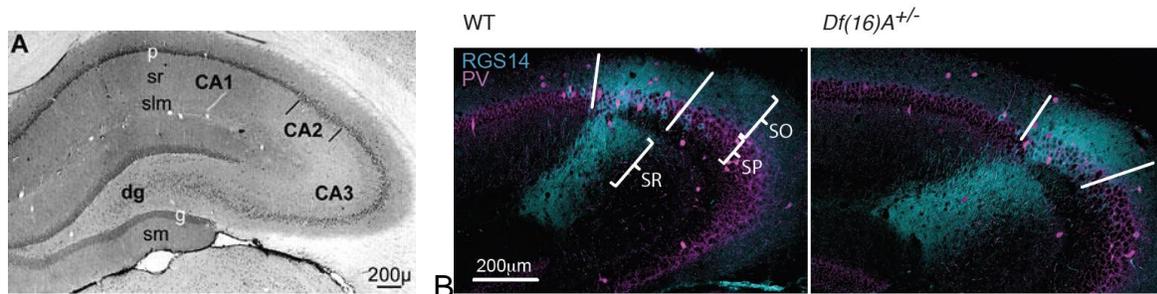


Figura 3 Formación hipocampal. A. Hipocampo de ratón y sus regiones (Kauselmann et al., 1999). B. Inmunohistoquímica en cerebro del modelo murino del síndrome de delección 22q11.2, para esquizofrenia. Presenta una reducción de las neuronas inhibitoras (magenta) en la región CA2 del hipocampo (cyan). (modificado de Piskorowski et al., 2016).

En la figura 5 se observan las entradas corticales (arriba a la derecha) que expresan una potencialización a largo plazo (LTP, por sus siglas en inglés) después de la estimulación tetánica (que es 100 pulsos a 100 Hz, repetido dos veces). Esta LTP es dependiente de los receptores NMDA y se demostró que aumentaba la activación de potencial de acción de neuronas piramidales del CA2 en respuesta a la estimulación de entrada cortical. Las entradas excitadoras del CA3 no expresan LTP siguiendo la estimulación tetánica o un protocolo de apareamiento (“pairing protocol”, estimulación de entradas del CA3 acopladas a la despolarización de la neurona piramidal). La falta de LTP posiblemente resulta de una extrusión eficiente de Ca^{2+} de la dendrítica apical, así como de la alta expresión de RGS14, un regulador de la proteína G molécula que previene la inducción de LTP. Las entradas inhibitorias de interneuronas PV+ expresan una depresión de esta potencialización a largo plazo (iLTD) después de la estimulación tetánica (estimulación a 10 Hz por 100 pulsos dos veces), la estimulación de estallido theta (TBS) o una estimulación de apareamiento de entradas corticales y de CA3 por las colaterales de Schaffer (EC/SC). Esta LTD resulta de la activación de receptores opioides

Delta (DOR) que actúan de manera presináptica, reduciendo el flujo de Ca^{2+} para disminuir la liberación de GABA. Esta plasticidad puede ser evocada por estimulación, ya sea de entradas del CA3 o entradas corticales, y no está restringido espacialmente ya que afecta la transmisión inhibitoria tanto proximal como distal. Además, esta plasticidad resulta en un incremento en la tasa de disparo desde neuronas piramidales (Robert et al., 2017).

Debido a la conectividad singular presente en la región del CA2, varios grupos de investigadores la han propuesto como un conector entre la actividad emocional cerebral y una mayor función cognitiva. Las neuronas piramidales del CA2 reciben entradas glutamatergicas del GD, del CA3, de la corteza entorrinal, del septum medial/banda diagonal de Broca, del núcleo supramamilar, del núcleo del Rafe medial, de la amígdala, y del núcleo paraventricular hipotalámico. A su vez, envía proyecciones al CA1 y al CA3, así como al septum a la medial/banda diagonal de Broca y al núcleo supramamilar (figuras 4A y 4B) (Chevaleyre y Piskorowski, 2016).

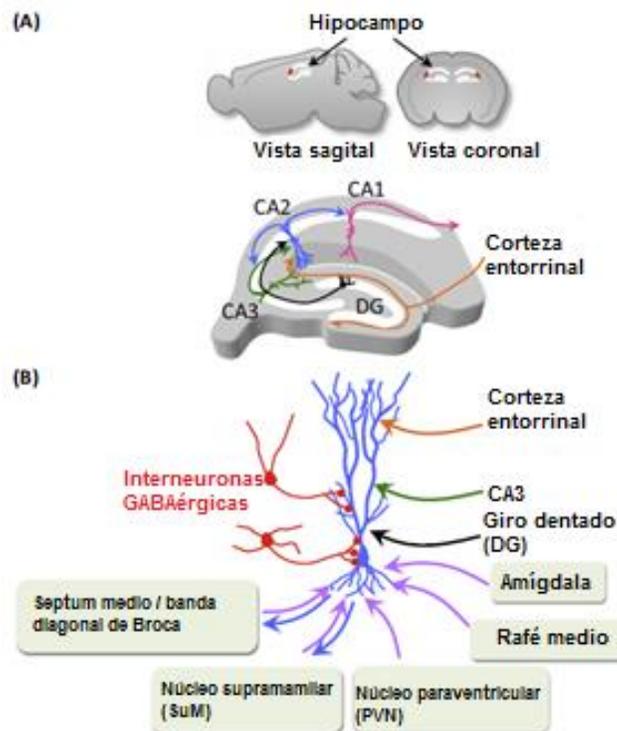


Figura 4. Formación hipocámpica. Esquema de la vista coronal y sagital de hipocampo en cerebro de ratón. Eferencia de CA2 a CA1 y CA3 en azul, aferencias de giro dentado (DG) en negro, aferencia de CA3 en verde, eferencia de CA1 a corteza en rosa y aferencia de corteza entorrinal en café. B) Aferencias y eferencias de las neuronas en CA2. Interneuronas en rojo, neurona de CA2 en azul, aferencias extra hipocámpicas en morado, eferencias extra hipocámpicas en azul, aferencias de giro dentado (DG) en

negro, aferencia de CA3 en verde y aferencia de corteza entorrinal en café (Modificado de Cheveleyre y Piskorowski, 2016).

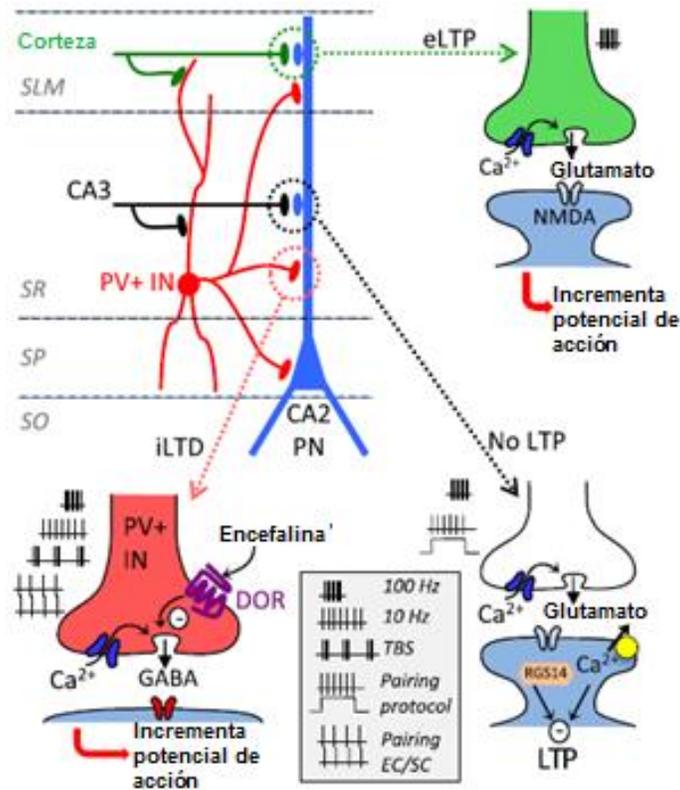


Figura 5. Diferentes tipos de plasticidad sináptica, de una neurona piramidal CA2 (azul), una interneurona que expresa parvalbúmina (PV, rojo) y entradas excitadoras de CA3 (negro) o de la corteza entorrinal (verde). Estimulación de ráfaga theta (TBS), receptores opioides Delta (DOR), *stratum luacunosum moleculare* (SLM), *stratum radiatum* (SR), *stratum pyramidale* (SP), *stratum oriens* (SO), potenciación a largo plazo (LTP), (modificado de Robert et al., 2017)

Algunas de las propiedades importantes de CA2, es que expresa numerosos receptores a neuromoduladores con relación a otras áreas, lo que la convierte en una región con plasticidad sináptica muy particular. Algunos de estos receptores incluyen receptores para opioides, para vasopresina, para oxitocina, para estrógenos, para corticoides y para sustancia P. Aunado a lo anterior, la composición celular muestra alta densidad de diferentes clases de interneuronas, como las que expresan: parvalbúmina, reelina, calbidina y calretinina, y altos niveles del receptor para vasopresina 1b (V1bR) de hipocampo dorsal (Cheveleyre y Piskorowski, 2016).

Numerosos marcadores para esta región han sido identificados, tales como: proteína α -actinin 2 (ACTN2), proteína de células de Purkinje 4 (PCP4 o PEP19), proteína

enriquecida-tirosina fosfatasa del estriado (STEP o PTPN5) y regulador de señalamiento de proteína G 14 (RGS14). Esta última ha sido de las más usadas (Dudek et al., 2016).

La formación y recuperación de la memoria episódica requiere un procesamiento preciso de la información por parte de la red corteza entorrinal-hipocampo. Durante varias décadas, el circuito intrasináptico (capa II de corteza entorrinal (CEII) → GD → CA3 → CA1) y el circuito monosináptico (CEIII → CA1) se han considerado los principales sustratos de la red responsable del aprendizaje y la memoria. Recientemente, se han considerado los circuitos vinculados a la otra región del hipocampo, CA2, utilizando técnicas de optogenética (altamente específica para el tipo de célula) y registros “*patch clamp*”. Se demostró que las células del GD (que no se creía que no se proyectan a CA2) envían entradas funcionales monosinápticas a las células piramidales de CA2, a través de abundantes proyecciones longitudinales (Kohara et al., 2014). Entonces, CA2 inerva CA1 para completar un circuito intrasináptico alternativo, pero a diferencia de CA3, se proyecta a la subcapa profunda en el *stratum oriens*, en lugar de la superficial del CA1. Además, y contrariamente a los conocimientos actuales, las proyecciones de CEII no proyecta a CA2 (Kohara et al., 2014).

Estudios más recientes, en cuanto a la morfología, sugieren que las neuronas en CA2 responden a entradas excitatorias en el SLM debido a las diferencias en la morfología. Derivado de esto, se distinguieron 4 tipos de neuronas (Ma, Mb y Mc de monoapicales, y B de biapicales), replicando estudios anteriores realizados en el cerdo de guinea (figura 6A). Estas diferencias morfológicas se distinguen de las neuronas aledañas de CA1 y CA3 (figura 6B) y podrían indicar diferencias funcionales, mismas que se deberán tomar en cuenta para los diseños experimentales (Helton et al., 2018).

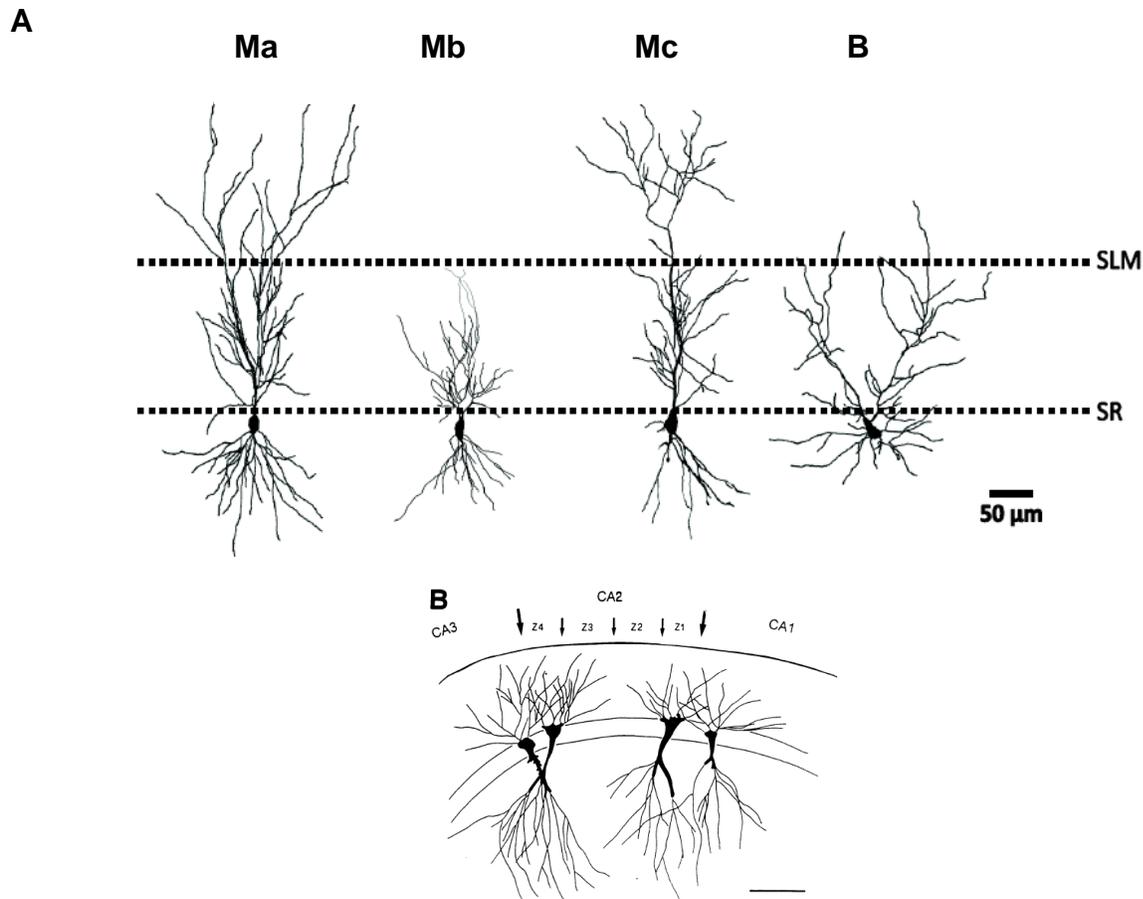


Figura 6. Tipos de neuronas encontradas en CA2. A) De izquierda a derecha: Ma-like, Mb-like, Mc-like, B-like (Helton et al., 2018). B) Diferencias morfológicas entre neuronas de CA3, CA2 y CA1. Nótese las excresencias espinosas en CA3 (modificado de Bartesaghi y Ravasi, 1999).

Mediante técnicas optogenéticas, electrofisiológicas y conductuales, se demostró que la región del CA1 ventral era necesario y suficiente para almacenar la memoria social (Okuyama et al., 2016). Considerando esto y los otros hallazgos en CA2 antes citados, se propuso un modelo de la vía del engrama social en roedores, en el que la información sensorial entra del órgano vomeronasal/epitelio olfatorio medio (MOE/VNO), pasa por el CA2 dorsal (dCA2), va a CA1 ventral (vCA1) y de ahí a la coraza del núcleo *accumbens* (NAc Shell) para registrar la familiaridad (figura 7) (Okuyama, 2018).

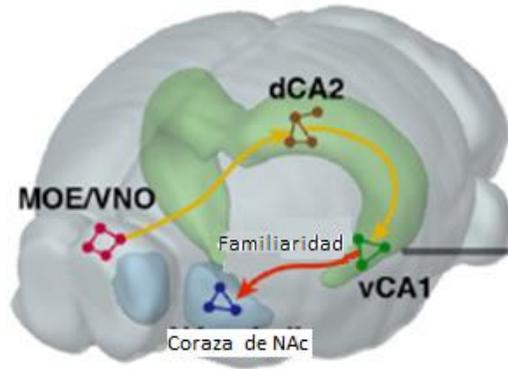


Figura 7. Engrama de la memoria social. Órgano vomeronasal/epitelio olfatorio medio (MOE/VNO), CA2 dorsal (dCA2), CA1 ventral (vCA1), coraza del núcleo *accumbens* (NAc Shell) (modificado de Okuyama, 2018)

Tipos de memoria y memoria espacial

La memoria puede ser definida como la capacidad de codificar, almacenar y recuperar información. Por otra parte, el aprendizaje se puede definir como cambio en la conducta de un organismo que resulta de regulaciones en el entorno del organismo (De Houwer, Barnes-Holmes y Moors, 2013). Aunque la neurociencia ha atribuido el proceso cognitivo en su mayoría a procesos neuroquímicos, los avances tecnológicos nos demuestran que la cognición se extiende a otras partes fuera del cerebro, abriendo así la puerta a nuevos paradigmas que nos llevan a un entender a la mente como algo dinámico (Zlotnik y Vansintjan 2019). Existen tres tipos de memoria: sensorial, de corto plazo y de largo plazo. La primera se relaciona a los receptores sensoriales y tiene grandes capacidades y dura hasta que la información es transmitida más allá, proceso conocido como memoria a corto plazo. Estas primeras dos son de duración corta y son limitadas, a diferencia de la tercera que es de largo tiempo y tiene capacidades ilimitadas con posibilidades de perdurar a lo largo de la vida del individuo. A partir de aquí, podemos reconocer dos grandes divisiones en la memoria de largo plazo conocidas como memoria declarativa y no declarativa (o explícita e implícita para otros autores), que a su vez se subdividen en otras clases y de las cuales se han definido las estructuras involucradas (figura 8). En el caso de la memoria espacial, el hipocampo es crucial para su formación, ya que la resección de los lóbulos temporales mediales en un paciente provocó un cuadro profundo de amnesia anterógrada, por lo que daños en dicha estructura generan problemas para la ubicación espacial del individuo (Marrón et al., 2013).

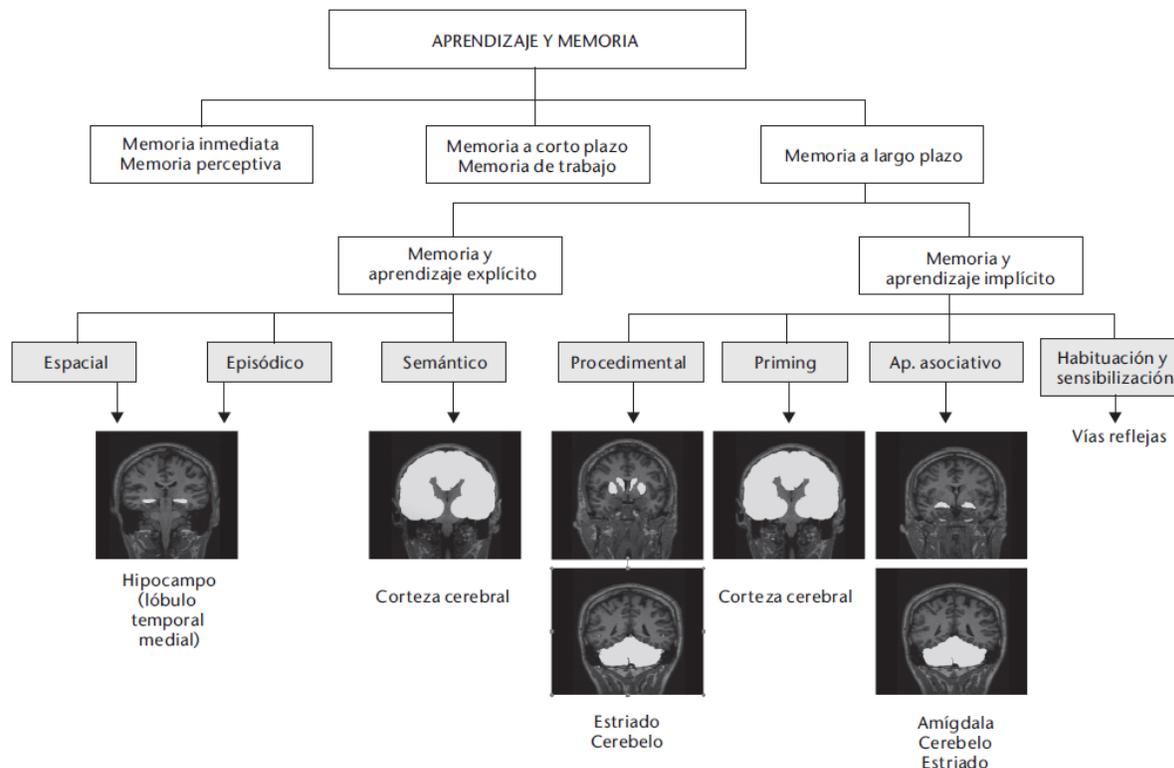


Figura 8. División de los tipos de memoria y las regiones cerebrales involucradas en cada una de ellas. Aprendizaje asociativo (Ap. asociativo) (Marrón et al., 2013).

Es preciso mencionar que para poder ser evaluada en los modelos animales que existen se han diseñado pruebas conductuales que nos permiten percibir cambios en la conducta que atribuimos al aprendizaje. Una de esas pruebas es el laberinto en “Y”, que es usado para evaluar la memoria de referencia espacial de corto plazo en ratones. Cuando un ratón no muestra preferencia por un brazo que es novedoso para él, indica defectos en la memoria espacial, quizá por mal funcionamiento del hipocampo, región a la que se le atribuye este tipo de memoria (Kraeuter, Guest y Sarnyai, 2019).

Durante la consolidación de la memoria, proceso por el cual la memoria de corto plazo pasa a largo plazo, memorias remotas son organizadas en la corteza por procesos moleculares y celulares que preceden a la consolidación. Al generarse una nueva memoria, ésta es vulnerable a interrumpirse por lo que se transforman gradualmente de un estado inestable a uno menos lábil. La consolidación se puede completar dentro de las primeras horas de entrenamiento y puede ser de proceso rápido o lento. Durante este proceso, información perceptual, motora y cognitiva es codificada inicialmente en áreas

corticales asociativas y primarias especializadas para posteriormente ser integradas por el hipocampo y forma un trazo de memoria que fortalece las conexiones al reactivarse sucesivamente (Frankland y Bontempi, 2005). Pasado el tiempo, dichos “trazos” se vuelven independientes de hipocampo por lo que dejan de ser lábiles (figura 9).

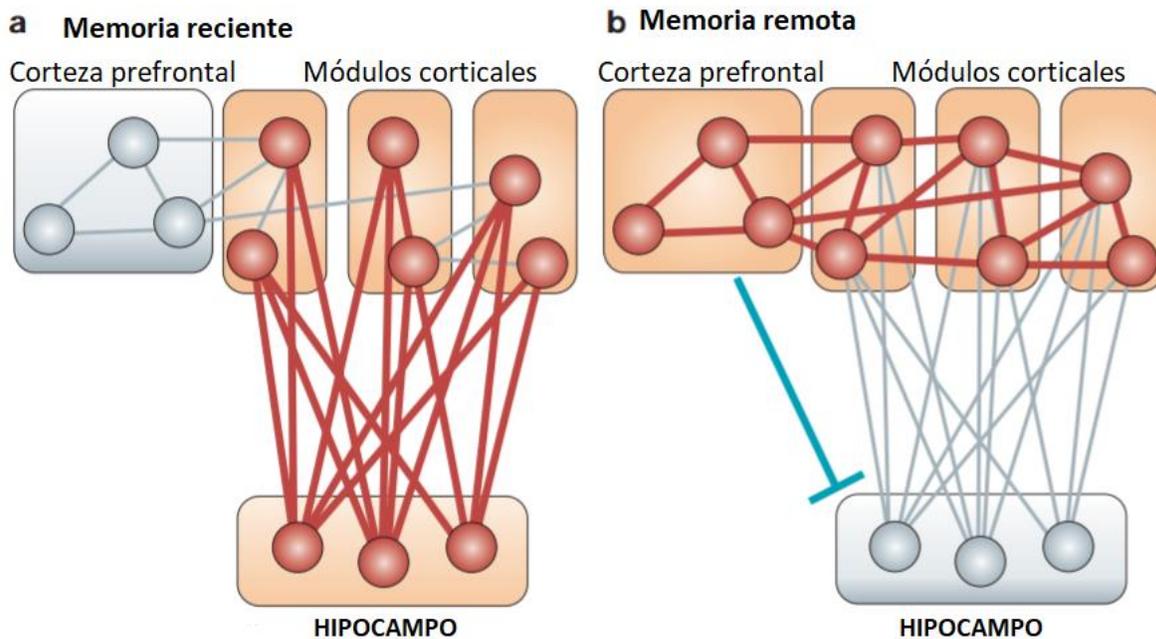


Figura 9. Modelo estándar de consolidación. La memoria reciente depende de hipocampo, mientras que la remota no, ya que participa corteza prefrontal inhibiendo su participación (modificado de Frankland y Bontempi, 2005).

Poly I:C (ácido poliinosínico-policitidílico)

El Poly I:C es una molécula de RNA de doble cadena sintética que se utiliza en el laboratorio para mimetizar infecciones virales. Este es reconocido por células del sistema inmune mediante receptores tipo Toll (TLR) 3 y desencadena una cascada de señalización que eleva la concentración de citocinas inflamatorias (figura 10). La exposición prenatal induce, en la madre, una respuesta febril robusta, aumento en la producción de citocinas y quimiocinas como IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-10, CXCL1 y activación del eje HPA (Liu et al., 2019). Sin embargo, estos efectos son específicos de la especie. El uso de Poly I:C como activador de la respuesta inmune materna, fue descrito por primera vez en 2003 por Zuckerman y colaboradores, quienes justifican su uso por poseer dos ventajas: provoca una respuesta inmune no específica y los efectos son limitados en el tiempo (48 horas). Desde entonces, han sido reportadas semejanzas en los síntomas

de pacientes con esquizofrenia y ratones tratados con Poly I:C prenatalmente, entre los que destacan: déficits en la compuerta sensorimotora (evaluada con la prueba de prepulso inhibitorio), disminución en exploración en pruebas de campo abierto y objeto novedoso, incremento en la inmovilidad en la prueba de nado forzado y disminución en la interacción social y preferencias sacarosa/sacarina. Es importante mencionar que estos efectos son dependientes de la dosis, de la etapa prenatal y de los antecedentes genéticos. La administración de Poly I:C induce fenotipos característicos de un estado hiperdopaminérgico en roedores adultos. Por otra parte, en modelos primates no humanos, existe aumento en el volumen de materia cerebral global en modelos con influencia en el mismo modelo prenatal (Brown y Meyer, 2018).

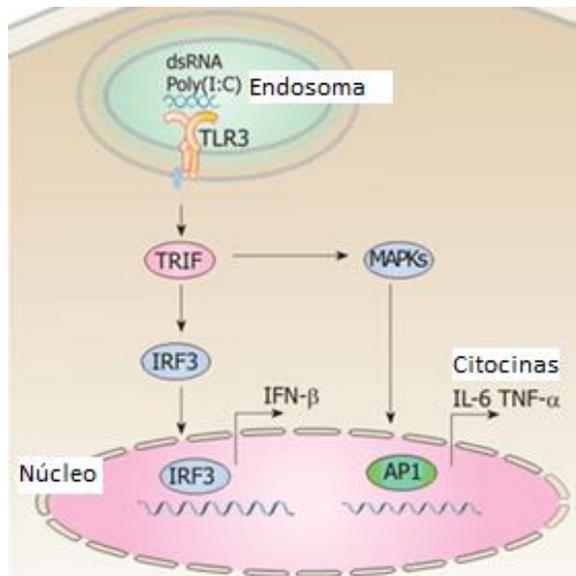


Figura 10. Mecanismo de acción del Poly I:C. PolyI:C es reconocido por el receptor endosómico tipo Toll 3 (TLR3) e inicia la señalización por el interferón β inductor de adaptador que contiene el dominio TIR (TRIF), lo que lleva a la activación del factor de transcripción interferón factor regulador 3 (IRF3) y la inducción de IFN- β . La vía de señalización dependiente de TRIF también induce la activación de MAPK y AP-1, y culmina en la producción de citocinas inflamatorias, como IL-6 y TNF- α . MAPK: proteína quinasas activadas por mitógenos; AP1: proteína activadora 1; IFN- β : interferón β ; IL-6: interleucina 6; TNF- α : factor de necrosis tumoral α (Liu et al., 2019).

Evolutivamente, los ratones divergen por 70 millones de años en relación a los primates no humanos, que divergen aproximadamente 25 millones de años, ambos con relación al humano. Las similitudes con los primates no humanos, en términos genéticos, inmunológicos, neurobiológicos y de comportamiento, lo convierte en un modelo ideal para el estudio de enfermedades humanas. Sin embargo, la dificultad para su manejo, tiempos largos de gestación, cuestiones bioéticas y costos, hacen que el modelo no sea

el ideal para el estudio de infecciones prenatales (Brown y Meyer, 2018). En este modelo de AIM tratado con un compuesto modificado del inmunógeno Poly I:C, se demostraron por primera vez cambios morfológicos en las espinas, y encontrando dendritas apicales más delgadas en la capa tres piramidal de la corteza (Weir et al., 2015).

Debido al gran número de variables que puede influir en el modelo AIM, se sugirieron lineamientos a seguir para aumentar la reproducibilidad y transparencia del modelo al considerar todas las variables posibles, como el ciclo luz/oscuridad, temperatura, pesos de los animales, inmunógeno usado, hora de inyección, administración del inmunógeno, anestésico usado, año de las gestantes, animales por caja, etcétera). Dentro de las recomendaciones para la validación del modelo AIM, un posible “estándar de oro” es la medición de citocinas proinflamatorias en suero o plasma (IL-1 β , IL-6 y TNF- α) que permiten evaluar la potencia biológica y eficacia del inmunógeno usado, además del uso de grupos independientes que evita que la manipulación en la recolección de sangre afecte en los experimentos (Kentner et al., 2019).

Activación inmune maternal (AIM)

Se conoce desde 1964, a partir de una pandemia de rubeola, que existe una relación entre infecciones prenatales y desórdenes psiquiátricos (Estes y McAllister, 2016). Dichas infecciones pueden ser provocadas por diversos microorganismos como virus y bacterias, e inclusive por medio de mecanismos como el estrés o condiciones como el microbioma materno (Jašarević et al., 2015; Young-A et al., 2016; Hantsoo et al., 2018), y presentan diferencias en cuanto al periodo de gestación en el que ocurren, posiblemente por los cambios en el desarrollo (Meyer et al., 2006). En el humano, se puede observar en la figura 11 los procesos que se ven involucrados en cada etapa del desarrollo. También se ha encontrado que infecciones sólo en el segundo trimestre de gestación, están asociados con síntomas depresivos en la etapa adolescente, y se ven exacerbadas por el estrés durante la misma etapa (Murphy et a., 2017).

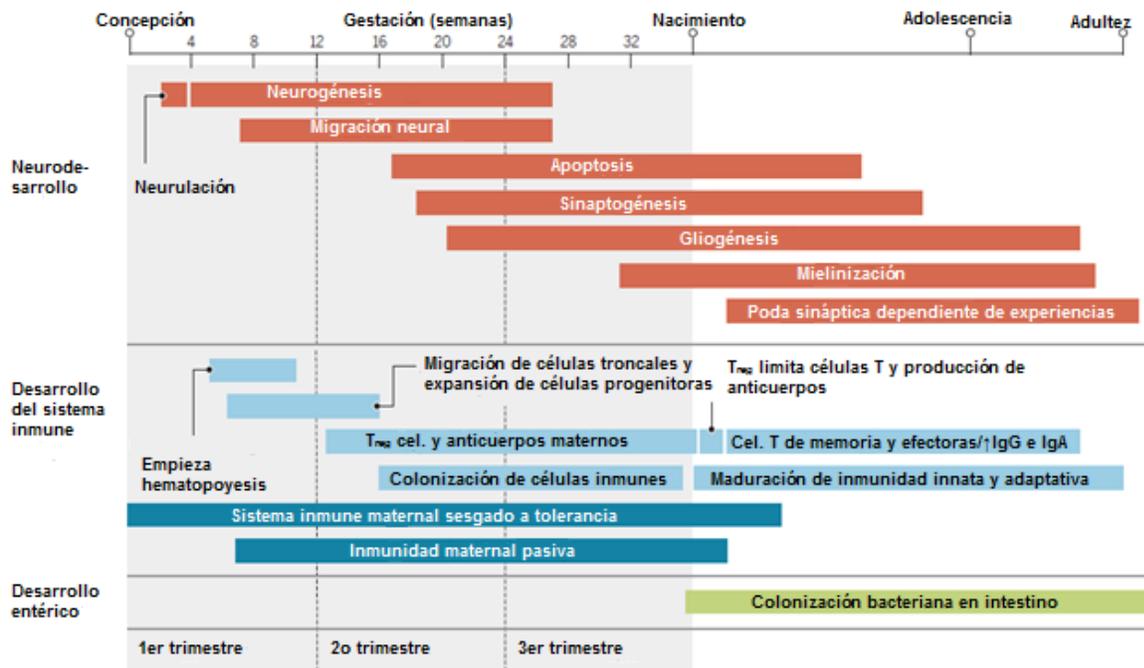


Figura 11. Línea del tiempo del desarrollo encefálico, entérico y del sistema inmune en humano (modificado de Knuesel et al., 2014).

El modelo AIM reproduce algunos síntomas del autismo (Patterson, 2011; Malkova et al., 2012; Lombardo et al., 2017; Bilbo et al., 2018), esquizofrenia (Meyer et al., 2008a), epilepsia, Parkinson, depresión y hasta Alzheimer (Li et al., 2009; Knuesel et al., 2014; Murphy et al., 2017), sintomatología que se puede potencializar por retos posnatales, como se observa en la figura 12 (Estes y McAllister, 2016).

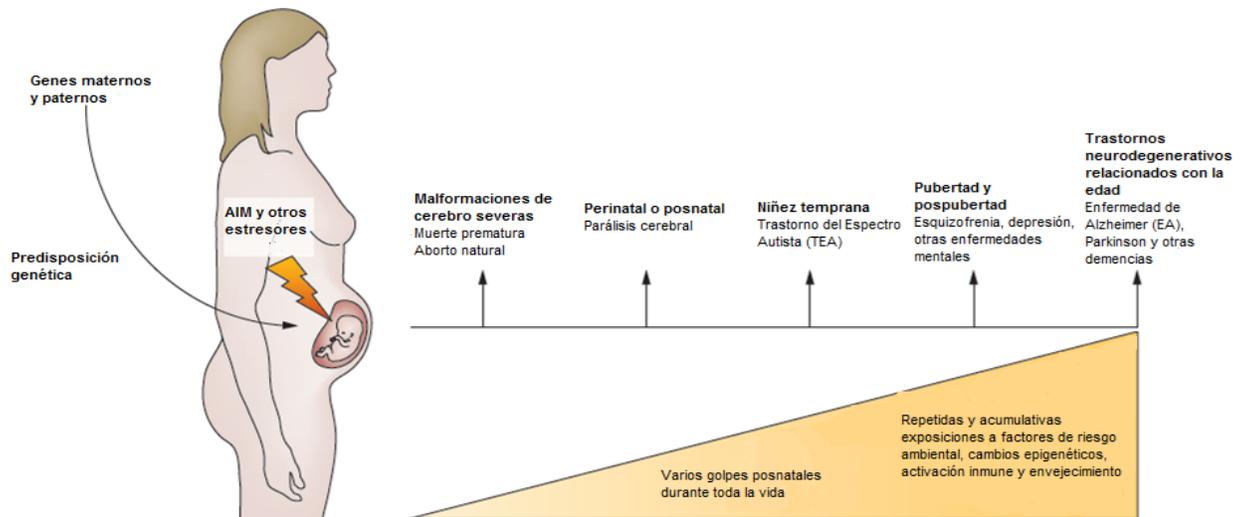


Figura 12. Modelo de desarrollo intrauterino con las anomalías producidas por los estresores durante la Activación Inmune Maternal (AIM) (modificado de Knuesel et al., 2014).

Se ha demostrado que infecciones prenatales y eventos psicológicamente traumatizantes en etapas peripubertales, pueden actuar de manera sinérgica para incrementar el riesgo de desarrollar esquizofrenia, con mayor susceptibilidad en hombres (Debost et al., 2016). Una hipótesis robusta en el modelo AIM sugiere la participación de interleucina 17 (IL-17) durante la gestación como primer reto inmunológico, como se muestra en la figura 13, que un aumento de IL-17 produce la activación de células Th17 y a su vez aumentan la producción de interleucina 6 (IL-6) (Estes y McAllister, 2016).

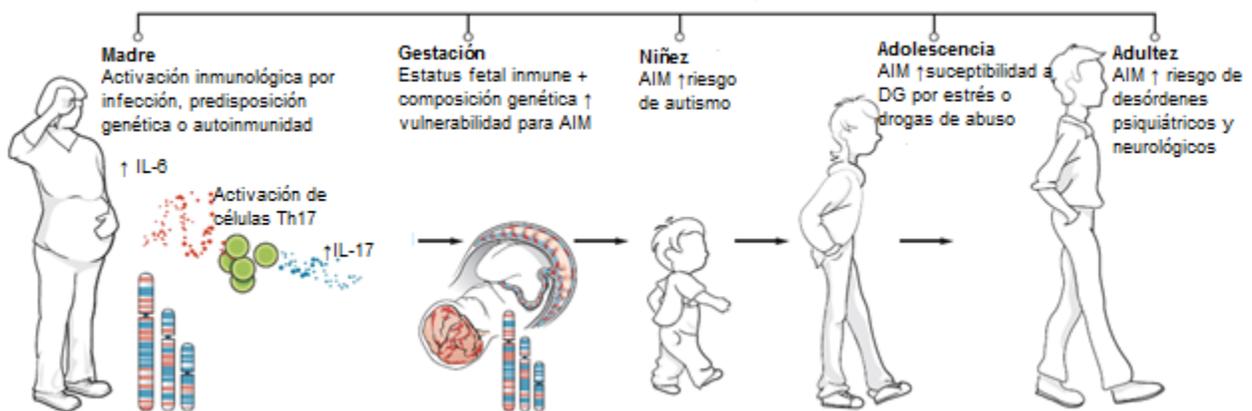


Figura 13. Factores de riesgo para el desarrollo de desórdenes del sistema nervioso central. Interleucina 17 (IL-17), interleucina 6 (IL-6), Activación inmune maternal (AIM) (modificado de Estes y McAllister, 2016).

Mediante experimentos en ratones, se comprobó que los daños neuroanatómicos y alteraciones glutamatérgicas y dopaminérgicas encontrados en el modelo AIM se presentan, en las crías macho, después de retos inmunológicos prenatales, pero no durante el periodo posnatal (Meyer et al, 2008b). En un modelo de AIM, se encontró que sólo con retos inmunológicos tempranos, en el día gestacional 9 (G9), pero no en tardíos (día gestacional G17), se reproducen algunos síntomas característicos de patologías como esquizofrenia, como la compuerta sensorimotora dañada y reducción de los receptores dopaminérgicos (D1) prefrontales, mientras que sólo los retos tardíos, afectan la memoria de trabajo y espacial en ratones (Meyer et al., 2008a; Bitanihirwe, Weber, Feldon y Meyer, 2010). Desorganizaciones en la citoarquitectura de la corteza han sido descritos en la corteza prefrontal y temporal de murinos infectados prenatalmente en el G12.5 (Yim et al., 2017), correspondientes con hallazgos en pacientes con esquizofrenia (Wagstyl et al., 2016) y con parches corticales encontrados en pacientes con autismo (Stoner et al., 2014). Por otra parte, se ha probado que la activación de neuronas

piramidales de la zona disgranular de la corteza somatosensorial primaria (S1DZ) es suficiente para inducir las anormalidades observadas en el modelo AIM en ratones intactos, mientras que una reducción en su actividad puede rescatar las anormalidades del modelo AIM (Yim et al., 2017).

Otros laboratorios, han encontrado aumento de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD67) en hipocampo y tálamo y disminuido en corteza prefrontal de la descendencia de ratas macho en P60, cuando el reto inmunológico se da en G14 con Poly I:C (8 mg/Kg i.p)(Cassella et al., 2016). Sin embargo, no siempre es necesario un segundo reto para desencadenar los síntomas, ya que una dosis media (5 mg/Kg de peso i.v.) del inmunógeno prenatal ha mostrado ser suficiente para ello (Meyer, 2006). Una de las estructuras dañadas en las patologías como la esquizofrenia, es el hipocampo, en donde se han descrito déficits sinápticos como resultado del reto inmunológico producido por el modelo AIM, en donde los principales cambios surgen en las áreas CA1-CA3 (Giovanoli, 2016).

Estudios en los que se administra, en G12.5, IL-6 en ratones sin antecedentes de infección, producen el fenotipo observado en los ratones del modelo AIM, lo que soporta la hipótesis antes planteada. En el mismo estudio se comprueba que coadministrando anticuerpos anti-IL-6 y Poly I:C en el modelo AIM, previenen los daños en la compuerta sensorimotora, valorados con la prueba de prepulso inhibitorio (PPI), y mejoría en los déficits sociales y exploratorios del modelo. Además, dichos estudios comprueban en un ratón “knock-out” para IL-6 (en el que retiran el gen involucrado con IL-6), que el modelo AIM no puede ser replicado. Con estos tres experimentos, se comprueba que la IL-6 es un intermediario necesario para evocar el fenotipo tipo esquizofrénico en la descendencia del modelo AIM, soportando así la hipótesis planteada en la figura 13 (Smith et al., 2007). En este modelo con IL-6 inyectada i.p. entre G12.5-16.5 en ratones C57BL/6J y analizados entre 4 y 6 meses, se encontró disminución en el índice de novedad social (Minakova et al., 2019).

La memoria de trabajo está deteriorada en ratones macho en el modelo AIM con inyecciones de Poly I:C en G17.5, pero no en G12.5 (Connor et al., 20120). En cuanto a la memoria espacial, sólo existen dos estudios en ratones en los que se analizan por medio de la prueba de laberinto en Y con un brazo cerrado, de los cuales sólo uno la

encuentra deteriorada cuando la analiza en G17 con Poly I:C i.v. en P80 con tiempo de retención de 15 minutos (Bitanhirwe et al., 2010). El otro estudio lo realizan con Poly I:C, en G17.5 entre P84-P105 con tiempo de retención de una hora (Schroeder et al., 2019).

La importancia de evaluar al menos tres comportamientos separados (en modelos animales) que sean relevantes en la esquizofrenia, se debe a la gamma amplia de comportamientos anómalos en la esquizofrenia, y a que en humanos no siempre se manifiestan todos los síntomas posibles, por lo que no podríamos esperar que un modelo animal recapitule todas las características, pero sí algunas (Powell y Miyakawa, 2006). Algunas de estas conductas se resumen en la tabla 1.

| |
|---|
| <p>I. Signos/síntomas positivos:</p> <p>A. Agitación psicomotora</p> <p>a) Actividad locomotora</p> <p>b) Actividad locomotora en respuesta a la novedad</p> <p>B. Sensibilidad a las drogas psicomiméticas</p> <p>a) Aumento de la respuesta locomotora a los antagonistas de los receptores NMDA no competitivos (MK-801, PCP, ketamina)</p> <p>b) Aumento de la respuesta locomotora a la anfetamina</p> <p>c) Aumento de la sensibilidad de otras pruebas a medicamentos psicomiméticos (por ejemplo, aumento del efecto de MK-801, PCP o ketamina en la prueba de PPI)</p> <p>II. Signos/síntomas negativos:</p> <p>A. Retiro social</p> <p>a) Disminución de la interacción con un conoespecífico juvenil</p> <p>b) Disminución de la preferencia de lugar para un conoespecífico de pares enjaulados</p> <p>c) Disminución de la preferencia por la novedad social</p> <p>d) Dominación social alterada en la prueba de tubo</p> <p>e) Comportamiento alterado de agresión en el ensayo de intrusos residentes</p> <p>f) Disminución del comportamiento de anidación</p> <p>g) Interacción social entre el hogar y la jaula</p> <p>III. Signos/síntomas cognitivos:</p> <p>A. Disminución de la memoria de trabajo</p> <p>a) Alternancia deteriorada en la tarea de memoria de trabajo del laberinto T</p> <p>b) Rendimiento deteriorado en la tarea de memoria de trabajo del laberinto radial de 8 brazos</p> <p>B. Déficits en la atención/activación sensorimotora/función ejecutiva</p> <p>a) Disminución de la compuerta sensorimotora (déficit de PPI)</p> <p>b) Disminución de la inhibición latente</p> <p>c) Prueba de tiempo de reacción en serie de 5 opciones (5-CSRTT)</p> <p>d) Disminución de la capacidad de cambio de set</p> <p>C. Déficit cognitivo general</p> <p>a) Disminución del aprendizaje espacial en el laberinto de agua de Morris</p> <p>b) Disminución del aprendizaje espacial en el laberinto radial de 8 brazos</p> |
|---|

Tabla 1. Comportamientos del ratón de relevancia potencial para los signos y síntomas de la esquizofrenia. NMDA, N-metil-D-aspartato; PCP, fenciclidina; PPI: inhibición previa al pulso. (traducido de Powell y Miyakawa, 2006).

JUSTIFICACIÓN

En modelos para esquizofrenia, se han encontrado cambios anatómicos en la región del CA2 del hipocampo (Piskorowski et al., 2017), relacionados a la memoria social (Hitti y Siegelbaum, 2014; Stevenson y Caldwell, 2014). Por otra parte, el tratamiento prenatal con el inmunógeno Poly I:C representa uno de los modelos más poderosos de desarrollo ambiental de esquizofrenia (Meyer et al., 2005). Además, con base en los antecedentes acerca de que la conducta repetitiva de enterramiento de objetos, la memoria espacial, interacción y memoria social de los ratones infectados durante el desarrollo intrauterino se manifiestan o se podrían manifestar alterados en el periodo posnatal crítico entre los 90-114 días de edad posnatales, se espera que el modelo experimental del AIM presente alteraciones en la memoria espacial y social, que pudieran relacionarse a lo reportado en pacientes con esquizofrenia. Y considerando que la etapa gestacional G12.5 corresponde aproximadamente a la semana 6-7 de gestación en el humano, final del primer trimestre de gestación y tiempo de la neurogénesis del sistema límbico (Vuillermont et al., 2017), es que representa una etapa crítica para el desarrollo de modelos prenatales para procesos psiquiátricos (Meyer et al., 2006).

Por lo tanto, la finalidad de este estudio fue evaluar si los cambios conductuales son representativos de la esquizofrenia en el modelo AIM en ratones macho adultos (3-4 meses de edad), infectados durante su desarrollo intrauterino (G12.5).

HIPÓTESIS

En el modelo de AIM, por la inyección i.v. de Poly I:C en G12.5:

1. La conducta repetitiva de enterramiento de canicas se verá potenciada.
2. La memoria de reconocimiento espacial se verá disminuida.
3. La memoria social se verá disminuida.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar alteraciones en conductas repetitivas, de memoria espacial y de memoria social en ratones cuyas madres fueron inyectadas vía i.v. con Poly I:C (modelo AIM).

Objetivos Específicos

- Implementar el modelo AIM, inyectando Poly I:C (5 mg/Kg) i.v. en el día G12.5 en hembras.
- Cuantificar citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF- α) en el suero de ratones hembra inyectadas i.v. con Poly I:C o VEH.
- En la primera generación (F1) formada por las crías de sexo macho, nacidas de madres tratadas con Poly I:C I evaluar en el día posnatal 90 (P90) su conducta repetitiva, 8 días después (P98) la memoria de reconocimiento espacial, y 16 días después (P114) medir la interacción social, y la memoria social.

METODOLOGÍA

Sujetos experimentales

Todos los procedimientos se realizaron siguiendo los parámetros de las normas nacionales (NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999) con aprobación del comité de bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México (INB-UNAM) con número de aprobación 065 por el tiempo que duró el experimento. Se utilizaron 10 hembras C57BL6/J de 12-20 semanas, que se cruzaron con machos de las mismas edades, alojados en cajas de policarbonato (12 X 12 X 25 cm), con tapas con filtro (FTC, por "filter-top cages), conectadas a aire lavado y mantenidos en cuartos con condiciones controladas de temperatura a 22°C y humedad ambiental relativa del 50% con un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 h, iniciándose a las 21:00 hrs. Cada caja contenía suficiente material de anidación, adecuada limpieza, agua y alimento LabDiet (5001) ad libitum. Para sincronizar el ciclo de las hembras, se les añadió un poco de aserrín de la caja de los machos tres días antes de ponerlas a cruzar, y se emparejaron dos hembras con un macho para optimizar los sementales. Se comprobó el día gestacional 0.5 (G0.5) mediante la aparición del tapón vaginal. Las crías fueron retiradas de la madre y separadas por sexo al día posnatal 25 (P25). El diseño experimental se ilustra en la figura 14.

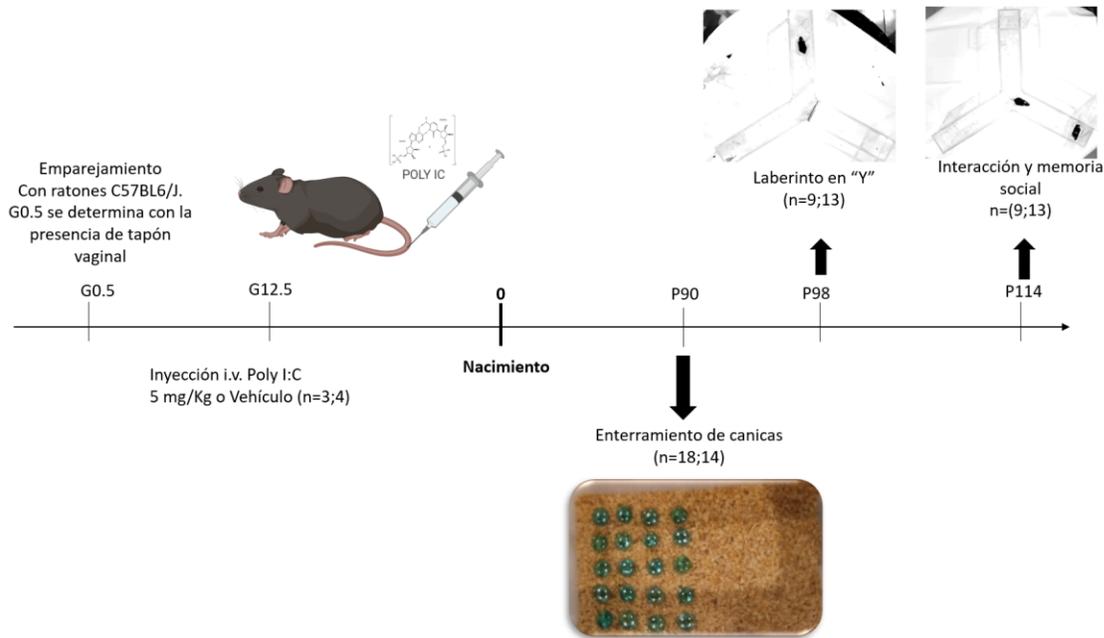


Figura 14. Diseño experimental global.

Administración del inmunógeno: ácido poliinosínico- policitidílico (Poly I:C)

Se inyectó la dosis de 5 mg/Kg de Poly I:C (sal potásica; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, pureza 8-12%) disuelto en solución isotónica de cloruro de sodio (solución salina inyectable 0.9%, DELMED), por vía intravenosa (de la vena lateral de la cola) a las madres gestantes en el día gestacional 12.5 (G12.5). Para el grupo vehículo (VEH), se inyectó el volumen equivalente de la solución salina (Meyer et al., 2006). Para la preparación, se consideró la pureza de la sal (8-12%), por lo que disolvimos la cantidad suficiente para una solución 1 mg/mL. Al pesar a los ratones, se multiplicó el peso en gramos por 5 para conocer los microlitros a inyectar para ese ratón. Por ejemplo: Se pesan 4 mg de la sal potásica de Poly I:C y se disuelven en 400 μ L de solución salina inyectable (para tener 1mg/mL de la sustancia pura, considerando el 10% de pureza), si el ratón gestante pesa 35 g, entonces se le inyectan 175 μ L de la solución preparada. Esta ventana de gestación se seleccionó sobre la base de estudios epidemiológicos que sugieren que el primer trimestre del embarazo humano puede asociarse con la vulnerabilidad máxima para los trastornos del neurodesarrollo mediados por la infección viral como la esquizofrenia (Brown y Derkits, 2010). El G12.5, corresponde aproximadamente a la semana 6-7 de gestación en el humano, final del primer trimestre

de gestación y tiempo de la neurogénesis del sistema límbico (Vuillermont et al., 2017).

Bioactividad del Poly I:C

Para asegurar la bioactividad del inmunógeno, se sacrificó un grupo independiente (también llamado satélite o centinela) de 20 ratones hembra de la cepa C57BL6/J de entre 3 y 5 meses, a las que se les inyectó previamente el Poly I:C (5 mg/Kg) o el vehículo, siendo 10 ratones por condición. El sacrificio se realizó a las 3 horas después de la administración del VEH o el Poly I:C. Se realizó la cuantificación de las citocinas IL 6 y TNF- α por ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, en español: ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas) marca Novex (de Life technologies) con números de catálogo KMC0061 para IL-6 e invitrogen (de Thermo Fisher) con número de catálogo KMC3011 para TNF- α .

Pruebas conductuales

Las pruebas conductuales se realizaron en ratones macho, crías de madres inyectadas con Poly I:C o VEH, de 90 a 114 días de edad. Los procedimientos conductuales se realizaron durante la fase oscura, (que inició a las 9 am), en un cuarto sonomortiguado, con luz atenuada (20 luxes). Los ratones fueron manipulados durante 3 días consecutivos previos a la conducta, una sesión diaria de por lo menos 5 minutos por ratón. Todos los experimentos conductuales se llevaron a cabo 24 h después de la última sesión de manipulación. Los videos de los experimentos se tomaron con una cámara de video-vigilancia marca STEREN, y se analizaron posteriormente en el programa SMART v2.5.21. A continuación se especifican los diferentes paradigmas conductuales evaluados. Todas las pruebas estadísticas y las gráficas mostradas se realizaron con el programa GraphPad Prism 8.01.

Prueba de enterramiento de canicas (EC)

El comportamiento estereotipado se evaluó mediante la prueba de EC (Deacon 2006), en P90. Para realizarla se ocuparon jaulas de acrílico transparentes limpias (27 x 16.5 x 12.5 cm) con una capa de lecho de aserrín de 5 cm de profundidad y tapas transparentes agujeradas, proporcionadas por el Bioterio del INB. El procedimiento se llevó a cabo en

dos sesiones. En la primera sesión, también llamada de habituación, los ratones se colocaron en las jaulas durante 5 minutos. Posterior a esto, se retiraron los animales restaurando la planicie del lecho de aserrín. Veinte canicas de vidrio coloreados de 15 mm de diámetro (grava decorativa para acuario marca PETCO) se colocan sobre el lecho, equidistantes entre sí en una disposición de 4x5 (figura 15). En la segunda sesión, o de prueba, los animales se colocaron de nuevo en la jaula durante 10 minutos. Una vez terminado el tiempo se retiraron los animales de la caja y se registró el número de canicas enterradas. El criterio para una canica enterrada fue que más de $\frac{3}{4}$ partes de la canica estuviera cubierta por el aserrín. Para evitar el sesgo del investigador como observador, un observador ajeno realizó el conteo directamente de la jaula.

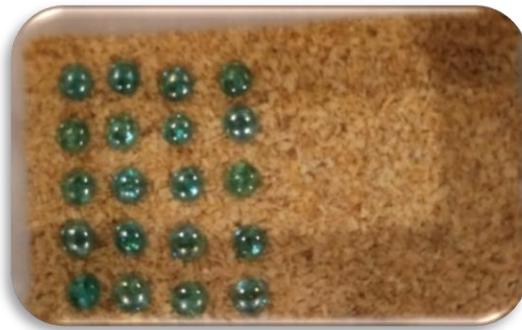


Figura 15. Caja habitación de ratón en donde se muestra la colocación de las 20 canicas antes de colocar al ratón.

Laberinto en “Y”

Se realizó la prueba de laberinto en “Y” con un brazo cerrado durante el entrenamiento, para evaluar memoria de referencia espacial, que es dependiente de hipocampo, en ratones macho de P98. La prueba se realizó en un laberinto de plexiglás transparente con en tres brazos idénticos (50 × 9 × 10 cm, largo × ancho × alto), que irradian desde una zona central triangular (cada lado 8 cm), al que se le puso una capa ligera de aserrín y que contienen compuertas desplegadas en cada brazo. Se colocaron pistas visuales con tamaños y formas diferentes, a la altura del laberinto para que fueran visibles para el ratón. El procedimiento se llevó a cabo en dos sesiones, ambas grabadas. En la primera (fase de entrenamiento) se permite al ratón explorar el laberinto durante 5 minutos, inhabilitando el paso hacia uno de los brazos (denominado después como brazo novedoso) y liberándolo en uno de los dos restantes (denominado brazo de inicio). Después, el ratón se retira del laberinto y se deja en su caja-habitación durante 15

minutos (intervalo entre ensayos). Pasado el tiempo, se vuelve a colocar al ratón en el laberinto (con una capa de aserrín nuevo suficiente para cubrir el piso del laberinto), pero sin la compuerta que impida el paso al brazo anteriormente cerrado y se le permite la exploración durante 2 minutos (fase de prueba). Se cuantificó el porcentaje de tiempo que pasó el ratón en el brazo novedoso y la distancia recorrida mediante el programa SMART, identificando cada uno de los brazos (figura 16). La metodología fue tomada de Bitanihirwe y colaboradores (2010).

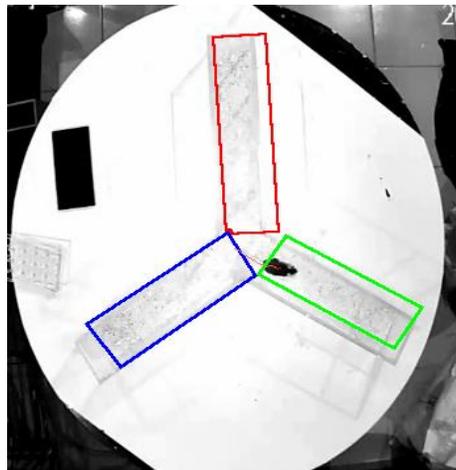


Figura 16. Imagen tomada del programa SMART del laberinto en “Y” con los brazos marcados en 3 colores en donde se indica cómo se procesó para la prueba de laberinto en “Y”. En el programa se especifica el brazo de inicio y el novedoso, que se puede ver marcado con colores azul y verde, respectivamente.

Prueba de Interacción y memoria social

Se evaluó en el laberinto en “Y” de plexiglás transparente usado anteriormente, con aserrín nuevo y con dos brazos cerrados con puertas agujeradas transparentes en forma de jaula al final de cada brazo, en ratones macho de 114 días de nacidos. Se realizaron 3 sesiones continuas, en la primera se liberó en el laberinto al ratón durante 5 minutos (para reducir la hiperactividad). Para la segunda sesión, que fue la prueba de interacción social, se enjauló un ratón ajeno a su caja-habitación en uno de los brazos con compuerta, que fue de la misma edad, sexo y cepa del ratón a evaluar, y se dejó el otro brazo vacío (como en la metodología descrita por Kaidanovich-Beilin y colaboradores, 2011). La prueba también puede ser con un objeto inanimado, pero en nuestro caso elegimos dejarlo vacío. Se deja a que el ratón explore el laberinto, y luego con el intruso enjaulado, durante 5 minutos. Después de este tiempo, se colocó otro ratón de iguales condiciones en el brazo antes vacío, que correspondería a una tercera sesión. Se registra

durante 5 minutos. Los ratones colocados para que el ratón testigo interactúe, fueron encerrados al final de los brazos correspondientes con la ayuda de compuertas corredizas transparentes agujeradas, para facilitar la interacción (se ejemplifica en la figura 17). Los criterios evaluados en esta prueba son: %tiempo con el ratón, comparado con el brazo vacío (interacción social), y %tiempo con un ratón novedoso comparado con el ratón, ahora familiar (memoria social). Nos basamos en la metodología del Vuillermot y colaboradores (2017), donde adaptan un laberinto de iguales dimensiones para el mismo modelo AIM y encuentran diferencias cuando el inmunógeno Poly I:C es administrado en G9.

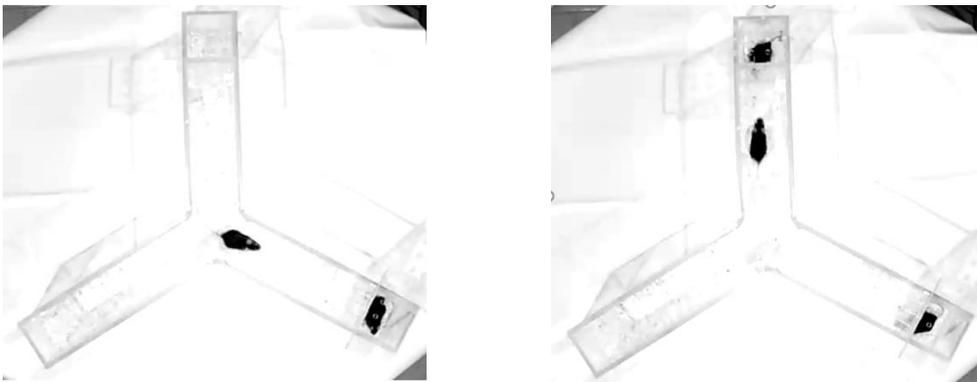


Figura 17. Prueba de interacción (izquierda) y memoria social (derecha). En el esquema de la derecha, el ratón familiar está a la derecha y el novedoso arriba. Para evitar que se escapen los ratones enjaulados, se colocó una tapa arriba de cada jaula durante los experimentos.

RESULTADOS

Bioactividad del Poly I:C

Para garantizar la actividad biológica del inmunógeno, se cuantificaron dos de las interleucinas involucradas en la vía activada por Poly I:C, la IL-6 y TNF- α . Debido al número tan reducido de individuos en cada grupo y a que los datos del grupo VEH no tienen un comportamiento normal o Gaussiano (comprobado para los valores de IL-6 con pruebas de normalidad como Kolmogorov-Smirnov ($p=0.0002$), Shapiro-Wilk ($p<0.0001$) y D'Agostino y Pearson ($p<0.0001$)), se procedió a realizar la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney, de dos colas con un intervalo de confianza del 95%, que arrojó: "U" $=2$, $p=0.0002$ (figura 18A). Para TNF- α , las concentraciones fueron muy bajas y algunos de los valores no pudieron entrar en la curva realizada, por lo que las muestras que sí entraron (3 y 5) no fueron suficientes para un análisis estadístico (por lo

que no se aplicaron pruebas de normalidad), indicando una $p=0.17$ en la prueba U de Mann-Whitney y un valor de “U”=3 (figura 18B).

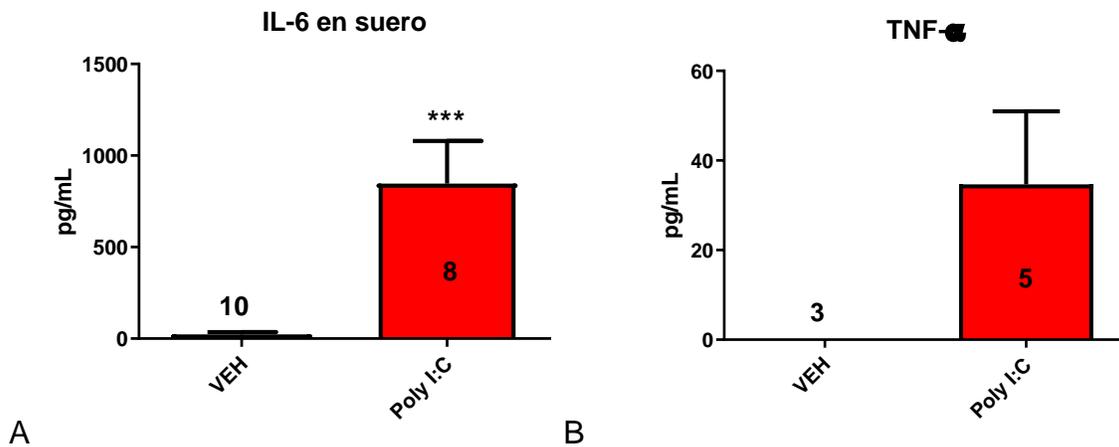


Figura 18. Niveles séricos de IL-6 y TNF- α a 3 horas de la inyección con Poly I:C i.v. A) niveles séricos de IL-6 en ambos grupos, *** $p=0.0002$ con la prueba estadística U de Mann-Whitney. B) niveles séricos de TNF- α . Se grafica media y error estándar medio (SEM). El número de sujetos se incluye dentro de la gráfica.

Prueba de enterramiento de canicas (EC)

El primer procedimiento conductual evaluado fue el enterramiento de canicas. Esta prueba nos permite observar la conducta repetitiva alterada en el modelo de esquizofrenia que ha sido reportada en el modelo AIM. Las canicas fueron puestas en una disposición 5X4, que al final de la prueba se observaron como en la figura 19B. La prueba se realizó en ratones macho C57BL/6 en el P90. Las pruebas de normalidad del grupo VEH mostró valores de: Kolmogorov-Smirnov ($p=0.0146$), Shapiro-Wilk ($p<0.0025$) y D'Agostino y Pearson ($p<0.0194$), por lo que al no pasar las pruebas de normalidad se procedió a analizar con la prueba estadística no paramétrica U de Mann-Whitney, de dos colas con un intervalo de confianza del 95%, que nos mostró valores de: “U”=39, $p=0.0005$ (Figura 19A).

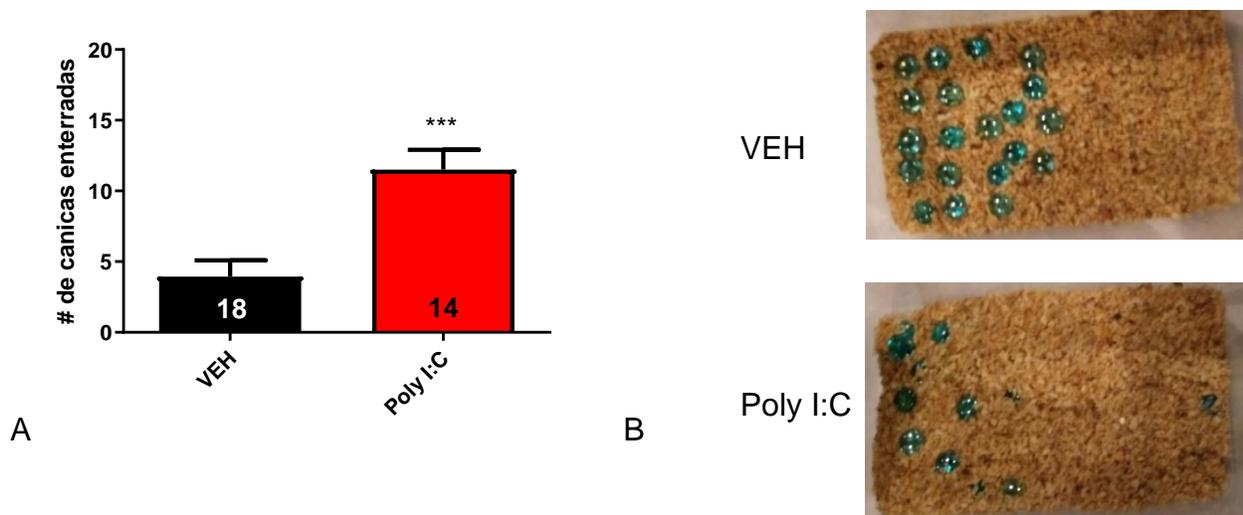


Figura 19. Resultados de la prueba de enterramiento de canicas. A) gráfica del número de canicas enterradas por grupo B) imágenes representativas de los dos grupos en los que se pueden observar las canicas enterradas transcurridos 10 minutos de prueba. *** $p=0.0005$. Prueba U de Mann-Whitney de dos colas. Se muestra la media y error estándar medio (SEM). El número de sujetos se incluye dentro de la gráfica.

Memoria espacial en el laberinto en “Y”

La prueba conductual del laberinto en “Y” evitando el acceso a uno de los brazos durante el entrenamiento, nos permite evaluar la memoria de referencia espacial en ratones, la cual es una memoria dependiente de hipocampo (Kraeuter, Guest y Sarnyai, 2019). No se ha reportado un daño en esta prueba en el modelo AIM al día gestacional que usamos, por lo que los resultados derivados apoyarían o no si existe daño en hipocampo. Por su parte, tomamos la distancia recorrida como parámetro de descarte de problemas motores en los animales de prueba. La prueba se realizó en ratones macho C57BL6/J de edad P98. Las pruebas de normalidad de ambos grupos y para laberinto en “Y” así como para la distancia no arrojaron valores significativos (Shapiro-Wilk $p=0.4816$ y $p=0.3674$ en los grupos de VEH y Poly I:C respectivamente y para las distancias recorridas valores de $p=0.5606$ y $p=0.9452$). Al pasar las pruebas de normalidad se procedió a analizar con la prueba estadística paramétrica “t de Student” no pareada y con la corrección de Welch (no asumiendo desviaciones estándar iguales), de dos colas con un intervalo de confianza del 95%, que mostró en la prueba de laberinto en “Y” valores de: “t”=1.983, $df=19.55$, $p=0.0616$; y para las distancias: “t”=0.2481, $df=20$, $p=0.8066$. Con esto se prueba que no hubo cambios en ambos grupos y en ambas pruebas (figuras 20B y 21).

Considerando el comportamiento de ambos grupos cada 20 segundos, realizamos un ANOVA de dos vías de medidas repetidas que nos arrojó valores de $p=0.8646$ y $F(5, 100)=0.3753$ para la interacción; $p=0.1233$ y $F(1.268, 27.36)=2.416$ para el tiempo; y $p=0.5298$ y $F(1, 20)=0.4090$ para la condición (figura 20A).

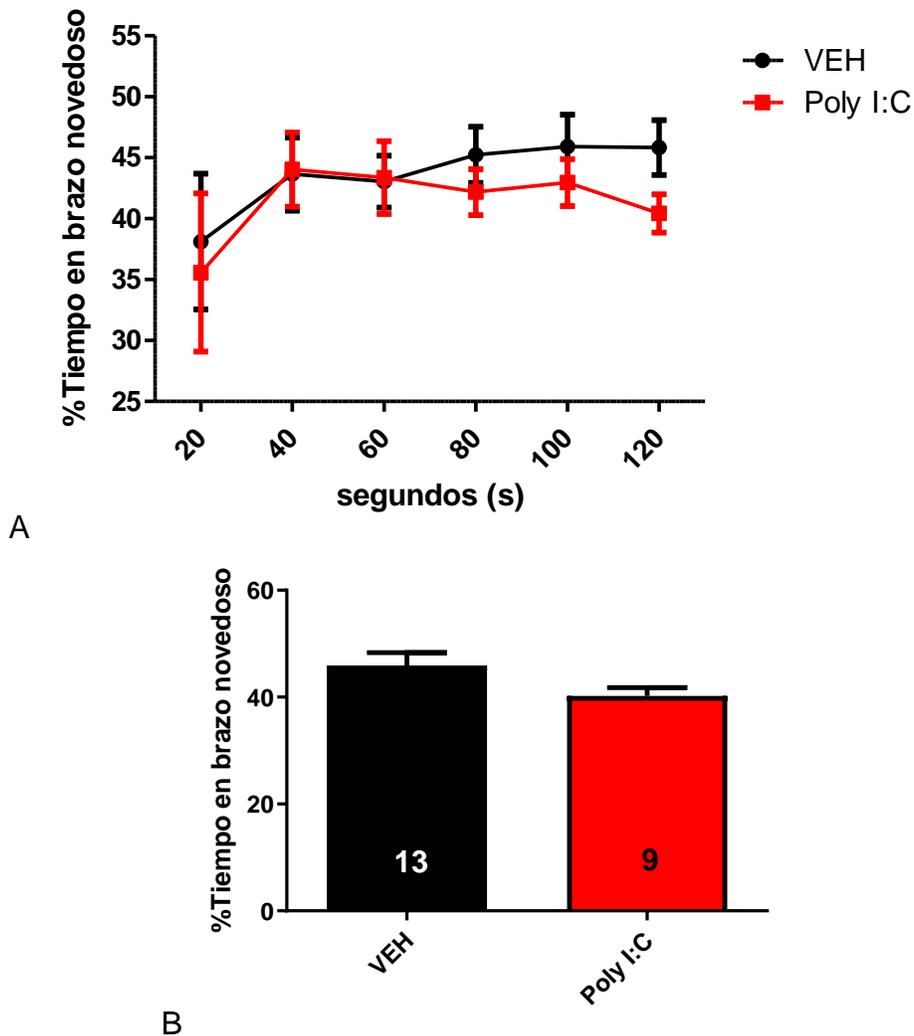


Figura 20. Laberinto en "Y" A) gráfica del comportamiento del ratón cada 20 segundos B) Resultados de la conducta en el laberinto en "Y". Se grafica el porcentaje de tiempo que dura el ratón en el brazo novedoso. Prueba "t de Student" no pareada de dos colas. No se observan cambios en ambas gráficas. Se muestra la media y error estándar medio (SEM) y el número de sujetos se incluye dentro de la gráfica.

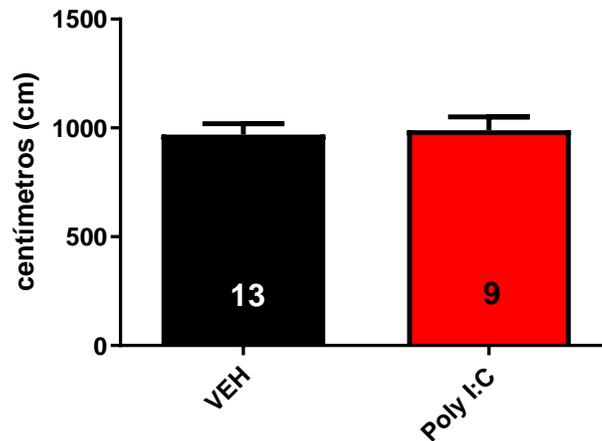
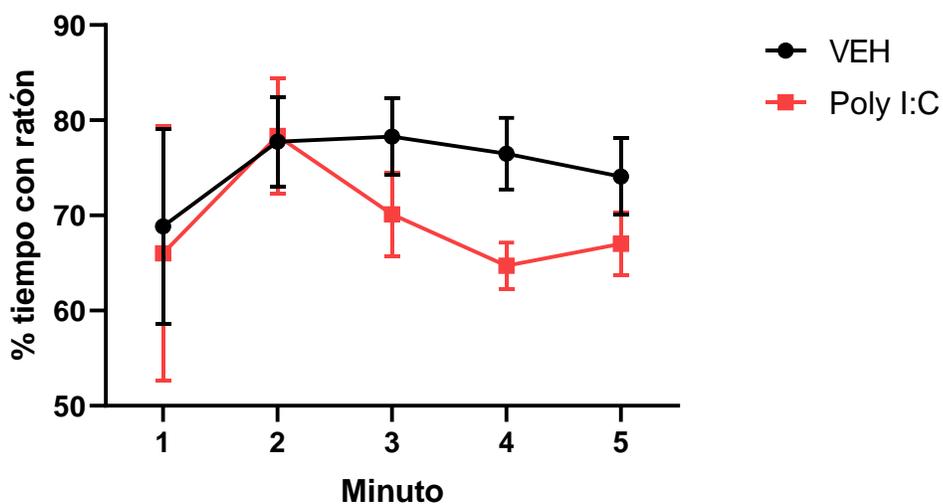


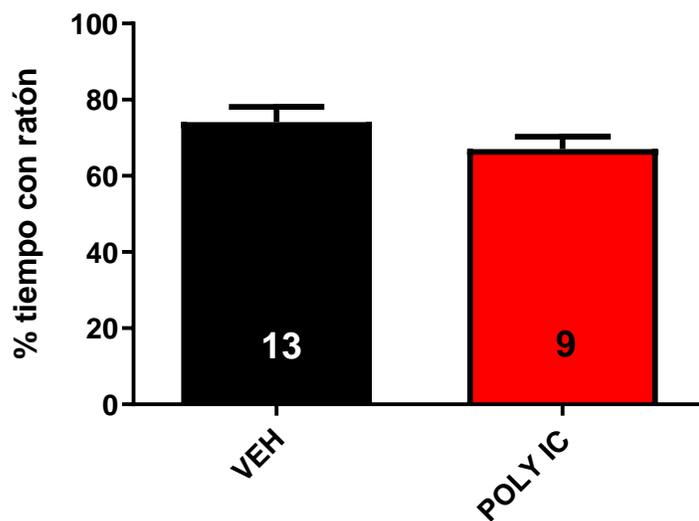
Figura 21. Distancia recorrida en el laberinto en “Y”. Se grafica la distancia en centímetros (cm) que recorre el ratón en el laberinto. Prueba “t de Student” no pareada de dos colas. No se encuentran cambios. Se muestra la media y error estándar medio (SEM) y el número de sujetos se incluye dentro de la gráfica.

Prueba de Interacción Social

La falta de sociabilidad en patologías como la esquizofrenia, es una característica replicable en los modelos animales. El modelo AIM presenta déficit de sociabilidad, la cual podemos medir mediante la prueba conductual realizada en esta tesis. Para cumplir dicho propósito, diseñamos una modificación de la prueba conductual denominada “Three-chamber test”, en la que un ratón es colocado en una cámara intermedia unida a dos adyacentes mediante compuertas removibles (Kaidanovich-Beilin et al., 2011). La prueba se realizó en ratones macho C57BL6/J en P114. En esta prueba, se contó el tiempo que pasa el ratón prueba con otro ratón y se comparó con el tiempo que pasó explorando el otro cubículo vacío. Considerando el comportamiento de ambos grupos por minuto y durante los 5 minutos de la prueba (figura 22A), procedimos a realizar un ANOVA de dos vías de medidas repetidas que nos arrojó valores de $p=0.7655$ y $F(4,80)=0.4591$ para la interacción; $p=0.2722$ y $F(1.257, 25.14)=1.316$ para el tiempo; y $p=0.3907$ y $F(1,20)=0.7699$ para la condición. Al comparar ambos grupos al final de la prueba, figura 22B, nos arrojó un valor de $p=0.1872$ con una $t=1.366$ y $df=20$ con T de Student con corrección de Welch. Las pruebas de normalidad pasaron para ambos grupos ($p>0.05$).



A



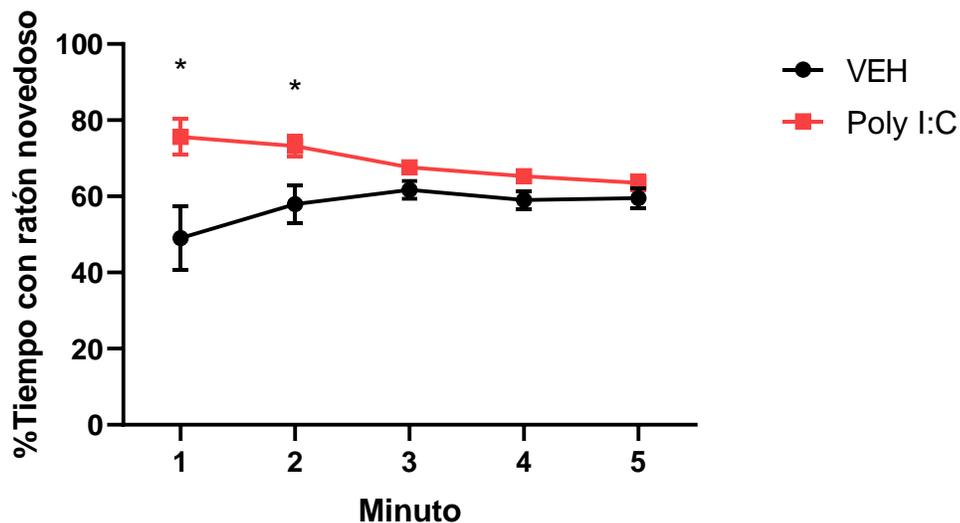
B

Figura 22. Interacción social. A) gráfica del comportamiento del ratón por minuto. B) grafica del porcentaje de tiempo que pasó el ratón prueba con el otro ratón al minuto. Se muestra la media y error estándar medio (SEM) y el número de sujetos se incluye dentro de la gráfica.

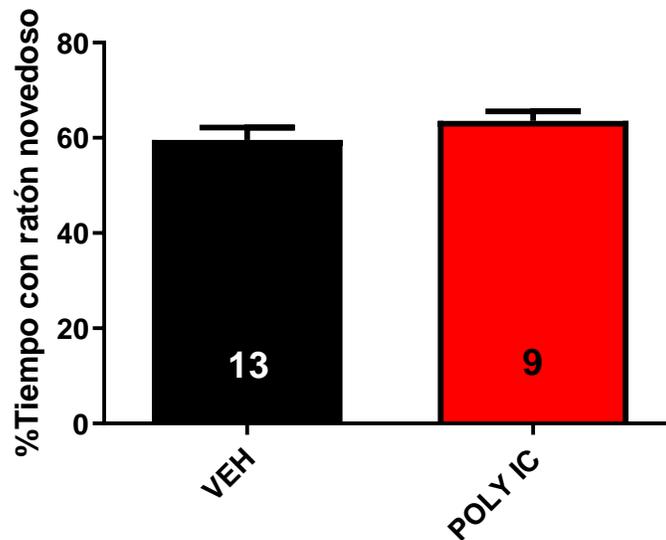
Prueba de Memoria social

Diversos desórdenes psiquiátricos son caracterizados por alteraciones en el comportamiento y reconocimiento social. Dentro de éstos, destacan el autismo y la esquizofrenia. Para probar la memoria social, usamos el laberinto en "Y" modificado para esta prueba, descrito anteriormente. Esta prueba se realizó después de la prueba de interacción social, colocando otro ratón en otro de los brazos con compuerta del laberinto

(que pasa a ser el novedoso, dejando al anterior como el familiar) y se cuantifica el tiempo que pasa con éste durante 5 minutos de grabación. Considerando el comportamiento de ambos grupos por minuto y durante los 5 minutos de la prueba (figura 23A y 23B), procedimos a realizar un ANOVA de dos vías de medidas repetidas que nos arrojó valores de $p=0.0209$ y $F(4, 80)=3.071$ para la interacción; $p=0.6472$ y $F(1.908, 38.16)=0.4254$ para el tiempo; y $p=0.0072$ y $F(1,20)=8.941$ para la condición. Para identificar en dónde se encontraron los cambios observados, procedimos al método de Benjamini, Krieger y Yakutieli para comparaciones múltiples en el que encontramos valores de $p<0.05$ en los minutos 1 y 2 ($p=0.0125$ y 0.0151 ; $t=2.772$ y 2.678 ; $df=18.22$ y 18.47 para minuto 1 y 2 respectivamente) Para el final de los 5 minutos, se realizó una prueba T de Student con corrección de Welch ya que ambos grupos pasaron la prueba de normalidad (VEH $p=0.0703$ y Poly I:C $p=0.8991$ para D'Agostino y Pearson), que arrojó un valor de $p=0.2374$ con $t=1.218$ y $df=19.91$.



A



B

Figura 23. Memoria social. A) comportamiento de los ratones en la prueba por minuto. Se realizó la prueba de ANOVA de dos vías de medidas repetidas, método de Benjamini, Krieger y Yakutieli como post hoc $*p < 0.05$. B) porcentaje de tiempo que pasó el ratón prueba con el ratón novedoso. $p = 0.2374$, $t = 1.218$ y $df = 19.91$, mediante la prueba “t de Student” no pareada de dos colas. Se muestra la media y error estándar medio (SEM) y el número de sujetos se incluye dentro de la gráfica.

DISCUSIÓN

Quizá, el hallazgo más importante de la tesis sea el encontrado en la memoria social. Esperábamos encontrar una conducta disminuida, sin embargo, se encontró potenciada. Se analizaron pruebas conductuales correspondientes a los síntomas característicos de la esquizofrenia (positivos, negativos y cognitivos) en las crías macho de ratones, cuando las madres gestantes fueron retadas inmunológicamente con Poly I:C vía i.v. La conducta estereotipada es una de ellas, y al encontrarse facilitada en el grupo Poly I:C, podría indicar daños en hipocampo, al ser parcialmente dependiente de esa estructura (Deacon, 2006). A pesar de lo anterior, la prueba de memoria espacial evaluada por el laberinto en “Y” evitando el acceso a uno de los brazos durante el entrenamiento (también dependiente de hipocampo), no mostró diferencias entre los dos grupos. Además, la prueba de memoria social presenta facilitación en el grupo Poly I:C cuando lo comparamos con el grupo VEH, por lo que existen alteraciones en la memoria social, un efecto que pudiera reforzarse con otras pruebas conductuales para la memoria social, como las usadas por Hitti y Siegelbaum en 2014.

Resulta imperativo resaltar que el usar ratones macho para los experimentos proviene de estudios previos en los que demuestran sintomatología presente en los machos que no se presenta en las hembras, como por ejemplo ansiedad y afecciones en la compuerta sensorimotora (Hui et al., 2018), por lo que para la finalidad de este trabajo usamos una cepa conocida y antes estandarizada en ratones macho.

Con el fin de comprobar la bioactividad del inmunógeno Poly I:C, se cuantificaron las citocinas IL-6 y TNF- α . La IL-6 y TNF- α son citocinas proinflamatorias, crucial en la respuesta inflamatoria de fase aguda, mismas que se ven elevadas con la administración del Poly I:C al ser identificado por los macrófagos periféricos mediante los receptores tipo Toll 3 (TLR3) (Schmidt-Arras y Rose-John, 2016; Rose et al., 2017). Los valores de IL-6 obtenidos en las madres inyectadas con Poly I:C i.v. fueron muy parecidos a los encontrados por Vuillermont et al. en 2017 (resultados cercanos a los 800 pg/mL a las 4 horas de la inyección). La respuesta inmune de los ratones hembra hacia el inmunógeno es clara ya que la IL-6 se encuentra aumentada en los niveles séricos del grupo Poly I:C, comparado con el grupo VEH (figura 18A). La inyección con el inmunógeno Poly I:C se ve reflejada en aumento de los valores séricos para IL-6, TNF- α , IFN- β e IL-1 β , posterior a 3 horas. De las anteriores, IL-6 ha demostrado ser suficiente y necesaria para producir el fenotipo AIM cuando se eleva en etapas gestacionales prematuras, como lo es el equivalente al primer trimestre del embarazo en ratones (aproximadamente E9-E12), por lo que la medición sérica de IL-6 es imprescindible cuando se trata de replicar el modelo (Smith et al., 2007; Murray et al., 2015). Dado lo anterior, a pesar de no encontrar aumento en TNF- α (figura 18B), el aumento en IL-6 es suficiente para comprobar la bioactividad el Poly I:C empleado.

El modelo AIM realizado en este trabajo reproduce la conducta repetitiva alterada observada en distintos trastornos psiquiátricos, que forma parte de los síntomas positivos. Este tipo de conducta estereotipada de enterramiento es común en los ratones, sin embargo, se ve modificada por medicamentos como los ansiolíticos y es parcialmente dependiente de la función hipocampal (Deacon, 2006). Al encontrar en la literatura que la conducta cambia a lo largo de la vida del animal y puede verse alterada por condiciones en el cuarto de conducta, evitamos hacer la prueba en días de cambio de cajas y se utilizó una edad cercana a las ya antes reportada por otros investigadores, que lo evalúan entre

P60 y P80 (Schwartz et al., 2013; Hui et al., 2018). Otros autores han encontrado resultados no significativos al usar edades de 4 a 6 meses en un modelo con inyecciones de IL-6 intraperitoneal (i.p.), por lo que se decidió realizar poco antes de esa edad (Minakova et al., 2019). En otro estudio descubrieron que en lugar de facilitar la conducta la tienen deteriorada cuando inyectan Poly I:C en el día G9 y evalúan entre P30 y P40 (Vuillermont et al., 2017), por lo que tampoco tomamos esas edades. Es relevante mencionar que esta conducta presenta una correlación inversa con la densidad de espinas en este modelo, por lo que podríamos pensar en que la disminución de espinas dendríticas en corteza de este modelo podría estar afectando este tipo de conductas (Coiro et al., 2015). Al evaluar la prueba, obtuvimos aumento (figura 19A) en el número de canicas enterradas ($p < 0.05$, lo que indica que existen diferencias en ambos grupos) de estos ratones experimentales, observado previamente por otros investigadores (Schwartz et al., 2013; Wu et al., 2015; Chow et al., 2016), confirmando con esto que nuestro modelo presenta la conducta estereotipada alterada, como en la esquizofrenia.

Anteriormente se encontró en hembras inyectadas prenatalmente (en G17) con Poly I:C, pero no en machos, alteraciones en fase de toma de decisión en la tarea de laberinto en "Y" (Schroeder et al., 2019). Sin embargo, otro grupo de investigación reportó alteraciones en la memoria de reconocimiento espacial en machos en la misma prueba (Bitanhirwe et al., 2010). En nuestro modelo realizamos la tarea del laberinto en "Y" con un brazo cerrado durante el entrenamiento, en la que evaluamos la memoria espacial de nuestros animales, como indicativo de daño hipocampal, al ser dependiente de hipocampo, y que forma parte de los síntomas cognitivos en la esquizofrenia (Bitanhirwe et al., 2010, Kraeuter, Guest y Sarnyai, 2019). Los resultados no mostraron cambios entre el grupo VEH y el grupo tratado con Poly I:C ($p = 0.0616$, figura 20B), lo que indica que es posible que no exista daño en la memoria espacial, ni en el hipocampo en nuestro modelo AIM. Se consideraron las distancias totales recorridas por ambos grupos como medida de control en el que ambos grupos se comportaron igual (figura 21). Al analizar mediante ANOVA de medidas repetidas los porcentajes de tiempo en el brazo novedoso de ambos grupos cada 20 segundos, no encontramos cambios, por lo que el grupo Poly I:C pareciera no presentar alteraciones en la memoria espacial (figura 20A). Debido a que las inyecciones se realizaron en una ventana temporal distinta a la antes citada,

podríamos entender del porque no encontráramos resultados parecidos a los reportados por Schroeder et al. (2019) y Bitanhirwe et al. (2010), aunque sí muy cercanos a $p=0.05$ (0.0616). Considerando la hipótesis del curso de la esquizofrenia esquematizado en la figura 2, se esperaría encontrar anomalías en la memoria espacial en nuestro modelo, esto ya que el funcionamiento de los receptores NMDA en CA1 de hipocampo juega un papel importante en la adquisición de la memoria espacial (Bannerman et al., 2014; Sharma et al., 2019) y se encuentran dañados en el modelo AIM (Hao et al. 2019). Sin embargo, estudios anteriores demuestran daño en la memoria de trabajo en G17.5, pero no en G12.5 del modelo AIM (Connor et al., 2012), por lo que el no encontrar daños en la memoria espacial a la edad que lo analizamos, podría verse influenciado por el día gestacional empleado, ya que se sabe que cambios en el periodo gestacional pueden producir fenotipos variables en algunas conductas (Meyer et al., 2006).

Dentro de los síntomas negativos encontrados en la esquizofrenia, reducciones en la interacción social pueden ser replicadas en ratones. Nuestros resultados no demuestran cambios en la preferencia del ratón a interactuar con el ratón novedoso, comparado con el grupo control. Sin embargo, la tarea podría evocar comportamiento exploratorio y similar a la ansiedad, a pesar de tener un periodo previo de habituación, que pudiera opacar la conducta negativa (Powell y Miyakawa, 2006). Los mecanismos moleculares subyacentes en la alteración de esta conducta pueden estar relacionados con daño en corteza prefrontal demostrado en el modelo AIM y en la esquizofrenia, quizá no suficientemente marcados en nuestros ratones como para ser visualizados en la prueba realizada. Para la realización de esta tesis usamos una edad parecida a las usadas anteriormente por otros investigadores (Pendyala et al., 2017; Minakova et al., 2019), esperando encontrar en ratones adultos (P90-P114) cambios más evidentes en la conducta, aunque los resultados no mostraron cambios en la preferencia social (figura 22B). Algunos de los artículos que han demostrado reducción en la interacción social en ratones macho del modelo AIM cuando se usa Poly I:C como inmunógeno, aunque las temporalidades gestacionales en que se administraron (G12.5 y G9.5) y las edades en que se analizaron las conductas (P49-P56 y P60-P80) difieren un poco a las que usamos nosotros (Xuan y Hampson, 2014; Hui et al., 2018). Incluso en un modelo con inyecciones intraperitoneales de IL-6 como modelo de AIM, encuentran disminución en la preferencia

social cuando lo analizan en un periodo entre 4-6 meses (Minakova et al., 2019). Solamente cuando se usa LPS como inmunógeno en G12.5, no se encuentra disminución en la preferencia social en ratones macho (Xuan y Hampson, 2014). En esta prueba y en la siguiente, hicimos un gráfico del comportamiento del ratón durante la conducta para identificar el minuto de cambio para identificar su comportamiento durante toda la fase de prueba (figura 22A). No encontramos cambios de igual forma al analizar mediante ANOVA de medidas repetidas, por lo que el grupo Poly I:C no parece presentar daños en la interacción social, propios del modelo y de sujetos con esquizofrenia.

Finalmente, la conducta de memoria social presentó una alteración antes no reportada en el modelo, lo que nos puede sugerir cambios en la región CA2 de hipocampo, que como hemos indicado está relacionado con esta tarea. Se reconoce el daño cognitivo en los ratones AIM, sin embargo, cambios en la conducta de reconocimiento social sólo se han encontrado en un modelo con IL-6 inyectada, con menor porcentaje de tiempo con ratón novedoso respecto al control (Minakova et al., 2019). Encontramos, mediante la prueba ANOVA de medidas repetidas de dos factores, que el grupo Poly I:C pasó más tiempo con el ratón novedoso comparado con el VEH (figura 23A), sin embargo, esto sólo se presentó en los primeros dos minutos. Una posible causa es que diversos modelos de esquizofrenia han mostrado ser hiperactivos a nuevos entornos (Powell y Miyakawa, 2006), lo que pareciera estar potenciando la novedad social. Existen pocos estudios en los que reportan esta conducta, y la mayoría no observan cambios, uno lo hacen en un modelo con inyecciones de Poly I:C en G9.5 y lo analizaron en P60-P80, lo que pudiera estar marcando la diferencia entre ese estudio y lo que observamos nosotros (Hui et al., 2018), otro lo hacen en P49-P56 con Poly I:C en G12.5 i.p. y tampoco encuentran cambios (Xuan y Hampson, 2014). Debido a este y muchas otras variaciones en el fenotipo encontradas por diversas causas, dentro de las más importantes el día gestacional de la inyección y el inmunógeno usado, los resultados pueden o no coincidir con anteriores reportes (Kentner et al., 2019).

Una prueba conductual se puede considerar relevantes si las regiones implicadas coinciden con las dañadas en pacientes con esquizofrenia (Powell y Miyakawa, 2006). Sin embargo, difícilmente una prueba conductual es regulada por una región únicamente. En el caso de la memoria social que estudiamos en esta tesis, podrían considerarse

pocas las regiones involucradas (figura 7), lo que haría más relevantes los resultados encontrados. Además, atribuido a la heterogeneidad de un trastorno como la esquizofrenia, ningún modelo animal podría representar a toda la población de pacientes esquizofrénicos (Powell y Miyakawa, 2006), lo que no resta importancia a los resultados encontrado en esta tesis, pero sí nos ayuda a entender mejor los resultados.

CONCLUSIONES

El modelo ha replicado algunas de las conductas observadas en pacientes o en modelos para la esquizofrenia, como la conducta repetitiva y afecciones en la memoria social, correspondientes a los síntomas positivos y cognitivos respectivamente. En cuanto a los síntomas negativos, como la interacción social, no se replicó, probablemente debido al día gestacional usado para la inyección de Poly I:C, o por la edad en que se analizó. La dificultad del modelo por sí solo y el tiempo de espera para observar los cambios en la conducta, fue uno de los principales retos al replicar el modelo AIM, ya que difícilmente se obtienen todas las capas al mismo tiempo. Sin embargo, los resultados obtenidos nos han permitido avanzar y generar nuevas hipótesis, para continuar con esta línea de investigación. El tiempo en que se generen los retos inmunológicos durante la gestación puede producir fenotipos diferentes, por lo que las conductas replicadas o no, representan información novedosa. Dada la heterogeneidad en pacientes con esquizofrenia, ningún modelo para la esquizofrenia podría representar a la población total de esquizofrénicos. Faltaría analizar otras conductas dentro de los síntomas negativos para tener al menos una conducta por síntoma alterado y poder darle mayor rigidez al modelo, en cuanto a las pruebas conductuales.

REFERENCIAS

- Agnew-Blais J C, Buka AI, Fitzmaurice GM, Smoller JW, Golstein JM, Seidman LJ. 2015. Early childhood IQ trajectories in individuals later developing schizophrenia and affective psychoses in the New England family studies. *Schizophrenia Bulletin*; 41, 817–823.
- Bannerman DM, Sprengel R, Sanderson DJ, McHugh SB, Rawlins JNP, Monyer H, y Seeburg PH. 2014. Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*; 15(3), 181–192.
- Bartesaghi R, Ravasi L. 1999. Pyramidal neuron types in field CA2 of the guinea pig. *Brain Research Bulletin*; 50(4):263.273.

- Bilbo SD, Block CL, Bolton JL, Hanamsagar R, Tran PK. 2018. Beyond infection Maternal immune activation by environmental factors, microglial development and relevance for autism spectrum disorders. *Experimental Neurology*; 241-251.
- Bitanirwe BKY, Weber L, Feldon J y Meyer U. 2010. Cognitive impairment following prenatal immune challenge in mice correlates with prefrontal cortical AKT1 deficiency. *International Journal of Neuropsychopharmacology*;13:981-996.
- Brown AS, Derkits EJ. 2010. Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *American Journal of Psychiatry*; 167(3):261-80.
- Brown AS, Meyer U. 2018. Maternal immune activation and neuropsychiatric illness: A translational research perspective. *American Journal of Psychiatry*; 175(11):1073-1083.
- Cassella SN et al. 2016. Maternal immune activation alters glutamic acid decarboxylase-67 expression in the brains of adult rat offspring. *Schizophrenia research*;171(1-3):195-9.
- Cheveleyre V, Piskorowski RA. 2016. Hippocampal Area CA2 An Overlooked but Promising Therapeutic Target. *Cell Press*; 22:8.
- Chow KH, Yan Z, Wu WL. 2016. Induction of maternal immune activation in mice at mid-gestation stage with viral mimic Poly(I:C). *Journal of Visualized Experiments*; 109:e53643.
- Coiro P et al. Impaired synaptic development in a maternal immune activation mouse model of neurodevelopmental disorders. *Brain, Behavior and Immunity*; 50:249-258.
- Coley AA, Gao W-J. 2018. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism?. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*; 2;82:187-194.
- Connor CM, Dincer A, Straubhaar JR. 2012. Maternal immune activation alters behavior in adult offspring, with subtle changes in the cortical transcriptome and epigenome. *Schizophrenia research*;140(1-3):175-84.
- Correll CU, Schooler NR. 2020. Negative symptoms in schizophrenia: a review clinical guide for recognition, assessment, and treatment. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*; 16,519-534.
- Deacon RMJ. 2006. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nature Proceedings*; 1:122–124.
- Debost JP, Larsen JT, Munk-Olsen T, Mortensen PB, Meyer U, Petersen L. 2016. Joint effects of exposure to prenatal infection and peripubertal psychological trauma in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*; 43(1):171-179.
- De Houwer J, Barnes-Holmes D y Moors A. 2013. What is learning? On the nature and merits of a functional definition of learning. *Psychonomic Bulletin and Review*;20:631-642.
- Dietsche B, Kircher T, Falkenberg. 2017. Structural brain changes in schizophrenia at different stages of the illness: a selective review of longitudinal magnetic resonance imaging studies. *The Australian and New Zealand journal of Psychiatry*;51(5):500-508.
- Dudek SM, Alexander GM, Farris S. 2016. Rediscovering area CA2: unique properties and functions. *Neuroscience*; 17:89-102.

- Estes ML, McAllister AK. 2016. Maternal immune activation: implications for neuropsychiatric disorders. *Science*; 353(6301), 772-777
- Ferrero LM, Pérez I, Gómez EI, Loynaz C, Rodriguez A. 2004. Algunas características anatómicas del encéfalo del esquizofrénico. *Revista Cubana Investigación Biomédica*;23(3):163-8.
- Frankland P. W., & Bontempi, B. 2005. The organization of recent and remote memories. *Nature Reviews Neuroscience*; 6(2), 119–130.
- Giovanoli S, Weber-Stadlbauer U, Schedlowski M, Meyer U, Engeler H. 2016. Prenatal immune activation causes hippocampal synaptic deficits in the absence of overt microglia anomalies. *Brain, Behavior and Immunity*; 55:25-38.
- Glausier JR, Lewis DA. 2013. Dendritic spine pathology in schizophrenia. *Neuroscience*; (251):90-107.
- Hantsoo L, Kornfield S, Anguera MC, Epperson CN. 2018. Inflammation: A proposed intermediary between maternal stress and offspring neuropsychiatric risk. *Biological Psychiatry*; 0:1-10.
- Hao K et al. 2019. Prenatal immune activation induces age-related alterations in rat offspring: Effects upon NMDA receptors and behaviors. *Behavioral Brain Research*;310:111946.
- Helton TD, Zhao M, Farris S, Dudek SM. 2019. Diversity of dendritic morphology and entorhinal cortex synaptic effectiveness in mouse CA2 pyramidal neurons. *Hippocampus*;29(2):78-92.
- Hill RA, Klug M, Von Soly SS, Binder MD, Hannan AJ, Van Den Buuse M. 2014. Sex-specific disruptions in spatial memory and anhedonia in a “Two Hit” rat model correspond with alterations in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and signaling. *Hippocampus*; 24:1197-1211.
- Hitti FL, Siegelbaum SA. 2014. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*; 508(7494):88-92.
- Hui CW, St-Pierre A, El Hajj H, Remy Y, Hébert SS, Luheshi GN., Srivastava LK, Tremblay ME. 2018. Prenatal immune challenge in mice leads to partly sex-dependent behavioral, microglial, and molecular abnormalities associated with schizophrenia. *Frontiers in Molecular Neuroscience*; 11(13):1-14.
- Jašarević E, Rodgers AB, Bale TL. 2015. A novel role for maternal stress and microbial transmission in early life programming and neurodevelopment. *Neurobiology of Stress*; 1,1:81-88.
- Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Order J, Woodgett JR. 2011. Assessment of social interaction behaviors. *Journal of Visualized Experiments*; (48):e2473.
- Kauselmann G, Weiler M, Jessberger S, Konietzko U, Staubli U, Bereiter-Hahn J, Strebhardt K, Kuhl D. 1999. The polo-like protein kinases Fnk and Snk associate with a Ca²⁺ and integrin-binding protein and are regulated dynamically with synaptic plasticity. *The EMBO Journal*; 18(20):5528-5539.
- Kentner AC, Bilbo SD, Brown AS, Hsiao EY, McAllister AK, Meyer U, Pearce BD, Pletnikov MV, Yolken RH, Bauman MD. 2019. Maternal immune activation: reporting guidelines to improve the rigor, reproducibility, and transparency of the model. *Neuropsychopharmacology*; 44(2):245-258.

- Kim HJ, Cho MH, Shim WH, Kim JK, Jeon EY, Kim DH, Yoon SY. 2016. Deficient autophagy in microglia impairs synaptic pruning and causes social behavioral defects. *Molecular Psychiatry*; 00:1-9.
- Knable MB, Barci BM, Webster MJ, Meador-Woodruff J, Torrey EF. 2004. Molecular abnormalities of the hippocampus in severe psychiatric illness: postmortem findings from the Stanley Neuropathology Consortium. *Molecular Psychiatry*; (9)609-620.
- Knuesel I, Chicha L, Brituschgi M, Scott A, Shobel A, Bodmer M, Hellings JA, Toovey S, Prinssen P. 2014. Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nature Review Neurology*; 10(11):643-60.
- Kraeuter AK, Guest PC, Sarnyai Z. 2019. The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. *Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols, Methods in Molecular Biology*; 1916(10):105-111.
- Law AJ, Weickert CS, Hyde TM, Kleinman JE, Harrison PJ. 2004. Reduced spinophilin but not microtubule-associated protein 2 expression in the hippocampal formation in schizophrenia and mood disorders: molecular evidence for a pathology of dendritic spines. *American Journal of Psychiatry*; 161:1848-1855.
- Li Q, Cheung C, Wei R, Hui ES, Feldon J, Meyer U, Chung S, Chua SE, Sham PC, Wu EX, McAlonan GM. 2009. Prenatal immune challenge is an environmental risk factor for brain and behavior change relevant to schizophrenia: evidence from mri in a mouse model. *PLoS ONE*; 4(7):e6354.
- Liu Q, Chen MX, Sun L, Wallis CU. 2019. Rational use of mesenchymal stem cells in the treatment of autism spectrum disorders. *World J Stem Cells*; 11(2):55.72.
- Lombardo MV, Moon HM, Su J, Palmer TD, Courchesne E, Pramparo T. 2017. Maternal immune activation dysregulation of the fetal brain transcriptome and relevance to the pathophysiology of autism spectrum disorder. *Molecular Psychiatry*; 0:1-13.
- Malkova NV, Yu CZ, Hsiao EY, Moore MJ, Patterson PH. 2012. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain Behavior Immun*; 26(4):607-616.
- Mallya AP, Deutch AY. 2018. (Micro)Glia as Effectors of cortical volume loss in schizophrenia. *Schizophrenia in Translation*; 44(5):948-957.
- Marrón, EM, Adrover-Roig, D, Sánchez-Cubillo I, Miranda R, Periañez J. 2013. Bases neuroanatómicas del aprendizaje y la memoria. *Editorial UOC*; 10:63-94
- Meyer U, Feldon J, Dammann O. 2011. Schizophrenia and autism: both shared and disorder-specific pathogenesis via perinatal inflammation?. *Pediatric Research*, 69(5 Pt 2), 26R–33R.
- Meyer U, Feldon J, Schedlowski M, Yee BK. 2005. Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*; 29(6), 913–947.
- Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Shedlowski M, Knuesel I Yee BK, Feldon J. 2006. The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *The Journal of Neuroscience*; 26(18):4752-4762.
- Meyer U, Nyffeler M, Yee BK, Knuesel I, Feldon J. 2008a. Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. *Brain, Behavior and Immunity*; 22:469-486.

- Meyer U, Nyffeler M, Schwendener S, Knuesel I, Yee BK, Feldon J. 2008b. Relative prenatal and postnatal maternal contributions to schizophrenia-related neurochemical dysfunction after in utero immune challenge. *Neuropsychopharmacology*; 33:441-456.
- Minakova E, Lang J, Medel-Matus J-S, Gould GG, Reynolds A, Shin D, et al. 2019. Melanotan-II reverses autistic features in a maternal immune activation mouse model of autism. *PLoS ONE*;14(1): e0210389.
- Moyer CE, Shelton MA, Sweet RA. 2015. Dendritic spine alterations in schizophrenia. *Neuroscience*; 601:46-53.
- Murphy SK, Fineberg AM, Maxwell SD, Alloy LB, Zimmermann L, Krigbaum NY, Cohn BA, Drabick DAG, Ellman LM. 2017. Maternal infection and stress during pregnancy and depressive symptoms in adolescent offspring. *Psychiatry Research*; 257:102-110.
- Murray C et al. 2015 Interdependent and independent roles of type I interferons and IL-6 in innate immune, neuroinflammatory and sickness behaviour responses to systemic poly I:C. *Brain, Behavior, and Immunity*;48:274-286.
- Nelson MD, Saykin AJ, Flashman LA, Riordan JH. 1998. Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: A meta-analytic study. *Arch Gen Psychiatry*; 55:433–440.
- Okuyama T. 2018. Social memory engram in the hippocampus. *Neuroscience Research*; 129:17-23
- Okuyama T, Kitamura T, Roy D, Itohara S y Tonegawa S. 2016. Ventral CA1 neurons store social memory. *Science*; 353(6307):1536-1541.
- Organización Mundial de la Salud. 2019. Schizophrenia. Recuperado de: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>.
- Orhan F, Fatouros-Bergman H, Gojny M, Malmqvist A, Piehl F; Karolinska, Schizophrenia Project (KaSP) Consortium, Cervenka S, Collste K, Victorsson P, Sellgren CM, Flyckt L, Erhardt S, Engberg G. 2017. CSF GABA is reduced in first-episode psychosis and associates to symptom severity. *Molecular Psychiatry*; 00:1-7.
- Patterson PH. 2011. Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends in Molecular Medicine*;17(7):1471-389-394.
- Pineda E, Shin D, Jeong You S, Auvin S, Sankar R, Mazarati A. 2013. Maternal immune activation promotes hippocampal kindling epileptogenesis in mice. *Annal of Neurology*; 74(1):11-19 .
- Piskorowski RA, Nasrallah K, Diamantopoulou A, Mukai J, Hassan SI, Siegelbaum SA, Gogos JA, Cheveleyre V. 2016. Age-dependent specific changes in área CA2 of the hippocampus and social memory déficit in a mouse model of 22q11.2 deletion syndrome; *Neuron*; 89(1):163-176.
- Powell CM, Miyakawa T. 2006. Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? *Biological Psychiatry*;59(12):1198-1207.
- Prata J, Santos SG, Almeida MI, Coehlo R, Barbosa MA. 2017. Bridging Autism Spectrum Disorders and Schizophrenia through inflammation and biomarkers- pre-clinical and clinical investigations. *Journal of Neuroinflammation*;14:179.
- Robert V, Cassim S, Cheveleyre V, Piskorowski R. 2017. Hippocampal area CA2: Properties and contribution to hippocampal function. *Cell and Tissue Research*. 373(3):523-540.

- Rose DR, Careaga M, Van de Water J, McAllister K, Bauman MD, Ashwood P. 2017. Long-term altered immune responses following fetal priming in a non-human primate model of maternal immune activation. *Brain, Behavior and Immunity*; 63, 60–70.
- Schmidt-Arras D, Rose-John S. 2016. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *Journal of Hepatology*; 64(6):1403-1415.
- Schroeder A, Nakamura JP, Hudson M, Jones NC, Du X, Sundram S y Hill RA. 2019. The raloxifene recovers effects of prenatal immune activation on cognitive task-induced gamma power. *Psychoneuroendocrinology*; 110(104448).
- Schwartz JJ, Careaga M, Onore CE, Rushakoff JA, Berman RF, & Ashwood P. 2013. Maternal immune activation and strain specific interactions in the development of autism-like behaviors in mice. *Translational Psychiatry*; 3(3) e240.
- Scola G, Duong A. 2017. Prenatal maternal immune activation and brain development with relevance to psychiatric disorders. *Neuroscience. Canadá*;403-408.
- Sharma S, Rakoczy S y Brown-Borg H. 2019. Assessment of spatial memory in mice. *Life Science*; 87(17-18): 521–536.
- Smith SEP, Li J, Garbett K, Mirnics K y Patterson PH. 2007. Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development Through interleukin-6. *Journal of Neuroscience*; 27(40):10695-702.
- Sommer I, Bearden C, van Dellen E, Breetvelt EJ, Duijff SN, Maijer K, et al. 2016. Early interventions in risk groups for schizophrenia: what are we waiting for? *Nature Partner Journals- Schizophrenia*; 2, 16003.
- Stevenson EL, Caldwell HK. 2014. Lesions to the CA2 region of the hippocampus impair social memory in mice. *European Journal Neuroscience*; 40(9):3294-301
- Stoner R, Chow ML, Boyle MP, Sunkin SM, Mouton PR, Roy S, et al. 2014. Patches of disorganization in the neocortex of children with autism. *New England Journal Medicine*; 370:1209-1219.
- Vuillermont S, Luan W, Meyer U, Eyles D. 2017. Vitamin D treatment during pregnancy prevents autism-related phenotypes in a mouse model of maternal immune activation. *Molecular Autism*; 8:9.
- Wagstyl K, Ronan L, Whitaker KJ, Goodyer IM, Roberts N, Crow TJ, Fletcher PC. 2016. Multiple markers of cortical morphology reveal evidence of supragranular thinning in schizophrenia. *Translational Psychiatry*; 6:e780.
- Weir RK, Forghany R, Smith EP, Patterson PH, McAllister AK, Schumann CM, Bauman MD. 2015. Aberrant neuron morphology in a nonhuman primate model of maternal immune activation. *Brain Behavior Immunity*; 48:139-146.
- Woodberry KA, Giuliano AJ y Seidman LJ. 2008. Premorbid IQ in schizophrenia: a meta-analytic review. *The American Journal of Psychiatry*;165:579-587.
- Wu WL, Adams CE, Stevens KE, Chow KH, Freedman R, & Patterson PH. 2015. The interaction between maternal immune activation and alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor in regulating behaviors in the offspring. *Brain, Behavior and Immunity*; 46, 192–202.
- Xuan ICY, Hampson DR. 2014. Gender-dependent effects of maternal immune activation on the behavior of mouse offspring. *PLoS ONE*;9(8):e104433.
- Young-A L, Yu-Jeong K, Yukiori G. 2016. Cognitive and affective alterations by prenatal and postnatal stress interactions. *Physiology & Behavior*;165(2016):146-153.

- Zhang Y, Catts VS, Sheedy D, McCrossin T, Kril JJ, Weickert CS. 2016. Cortical grey matter volume reduction in people with schizophrenia is associated with neuro-inflammation. *Translational Psychiatry*; 6:e982.
- Zuckerman L, Rehavi M, Nachman R, Weiner I. 2003. Immune activation during pregnancy in rats leads to a postpubertal emergence of disrupted latent inhibition, dopaminergic hyperfunction, and altered limbic morphology in the offspring: a novel neurodevelopmental model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*; 28:1778-1789.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Cambios en espinas dendríticas en esquizofrenia..... | 3 |
| Figura 2. Hipótesis del curso de la esquizofrenia | 4 |
| Figura 3 Formación hipocampal e inmunohistoquímica en cerebro del modelo murino del síndrome de delección 22q11.2, para esquizofrenia. | 5 |
| Figura 4. Formación hipocampal y aferencias y eferencias de las neuronas en CA2..... | 6 |
| Figura 5. Diferentes tipos de plasticidad sináptica, de una neurona piramidal CA2 | 7 |
| Figura 6. Tipos de neuronas encontradas en CA2.. | 9 |
| Figura 7. Engrama de la memoria social. | 10 |
| Figura 8. División de los tipos de memoria y las regiones cerebrales involucradas en cada una de ellas. | 11 |
| Figura 9. Modelo estándar de consolidación. | 12 |
| Figura 10. Mecanismo de acción del Poly I:C..... | 13 |
| Figura 11. Línea del tiempo del desarrollo encefálico, entérico y del sistema inmune en humano..... | 15 |
| Figura 12. Modelo de desarrollo intrauterino con las anomalías producidas por los estresores durante la Activación Inmune Maternal (AIM) | 15 |
| Figura 13. Factores de riesgo para el desarrollo de desórdenes del sistema nervioso central..... | 16 |
| Figura 14. Diseño experimental global. | 21 |
| Figura 15. Caja habitación de ratón en donde se muestra la colocación de las 20 canicas antes de colocar al ratón. | 23 |
| Figura 16. Imagen tomada del programa SMART del laberinto en “Y” | 24 |
| Figura 17. Prueba de interacción y memoria social | 25 |
| Figura 18. Niveles séricos de IL-6 y TNF- α | 26 |
| Figura 19. Resultados de la prueba de enterramiento de canicas..... | 27 |
| Figura 20. Laberinto en “Y” | 28 |
| Figura 21. Distancia recorrida en el laberinto en “Y”..... | 29 |
| Figura 22. Interacción social. | 30 |
| Figura 23. Memoria social..... | 32 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Comportamientos del ratón de relevancia potencial para los signos y síntomas de la esquizofrenia. | 18 |
|--|----|

| | | | |
|---|---|---------------------|---------------------|
|  | Procedimiento Estándar Operativo | Procedimiento No. | 1 |
| Título Conducta de enterramiento de canicas | | Versión Emisión | |
| Realizado por: Zyanya Gloria Mena Casas | | Fecha de aprobación | Página ___ de ___ 3 |
| Aprobado por: Dra. Sofía Yolanda Día Miranda | | | |

ANEXOS

Procedimiento Estándar Operativo (SOP)

I. **PRUEBA CONDUCTUAL DE ENTERRAMIENTO DE CANICAS**

1. **Objetivo**

- 1.1. Realizar la conducta de enterramiento de canicas para evaluar la conducta repetitiva en un modelo de esquizofrenia.

2. **Alcance**

- 2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y estudiantes del laboratorio C-02 de Neuromorfometría y Desarrollo del Instituto de Neurobiología de la UNAM

3. **Responsabilidades**

- 3.1. El uso de bata y guantes como equipo de seguridad es obligatorio durante todo el proceso.

4. **Materiales**

- 4.1. Cajas limpias de policarbonato 27 x 16.5 x 12.5 (proporcionadas por bioterio).
- 4.2. Aserrín previamente esterilizado (proporcionado por bioterio).
- 4.3. Veinte canicas de vidrio coloreados de 15 mm de diámetro (grava decorativa para acuario marca PETCO).
- 4.4. Bitácora y pluma.
- 4.5. Tapas de policarbonato transparentes y agujeradas (proporcionadas por bioterio).
- 4.6. Ratones macho de la cepa C57BL6J de 90 días de nacidos.

5. **Equipo**

- 5.1. Cronómetro.
- 5.2. Cámara de video marca Steren.
- 5.3. Luxómetro marca Steren.
- 5.4. Atenuador de luz integrado en el cuarto donde se hará la conducta.

6. **Procedimiento**

| | | | |
|---|--|---------------------|---|
|  | Procedimiento Estándar Operativo | Procedimiento No. | 1 |
| Título Conducta de enterramiento de canicas | | Versión Emisión | |
| | | Página ___ de ___ 3 | |
| Realizado por: Zyanya Gloria Mena Casas | Aprobado por: Dra. Sofía Yolanda Día Miranda | Fecha de aprobación | |

- 6.1. Manipular los ratones desde por lo menos 5 días previos a la conducta un aproximado de 5 minutos diarios.
- 6.2. Atenuar la luz del cuarto en 20 luxes. Es importante el realizar la prueba en la fase oscura dentro del horario de 9 am a 4 pm (en cuarto con luz invertida donde la luz se apaga de 8am a 8pm).
- 6.3. Colocar una cama plana de aserrín de 5 cm en cada jaula usada.
- 6.4. Colocar un ratón en cada caja y taparlas con la tapa transparente.
- 6.5. Grabar con la cámara de video durante 5 minutos (fase de habituación).
- 6.6. Regresar los ratones a sus jaulas, identificando bien a qué caja corresponden.
- 6.7. Volver a aplanar la cama de aserrín y colocar las veinte canicas en la caja en una disposición 4 x 5 manteniendo uniformidad y equidistancia.
- 6.8. Colocar nuevamente los ratones a su caja correspondiente y grabar durante 10 minutos.
- 6.9. Retirar a los ratones y contar el número de canicas enterradas (el criterio es que esté al menos $\frac{3}{4}$ partes de la canica bajo el aserrín).
- 6.10. Es posible realizar varias pruebas simultáneas, sin interferencia entre ellas, y el uso de la misma caja para varios ratones si se aplanan de forma adecuada la cama de aserrín entre cada ratón.

7. Material de apoyo

- 7.1. Esquema del acomodo de las canicas en la caja.



| | | | |
|---|--|---------------------|---|
|  | Procedimiento Estándar Operativo | Procedimiento No. | 1 |
| Título Conducta de enterramiento de canicas | | Versión Emisión | |
| | | Página ___ de ___ 3 | |
| Realizado por: Zyanya Gloria Mena Casas | Aprobado por: Dra. Sofía Yolanda Día Miranda | Fecha de aprobación | |

8. Bibliografía

- 8.1. Angoa-Pérez M, Kane MJ, Briggs DI, Francescutti DM, Kuhn DM. 2013. Marble Burying and Nestlet Shredding as Tests of Repetitive, Compulsive-like Behaviors in Mice. *Journal of Visualized Experiments.*;82:e50978.
- 8.2. Coiro P et. Al. 2015. Impaired synaptic development in a maternal immune activation mouse modelo of neurodevelopmental disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*;50:249-258.
- 8.3. Deacon RMJ. 2006. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nature Protocols*;1:122–124.

| | | | |
|---|--|---------------------|---|
| | Procedimiento Estándar Operativo | Procedimiento No. | 2 |
| Título Laberinto en "Y" | | Versión Emisión | |
| | | Página ___ de __3__ | |
| Realizado por: Zyanya Gloria Mena Casas | Aprobado por: Dra. Sofía Yolanda Día Miranda | Fecha de aprobación | |

II. PRUEBA DE LABERINTO EN "Y"

1. Objetivo

- 1.1. Analizar la conducta, dependiente de hipocampo, del laberinto en "Y" para evaluar la memoria de reconocimiento espacial en ratón

2. Alcance

- 2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y estudiantes del laboratorio C-02 de Neuromorfometría y Desarrollo del Instituto de Neurobiología de la UNAM

3. Responsabilidades

- 3.1. El uso de bata y guantes como equipo de seguridad es obligatorio durante todo el proceso.

4. Materiales

- 4.1. Laberinto en "Y" de acrílico transparente con las siguientes medidas: 50 x 9 x 10 cm, largo x ancho x alto y brazos equidistantes a un ángulo de 120°
- 4.2. 4 puertas oscuras ajustables al laberinto
- 4.3. Aserrín previamente esterilizado (proporcionado por bioterio).
- 4.4. Bitácora y pluma.
- 4.5. Pistas espaciales
- 4.6. Alcohol al 70%
- 4.7. Ratones macho de la cepa C57BL6J de 98 días de nacidos.

5. Equipo

- 5.1. Cronómetro.
- 5.2. Cámara de video marca Steren.
- 5.3. Luxómetro marca Steren.
- 5.4. Atenuador de luz integrado en el cuarto donde se hará la conducta.

6. Procedimiento

- 6.1. Manipular los ratones desde por lo menos 5 días previos a la conducta un aproximado de 5 minutos diarios cada uno.
- 6.2. Atenuar la luz del cuarto en 20 luxes. Es importante el realizar la prueba en la fase oscura dentro del horario de 9 am a 4 pm (en cuarto con luz invertida donde la luz se apaga de 8am a 8pm).

| | | | |
|---|---|--|--|
|  | Procedimiento Estándar Operativo | Procedimiento No. | 2 |
| Título Laberinto en "Y" | | Versión Emisión | |
| Realizado por: Zyanya Gloria Mena Casas | | Aprobado por: Dra. Sofía Yolanda Día Miranda | Fecha de aprobación Página ___ de __3__ |

- 6.3. Poner una cama ligera de aserrín por dentro, en la base del laberinto.
- 6.4. Colocar una puerta oscura impidiendo el paso a uno de los brazos del laberinto.
- 6.5. Colocar pistas espaciales en las cuatro paredes del cuarto, de diferentes tamaños y formas y que queden a la altura del laberinto.
- 6.6. Colocar al ratón en el laberinto.
- 6.7. Grabar con la cámara de video durante 5 minutos (fase de habituación).
- 6.8. Regresar los ratones a sus jaulas, identificando bien a qué caja corresponden.
- 6.9. Alejar la jaula del cuarto de conducta durante 15 minutos.
- 6.10. Tirar el aserrín del laberinto y limpiarlo con una solución de alcohol al 70% para evitar dejar rastros de olor.
- 6.11. Colocar nuevamente al ratón en el laberinto quitando previamente la puerta oscura que impedía el paso al brazo.
- 6.12. Grabar durante 2 minutos y sacar a los ratones del laberinto al finalizar.

7. Material de apoyo

- 7.1. Esquema del laberinto utilizado:



| | | | |
|---|---|--|--|
|  | Procedimiento Estándar Operativo | Procedimiento No. | 2 |
| Título Laberinto en "Y" | | Versión Emisión | |
| Realizado por: Zyanya Gloria Mena Casas | | Aprobado por: Dra. Sofía Yolanda Día Miranda | Fecha de aprobación Página ___ de __3__ |

8. Bibliografía

- 8.1. Bitanihirwe BKY, Weber L, Feldon J y Meyer U. 2010. Cognitive impairment following prenatal immune challenge in mice correlates with prefrontal cortical AKT1 deficiency. *International Journal of Neuropsychopharmacology*;13:981-996.
- 8.2. Kraeuter AK, Guest PC y Sarnyai Z. 2019. The Y-maze for Assessment of Spatial Working and Reference Memory in Mice. *Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols, Methods in Molecular Biology*;1916(10):105-111.
- 8.3. Schroeder A, Nakamura JP, Hudson M, Jones NC, Du X, Sundram S y Hill RA. 2019. The raloxifene recovers effects of prenatal immune activation on cognitive task-induced gamma power. *Australia. Psychoneuroendocrinology*;110(104448)

| | | | |
|---|--|---------------------|---|
| | Procedimiento Estándar Operativo | Procedimiento No. | 3 |
| Título Interacción y Memoria Social | | Versión Emisión | |
| | | Página ___ de ___ | 3 |
| Realizado por: Zyanya Gloria Mena Casas | Aprobado por: Dra. Sofía Yolanda Día Miranda | Fecha de aprobación | |

III. PRUEBA DE INTERACCIÓN Y MEMORIA SOCIAL

1. Objetivo

- 1.1. Realizar la conducta de interacción y memoria social en ratones machos de la cepa C57BL6J en un modelo de esquizofrenia.

2. Alcance

- 2.1. Este protocolo aplica a todos los investigadores y estudiantes del laboratorio C-02 de Neuromorfometría y Desarrollo del Instituto de Neurobiología de la UNAM.

3. Responsabilidades

- 3.1. El uso de bata y guantes como equipo de seguridad es obligatorio durante todo el proceso.

4. Materiales

- 4.1. Ratones macho de la cepa C57BL6J de 98 días de nacidos de los grupos experimentales y control, así como dos ratones ajenos al experimento de la misma edad y sexo que nunca haya tenido contacto con los grupos anteriores (ratón novedoso).
- 4.2. Bitácora y pluma.
- 4.3. Alcohol 10%
- 4.4. Aserín estéril (proporcionado por bioterio).

5. Equipo

- 5.1. Cámara de video marca Steren.
- 5.2. Luxómetro marca Steren.
- 5.3. Atenuador de luz integrado en el cuarto donde se hará la conducta.
- 5.4. Laberinto de plexiglás transparente que consiste en tres brazos idénticos (50 × 9 × 10 cm, largo × ancho × alto), que irradian desde una zona central triangular (cada lado 8 cm), y que contienen compuertas agujeradas desplegadas en cada brazo.

6. Procedimiento

- 6.1. Manipular los ratones desde por lo menos 5 días previos a la conducta un aproximado de 5 minutos diarios por cada ratón.

| | | | |
|---|--|---------------------|---|
|  | Procedimiento Estándar Operativo | Procedimiento No. | 3 |
| Título Interacción y Memoria Social | | Versión Emisión | |
| | | Página ___ de ___ 3 | |
| Realizado por: Zyanya Gloria Mena Casas | Aprobado por: Dra. Sofía Yolanda Día Miranda | Fecha de aprobación | |

- 6.2. Atenuar la luz del cuarto en 20 luxes. Es importante el realizar la prueba en la fase oscura dentro del horario de 9 am a 4 pm (en cuarto con luz invertida).
- 6.3. Colocar una cama ligera de aserrín en el laberinto cerrando dos de los brazos con compuertas agujeradas en forma de jaula.
- 6.4. Colocar al ratón en el brazo sin jaula (brazo inicial) y grabar la exploración durante 5 minutos (fase de habituación).
- 6.5. Pasados los 5 minutos, colocar al ratón novedoso en uno de los brazos con jaula y grabar durante 5 minutos (fase de interacción social).
- 6.6. Después de ese tiempo, colocar otro ratón novedoso en la jaula previamente vacía y grabar durante 5 minutos (fase de memoria social). El ratón novedoso de la fase anterior pasa a ser ratón familiar.
- 6.7. Sacar los ratones y analizar los videos en el software SMART, considerando tiempo de exploración con el ratón novedoso, tiempo en brazo vacío, porcentaje de ambos tiempos y distancia total recorrida.
- 6.8. Es importante quitar el aserrín y limpiar con alcohol al 70% entre cada prueba con diferente ratón experimental.

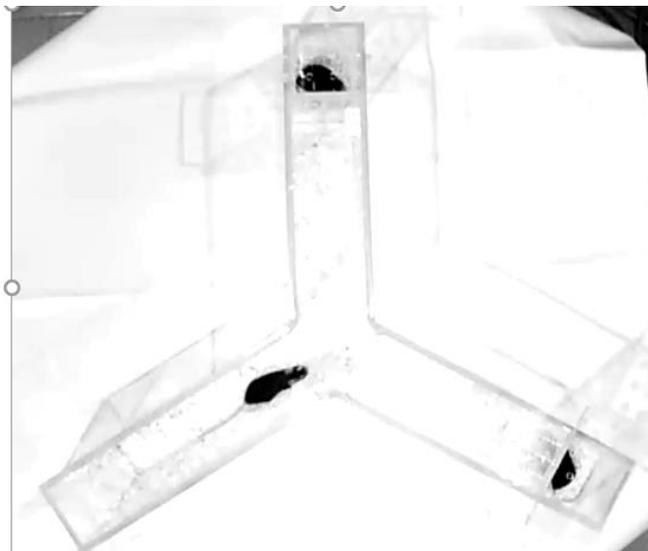
7. Material de apoyo

- 7.1. Esquema del laberinto. Jaulas transparentes arriba y a la derecha, ratón novedoso a la derecha y ratón experimental en exploración arriba en la primera fase (interacción social)

| | | | |
|---|---|---------------------|---------------------|
|  | Procedimiento Estándar Operativo | Procedimiento No. | 3 |
| Título Interacción y Memoria Social | | Versión Emisión | |
| Realizado por: Zyanya Gloria Mena Casas | | Página ___ de ___ 3 | Fecha de aprobación |
| Aprobado por: Dra. Sofía Yolanda Día Miranda | | | |



7.2. Esquema del laberinto en la fase de memoria social. Arriba ratón novedoso y a la derecha ratón familiar.



| | | | |
|---|--|---------------------|---|
|  | Procedimiento Estándar Operativo | Procedimiento No. | 3 |
| Título Interacción y Memoria Social | | Versión Emisión | |
| | | Página ___ de ___ 3 | |
| Realizado por: Zyanya Gloria Mena Casas | Aprobado por: Dra. Sofía Yolanda Día Miranda | Fecha de aprobación | |

8. Bibliografía

- 8.1. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Order J, Woodgett JR. 2011. Assessment of Social Interaction Behaviors. Journal of Visualized Experiments;(48):e2473.
- 8.2. Vuillermont S, Luan W, Meyer U, Eyles D. 2017. Vitamin D treatment during pregnancy prevents autism-related phenotypes in a mouse model of maternal immune activation. Molecular Autism;8:9.