



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



**ADMINISTRACIÓN PRENATAL DE KETAMINA EN RATAS:  
IMPLICACIÓN EN LOS MODELOS ANIMALES DE ESQUIZOFRENIA**

Trabajo Especial de Grado realizado por  
el **Br. Carlos Coronel**, ante la ilustre  
Universidad de Carabobo para optar por  
el título de Licenciado en Biología.

Tutor: **Dr. Renny Pacheco Calderon.**

VALENCIA, AGOSTO DE 2016



UNIVERSIDAD DE CARABOBO  
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



**ACTA**

Mediante la presente se deja constancia que el (la) **Br. Carlos Coronel**, Cédula de Identidad N° **20.787.085**, presentó ante el Jurado aprobado por el Consejo de Departamento de Biología de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (FACYT) de la Universidad de Carabobo, su Trabajo Especial de Grado (T.E.G.), titulado: "Administración prenatal de ketamina en ratas: implicación en los modelos animales de esquizofrenia", en concordancia con los artículos 16, 17, 18 y 19 de las Normas de Interés Estudiantil. El jurado evaluador consideró que, luego de haber aprobado dicho trabajo el (la) bachiller cumple con los méritos académicos necesarios para obtener el Título de Licenciado en Biología.

En Valencia, a los veintisiete días del mes de Septiembre del año dos mil dieciseis.

**Prof. Renny Pacheco**  
Tutor

**Prof. Carmen Andara**  
Jurado Principal

**Prof. Rossana Bosco**  
Jurado Principal



**Dedicado a mis padres, a  
mi hermana, y a toda mi  
inmensa familia. Gracias  
por estar siempre**

## **AGRADECIMIENTOS**

Primeramente, agradezco inmensamente a mi familia por todo su apoyo y comprensión. Agradezco a mi papá por ser un fuerte soporte durante todos mis años de estudio en la Universidad de Carabobo (UC), por su ayuda en el diseño de los laberintos, y por todas las veces que con paciencia me llevaba a la universidad a trabajar en mis experimentos, y a asistir a mis clases. A mi mamá por su consideración, deliciosos postres, por cada taza de café en la merienda y por el tiempo dedicado en leer y revisar gran parte del manuscrito. A mi hermana (casi Psicólogo) por las sugerencias y consejos sobre lo que respecta a la esquizofrenia y a los trastornos psicóticos en general. Agradezco además a mis abuelos, tíos y primos de la gran familia Coronel-Oliveros por su interés y buenos deseos.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la colaboración del personal técnico y docente del Lab. I, II, IV, VI y VIII del Departamento de Biología. Agradezco al profesor Mario Palacios (Facyt) por su asesoría en estadística y consejos. A mi tutor, el profesor Renny Pacheco, por la confianza depositada en mi trabajo, por el tiempo dedicado a la resolución de los diversos problemas que surgieron durante el desarrollo de la tesis, y por su interés en mi formación en el área de la neurociencia. Doy gracias igualmente a Anakarina Bello por su colaboración en el Lab. VIII, Laboratorio de Neurociencias y Comportamiento (LabNec) y animalario del Departamento de Biología.

Fuera de la Facyt, debo agradecer hondamente al Instituto de Biología Molecular de Parásitos (BioMolP) de la FCS de la UC, en especial a la Dra. Emilia Barrios y al Ldo. Ángel Castillo por su asesoría y apoyo técnico en la estandarización de los protocolos histológicos del presente trabajo. Asimismo, agradezco a Silvia Guidotti, veterinaria del Bioterio Central de la FCS, por la facilitación de algunos animales para pruebas preliminares, así como de jaulas y otros materiales.

Agradezco a todos mis profesores por contribuir a mi formación como Ldo. en Biología de la Facyt, y a todos los miembros del LabNec por el apoyo conjunto para la elaboración de los distintos proyectos llevados a cabo en el laboratorio.

Por último, estoy agradecido con todos mis amigos por los buenos ratos y el tiempo grato en estos años de vida universitaria. Agradezco especialmente a Valeria Montilla por el diseño de algunas de las figuras del manuscrito.

## RESUMEN

La esquizofrenia es un trastorno neuropsiquiátrico complejo, caracterizado principalmente por alucinaciones y delirios (síntomas positivos), desmotivación, depresión y afectividad plana (síntomas negativos), y deficiencias en la atención y memoria declarativa (síntomas cognitivos). Afecta al 1% de la población mundial y posee una alta prevalencia asociada, además de ser de avance diacrónico. Los modelos animales para el estudio de la esquizofrenia, si bien son numerosos, presentan limitaciones por el grado multifactorial de la enfermedad. En el presente estudio se pretende vislumbrar el efecto de la manipulación farmacológica prenatal sobre el neurodesarrollo, y su implicación en los modelos de esquizofrenia. Para ello, se administró la droga ketamina, un antagonista de receptores NMDA, al término de la segunda semana de gestación en ratas. El tratamiento consta de inyecciones intramusculares consecutivas del fármaco (60 mg/kg/h) manteniendo un estado medio de anestesia durante 3 h. Posteriormente, se estudió el comportamiento de los machos de la progeie a las 4 semanas (juveniles) y 10 semanas (adultos) del nacimiento. Las características morfológicas del hipocampo de las ratas adultas se analizaron con una tinción de Nissl. Las ratas juveniles sometidas al tratamiento presentaron una desinhibición e hiperactividad prematuras, posible consecuencia de una maduración temprana de los circuitos corticales y subcorticales del cerebro. Una vez llegadas a adultas, las ratas mostraron déficits cognitivos según la prueba de alternación espontánea, ansiedad según la prueba de campo abierto, depresión según la prueba de nado forzado, y agresividad y retraimiento social según la prueba de interacción social. El análisis histológico del hipocampo en las ratas adultas no muestra diferencias significativas en la densidad celular en las regiones CA1 y CA3, más sí se observa una disminución del grosor de la capa de células piramidales en la región CA3. Estos resultados apuntan a un fenotipo robusto de esquizofrenia, producto de la manipulación farmacológica prenatal del receptor NMDA.

**Palabras clave:** CA3, dopamina, glutamato, neurodesarrollo, NMDA, psicosis.

## ABSTRACT

Schizophrenia is a complex neuropsychiatric disorder, characterized by hallucinations and delusions (positive symptoms), demotivation, depression and flat affect (negative symptoms), and impairments in attention and declarative memory (cognitive symptoms). Affects 1% of world's population, with a high prevalence associated and diachronic advance. Animal models of schizophrenia, even if are numerous, have limitations because of the multifactorial property of the disease. In the present study it's pretended to elucidate the effect of prenatal pharmacologic manipulation in neurodevelopment, and its implication on animal models of schizophrenia. For that, ketamine, a NMDA receptor's antagonist, was applied at the end of the second week of gestation in rats. The treatment consisted on consecutive intramuscular injections of the drug (60 mg/kg/h) maintaining a state between light and deep anesthesia for 3 h. Later, it was studied the male offspring's behavior at 4 weeks (juveniles) and 10 weeks (adults) since birth. The morphologic characteristics of hippocampus were analyzed with a Nissl stain. The juvenile rats exposed to the treatment showed premature disinhibition and hyperactivity, possible consequence of early maturation of cortical and subcortical brain circuits. Once they reached the adult period, the animals showed cognitive impairments in spontaneous alternation test, anxiety in open field test, depression in forced swim test, aggressive behavior and social withdrawal in social interaction test. The histological analysis of the adult rat's hippocampus didn't show significant differences on cell density in CA1 and CA3 regions. However, a reduction in CA3 pyramidal cell layer deep was observed. These results suggest a robust phenotype of schizophrenia, product of prenatal pharmacologic manipulation of the NMDA receptor.

**Keywords:** CA3, dopamine, glutamate, neurodevelopment, NMDA, psychosis.

## ÍNDICE TEMÁTICO

I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
III. JUSTIFICACIÓN .....	6
IV. OBJETIVOS.....	10
V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	11
5.1. Neurotransmisión glutamatérgica .....	11
5.2. El trastorno esquizofrénico.....	14
5.3. Validez general de los modelos animales .....	25
5.4. Trasladando los síntomas clínicos a los modelos animales .....	27
5.5. Ketamina .....	30
5.6. Efecto de la ketamina y la anestesia sobre el neurodesarrollo.....	38
VI. MATERIALES Y MÉTODOS .....	45
6.1. Animales de ensayo.....	45
6.2. Pruebas conductuales .....	47
6.3. Histología del hipocampo.....	54
6.4. Análisis estadístico.....	59
VII. RESULTADOS .....	62
7.1. Respuesta a la anestesia .....	62
7.2. Cambio en el peso de las crías.....	62
7.3. Pruebas conductuales .....	62
7.4. Pruebas multivariadas.....	73
7.5. Histología del hipocampo dorsolateral .....	75
VIII. DISCUSIÓN .....	79
8.1. Diferencias entre juveniles y adultos: patrón normal de comportamiento .....	79
8.2. Disminución del peso de las crías.....	91
8.3. Efecto del tratamiento con ketamina sobre el comportamiento .....	92
8.4. Patrón de comportamiento general .....	105
8.5. Efecto del tratamiento con ketamina en la formación del hipocampo.....	109
8.6. Consideraciones finales .....	119
IX. CONCLUSIONES .....	121
X. RECOMENDACIONES .....	122
XI. REFERENCIAS.....	123
XII. ANEXOS .....	141

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución de los síntomas de la esquizofrenia.....	15
Figura 2. Factores de riesgo más comunes para la esquizofrenia.....	17
Figura 3. Sensibilización del sistema dopaminérgico .....	22
Figura 4. Modelo de producción de un episodio psicótico .....	23
Figura 5. Validez de los modelos de esquizofrenia .....	27
Figura 6. Estructura química de la ketamina.....	31
Figura 7. Efecto de la ketamina sobre la actividad neuronal en el SNC .....	35
Figura 8. Esquema de trabajo general.....	47
Figura 9. Diseño estructural del laberinto en T.....	49
Figura 10. Diseño y variables de la prueba de campo abierto.....	51
Figura 11. Diseño y variables de la prueba de nado forzado.....	55
Figura 12. Anatomía del hipocampo .....	58
Figura 13. Estructuras visibles en una tinción de Nissl.....	60
Figura 14. Peso de las crías.....	63
Figura 15. Alternación espontánea en el laberinto en T .....	64
Figura 16. Actividad general en la prueba de campo abierto.....	65
Figura 17. Patrón de desplazamiento en el campo abierto .....	67
Figura 18. Levantamientos ( <i>rearing behavior</i> ) en la prueba de campo abierto .....	69
Figura 19. Comportamiento de aseo ( <i>grooming behavior</i> ) en la prueba de campo abierto .....	70
Figura 20. Patrón de comportamiento en la prueba de interacción social.....	71
Figura 21. Actividad en la prueba de nado forzado .....	72
Figura 22. Agrupamientos por escalamiento métrico no multidimensional .....	74
Figura 23. Cerebro lavado y fijado .....	76
Figura 24. Histología del hipocampo dorsolateral .....	76
Figura 25. Tinción de Nissl del hipocampo dorsolateral .....	78
Figura 26. Conectividad dentro del hipocampo.....	110
Figura 27. Simplificación del circuito del hipocampo en la esquizofrenia.....	114
Figura 28. Hipótesis del efecto de la ketamina durante el estadio prenatal.....	118

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Síntomas clínicos de la esquizofrenia y su relación con los modelos animales .....	30
Tabla 2. Rutina de deshidratación, aclaración e impregnación para muestras de tejido nervioso .....	58
Tabla 3. Rutina de tinción de Nissl con azul de metileno para tejido nervioso .....	59
Tabla 4. Resumen de las correlaciones entre las variables conductuales con la actividad locomotora .....	73
Tabla 5. Resumen de los resultados de las pruebas de comportamiento.....	105
Tabla 6. Síntomas clínicos de la esquizofrenia y su correspondencia con los cambios en el comportamiento de los animales sometidos al tratamiento prenatal con ketamina .....	106

## I. INTRODUCCIÓN

La esquizofrenia es el trastorno psiquiátrico de mayor severidad conocido. Afecta la percepción del individuo del mundo exterior, sus habilidades cognitivas, sociales y el estado emocional general. Se estima que afecta al 1% de la población mundial, con una relativamente alta prevalencia asociada (Lewis & Lieberman, 2000; van Os & Kapur, 2009).

El trastorno es de avance diacrónico, con aseveración de los síntomas con el transcurso del tiempo, hecho coligado a la desregulación de las vías de neurotransmisión y de una neurodegeneración progresiva. Los pacientes esquizofrénicos suelen tener una expectativa de vida entre 12-15 años menor que el promedio de la población. Las muertes son atribuidas tanto al suicidio como al incremento de rutinas de riesgo (cigarrillos, alcoholismo, drogadicción, mala alimentación, sedentarismo) (Saha *et al.*, 2007).

La sintomatología de la esquizofrenia comprende cuatro ejes o síntomas principales (Konopaske & Coyle, 2015): síntomas positivos (delirios, alucinaciones), negativos (depresión, desmotivación, aislamiento social), cognitivos (aprendizaje y memoria), y afectivos (ansiedad, manía, embotellamiento afectivo).

La esquizofrenia es tratada con una diversa gama de antipsicóticos. Los primeros en desarrollarse, denominados antipsicóticos típicos, actúan como antagonistas de receptores dopaminérgicos D<sub>2</sub>. Los segundos, o atípicos, son menos selectivos para estos receptores y tienen selectividad adicional para receptores serotoninérgicos del tipo 5-HT<sub>2A</sub> (5-HT: 5-hidroxitriptamina). Si bien, estos antipsicóticos permiten tratar los síntomas positivos del trastorno, presentan reducido poder para contrarrestar los síntomas cognitivos y negativos. Adicionalmente, producen diversos efectos adversos (Lieberman *et al.*, 2005; Keefe *et al.*, 2007). Esta problemática exalta la necesidad de desarrollar nuevos antipsicóticos y terapias eficaces.

Los estudios preclínicos, en los cuales se prueba la eficacia de nuevos fármacos, compuestos, tratamientos o terapias, se llevan a cabo en animales. La efectividad de un modelo animal radica en qué tan cercano a la realidad (del trastorno en humanos) se encuentra tal modelo. La esquizofrenia, por ser un trastorno extremadamente heterogéneo, ve dificultada su “simulación” en animales (Lewis & Lieberman, 2000; van Os & Kapur, 2009). Asimismo, su carácter de trastorno neuropsiquiátrico complica el estudio de la sintomatología en otros organismos. En otras palabras, ¿cómo trasladar a un modelo animal alteraciones de un fenómeno tan complejo como puede ser el comportamiento humano?

La ketamina, un anestésico de uso común en medicina veterinaria, actúa como inhibidor no competitivo de receptores de glutamato del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) (Wolff & Winstock, 2006). Es una droga disociativa, capaz de producir episodios psicóticos en humanos (Cohen *et al.*, 1962; Krystal *et al.*, 1994; Wolff & Winstock, 2006). El uso de ketamina como droga de abuso se ha relacionado con el desarrollo de diversos trastornos psiquiátricos, entre ellos la esquizofrenia (Ebert *et al.*, 2012). En sustento a sus efectos sobre los receptores NMDA, han surgido diversos modelos de esquizofrenia basados en la administración de ketamina y otras drogas relacionadas (Mouri *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2011). Estos modelos se basan en el paradigma de la hipofunción glutamatérgica de la esquizofrenia.

El trastorno esquizofrénico, por su carácter complejo y heterogéneo, no puede delimitarse a un problema en la regulación de la neurotransmisión como causa principal y única. Una mejor comprensión de su origen llevó a la formulación de la hipótesis del neurodesarrollo: existen genes de riesgo para la esquizofrenia que, ligados a eventos adversos durante el desarrollo y al estrés psicosocial en etapas posteriores de la ontogenia, pueden llevar al padecimiento del trastorno (Lewis & Levitt, 2002; Howes & Murray, 2014). Así, el presente estudio pretende evaluar el efecto de la administración prenatal de ketamina en ratas sobre el neurodesarrollo, y qué implicaciones podría tener este tratamiento sobre los modelos animales basados en la hipótesis del desarrollo neuronal de la esquizofrenia. Asimismo, se pretende inquirir sobre las implicaciones del uso de la ketamina en la anestesia obstétrica y pediátrica.

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los modelos animales son de gran utilidad en la investigación destinada a entender los mecanismos fisiopatológicos de las enfermedades humanas, así como en el diseño de nuevas terapias que puedan contrarrestar la sintomatología. Como consecuencia de ello, han surgido diversos modelos en respuesta a la búsqueda de una teoría que explique los mecanismos moleculares del trastorno esquizofrénico, cuáles son sus posibles causas, principales factores de riesgo, y desarrollo de nuevas drogas y terapias que permitan tratar dicho trastorno.

La mayoría de los modelos animales de esquizofrenia se enfocan en la desregulación del sistema dopaminérgico. De esto deriva el hecho de que casi la totalidad de las drogas efectivas disponibles en la actualidad actúen como antagonistas de receptores de dopamina (Costall & Naylor, 1995). Inclusive, muchos de los fármacos existentes actualmente poseen mecanismos de acción similares a los fármacos desarrollados a partir de los años 50 (Howes *et al.*, 2009). Como los modelos basados en la manipulación directa del sistema dopaminérgico tienen un potencial heurístico limitado, se ha enlentecido el avance de la búsqueda de nuevos fármacos (Lipska, 2004). De allí surge la necesidad de desarrollar nuevos modelos que simulen los síntomas del trastorno esquizofrénico real de la forma más precisa posible.

Actualmente, uno de los principales problemas en el estudio de la esquizofrenia es que no existe un modelo estándar o ideal que simule toda la sintomatología del trastorno psiquiátrico (Jones *et al.*, 2011). Esto es debido a que no hay un genotipo válido, un fenotipo celular o marcador biológico característico del desorden, en conjunto con la dificultad de reproducir los síntomas cognitivos y emocionales de las enfermedades humanas en modelos animales (Lipska & Weinberger, 2000). Se estima que, aproximadamente, existen unos 87 modelos animales distintos de esquizofrenia (Yanagi *et al.*, 2011) en cuatro categorías principales de acuerdo a la metodología empleada para producir el trastorno: modelos basados en la manipulación genética, administración de drogas, lesiones cerebrales y modelos basados en la manipulación durante el desarrollo neuronal (formación de estructuras, circuitos, sinapsis).

Aunque existe una gran variabilidad fenotípica asociada al trastorno esquizofrénico, en un modelo animal adecuado de esquizofrenia deben observarse cambios característicos, por lo general en la adolescencia, tales como pérdida de conectividad y funcionalidad en el hipocampo y corteza cerebral, desregulación del sistema límbico dopaminérgico, hipofunción glutamatérgica cortical, vulnerabilidad al estrés, aislamiento social, deterioro cognitivo y respuesta anormal al sistema de otorgamiento de recompensas (Jones *et al.*, 2011). En líneas generales, un modelo adecuado de esquizofrenia debe permitir: 1) poner a prueba la veracidad de las teorías existentes; 2) poder dar explicación a los nuevos descubrimientos biológicos del trastorno; 3) dilucidar los mecanismos que conllevan al desarrollo de la esquizofrenia; y 4) permitir el diseño de nuevos tratamientos efectivos (Lipska & Weinberger, 2000; Meyer & Feldon, 2010; Jones *et al.*, 2011).

El primero de todos los modelos farmacológicos de esquizofrenia corresponde al modelo basado en la administración de anfetamina, el cual fue desarrollado en base a la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia (Murray *et al.*, 2008). Si bien este modelo puede producir de forma efectiva los síntomas positivos (alucinaciones, delirios) del trastorno, falla en producir parte de la sintomatología de los síntomas negativos y cognitivos (Jones *et al.*, 2011). Es de importancia mencionar que los síntomas, en los modelos animales de esquizofrenia, se estudian con pruebas que no necesariamente tienen una relación directa o explícita con los síntomas clínicos. En la sección 5.4 se hará mención sobre la relación del fenotipo observado en los modelos animales, y su relación con los síntomas en pacientes esquizofrénicos. Una descripción más detallada de estos síntomas se presenta en la sección 5.2.

El surgimiento de la hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia abre campo al desarrollo de nuevos antipsicóticos y modelos farmacológicos basados en la hipofunción de los receptores de glutamato del tipo N-metil-D-aspartato (NMDA). Los modelos que actúan a nivel de los receptores NMDA se agrupan como modelos basados en la fenciclidina (PCP), donde entra el fármaco ketamina; inducen delirios y alucinaciones en sujetos sanos, de la misma forma que se observaría en personas esquizofrénicas (Cohen *et al.*, 1962; Krystal *et al.*, 1994).

Una crítica a estos modelos es que la intervención se realiza en el estadio adolescente y adulto del animal, siendo este hecho no compatible con la hipótesis del neurodesarrollo de la esquizofrenia (Jones *et al.*, 2011). Un modelo que se adapta a la hipótesis del neurodesarrollo consiste en la administración de PCP en el estadio neonatal, donde todavía ocurren cambios importantes en el desarrollo neuronal. Este modelo en neonatos ha demostrado producir cambios marcados en el comportamiento llegada la adultez (Mouri *et al.*, 2007).

¿En qué se cimientan los modelos basados en el neurodesarrollo? ¿Cuál representa su utilidad? La base de estos modelos radica en que complicaciones obstétricas, como bajo peso al nacer, intervención por cesárea, hipoxia, exposición prenatal a infecciones, y otros riesgos prenatales y perinatales, están asociados con un incremento de la susceptibilidad de desarrollar esquizofrenia (Lewis & Levitt, 2002). Algunos de estos modelos, como el modelo de administración de acetato de metilazoximetanol (MAM) o modelo gestacional con MAM, modelos de infección viral y bacteriana, y el modelo de PCP en neonatos, han permitido simular los síntomas positivos, negativos y cognitivos del trastorno esquizofrénico. Otra ventaja de estos modelos, es que permiten realizar pruebas de comportamiento, electrofisiológicas y neuroquímicas sin el sesgo producido por intervenciones quirúrgicas y alteraciones neuroquímicas consecuencia de la administración de drogas (como en los modelos farmacológicos). Empero, estos modelos no están exentos de fallos por lo que es necesaria la búsqueda de nuevos modelos enmarcados en el neurodesarrollo (Jones *et al.*, 2011).

Diversos estudios muestran que la administración de ketamina, PCP y de otras drogas relacionadas durante el embarazo pueden desencadenar trastornos neurobiológicos. Por ello, se plantea la viabilidad de la intervención farmacológica durante el estadio prenatal mediante la administración de ketamina durante el período gestacional, como punto de partida para el desarrollo de modelos de esquizofrenia con validez y precisión, basados en la teoría del neurodesarrollo del trastorno esquizofrénico.

### III. JUSTIFICACIÓN

La esquizofrenia constituye un desorden neuropsiquiátrico complejo: posee componentes genéticos, sociales y fisiológicos (Lewis & Lieberman, 2000; van Os & Kapur, 2009). Se estima que afecta, aproximadamente, al 1% de la población mundial. A pesar de su baja incidencia (15.2/100000 hab.) su prevalencia es relativamente alta (7.2/1000 hab.), volviéndose crónica en el individuo adulto. Afecta las habilidades sociales y cognitivas, con una mayor mortalidad asociada (directa o indirectamente) que el cáncer y otras dolencias físicas (Saha *et al.*, 2007). La esquizofrenia no afecta la salud mental solamente; los pacientes que padecen el trastorno suelen vivir entre 12 y 15 años menos que el promedio de la población, cifra que ha crecido progresivamente en las últimas décadas. Aunque algunas muertes son atribuidas al suicidio, la principal causa de mortalidad se atribuye a una disminución del acceso a los servicios médicos, y a un incremento de la frecuencia de rutinas de riesgo (sedentarismo, mala alimentación, fumar, consumo de drogas) (Saha *et al.*, 2007).

La esquizofrenia constituye una carga social de elevado peso, tanto a nivel humano como monetario (van Os & Kapur, 2009). Las personas con esquizofrenia son desmedidamente pobres, tienen oportunidades limitadas de empleo, y son dependientes de programas públicos para acceder a los servicios especializados de salud (Mueser *et al.*, 2001; Slade *et al.*, 2001). En las poblaciones de pacientes de bajos ingresos, el mayor gasto monetario consecuencia de la condición socioeconómica de los pacientes puede disminuir el presupuesto destinado a la prevención (Lohr *et al.*, 1986) y a la prescripción de medicamentos (Stuart & Zacker, 1999), acentuando la sintomatología en los afectados (Brook *et al.*, 1983). De esta forma, es necesario el desarrollo de terapias y medicamentos efectivos, en conjunto con programas de salud inclusivos enfocados tanto en el tratamiento como en la prevención.

Los síntomas positivos son tratados con una gama variada de antipsicóticos de primera y segunda generación. Sin embargo, estos antipsicóticos no muestran eficacia a la hora de tratar los síntomas negativos y cognitivos (Lieberman *et al.*, 2005; Keefe *et al.*, 2007). Es necesario

entonces el desarrollo de nuevos compuestos, en conjunto con la terapéutica adecuada, que demuestren poder manejar a la par los síntomas positivos, negativos y cognitivos. El desarrollo de nuevas terapias, no obstante, se ve limitado por la capacidad de los modelos animales existentes de simular de forma valedera la sintomatología del trastorno esquizofrénico en su totalidad.

A diferencia de enfermedades como la diabetes y la hipercolesterolemia, dónde existen modelos animales bastante precisos con una alta capacidad traslacional en humanos, la esquizofrenia es un trastorno extremadamente heterogéneo. Constituye una enfermedad mental multifactorial producto de un neurodesarrollo alterado, con componentes genéticos, y muy influenciada por factores ambientales (Lewis & Lieberman, 2000; van Os & Kapur, 2009). Todo esto complica el diagnóstico y tratamiento del trastorno esquizofrénico, así como el desarrollo de modelos de alta fidelidad.

Los modelos basados en el neurodesarrollo, si bien no están libres de fallas, poseen una gran validez y aceptación, lo que los hace buenos candidatos para el desarrollo de nuevas terapias y compuestos que permitan tratar la sintomatología del trastorno en su totalidad. Son además útiles herramientas para la comprensión y estudio de los mecanismos neurobiológicos de la esquizofrenia.

Un punto importante en el desarrollo de nuevos modelos es la validez social de los mismos. Se ha mencionado que los modelos basados en el neurodesarrollo se fundamentan en que complicaciones obstétricas pueden aumentar el riesgo de padecer un trastorno esquizofrénico en el futuro (Lewis & Levitt, 2002). Así, la ketamina es usada como droga de abuso por el público, incluyendo mujeres embarazadas (Rofael *et al.*, 2003). Adicionalmente, entre el 0.75 y 2% de las mujeres embarazadas requieren de cirugía debido a complicaciones del embarazo u otros problemas de salud (Goodman, 2002). Este porcentaje se incrementa paulatinamente, resultado posiblemente del refinamiento de los procedimientos laparoscópicos y de la cirugía fetal (Cheek & Baird, 2009).

Los anestésicos de uso común actúan por dos mecanismos: 1) aumento de la inhibición producida por la señalización vía receptores GABA<sub>A</sub> (p.e., benzodiazepinas, barbituratos, propofol, etomidato, isoflurano, enflurano, y halotano); y 2) disminución de la señalización vía receptores NMDA (p.e., ketamina, NO<sub>2</sub> y xenon) (Franks & Lieb, 1994). Estudios preclínicos sugieren que muchos de los anestésicos usados comúnmente, entre ellos la ketamina, son neurotóxicos y afectan el desarrollo neurológico de roedores y primates (Jevtovic-Todorovic *et al.*, 2003; Slikker *et al.*, 2007; Brambrink *et al.*, 2012). Estos datos se ven reforzados por estudios clínicos que muestran una correlación entre el uso de anestesia y/o la exposición a una intervención quirúrgica en mujeres embarazadas con problemas de aprendizaje futuros en los infantes luego del nacimiento (Kalkman *et al.*, 2009; Hansen *et al.*, 2011; Ing *et al.*, 2012). Asimismo, son pocos los reportes enfocados en los efectos de la anestesia general en el neurodesarrollo del feto y sus consecuencias luego del nacimiento (Slikker *et al.*, 2007; Palanisamy *et al.*, 2011; Kong *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2016).

En base a lo expuesto en los párrafos anteriores, el presente estudio tuvo como finalidad principal evaluar los efectos neurobiológicos de la ketamina durante el proceso gestacional en ratas. Más que proponer el uso de la ketamina en una dosis aguda fuerte (como en el caso de un tratamiento anestésico prolongado) a manera de un modelo de esquizofrenia, se busca dar un primer paso en las implicaciones de la manipulación farmacológica del receptor NMDA durante el neurodesarrollo, y vincularlas al trastorno esquizofrénico. Aunque numerosos modelos de esquizofrenia se han propuesto hasta los momentos, muchos se han desarrollado en función de la utilidad práctica del mismo o sin considerar la teoría del neurodesarrollo en el núcleo del modelo, la cual ha tenido un auge en épocas recientes. El objetivo se centra entonces en dirigir los futuros modelos de esquizofrenia en la manipulación del receptor NMDA durante una de las etapas más delicadas del desarrollo ontogenético: el período prenatal.

Se espera que el presente estudio ayude a la elaboración de modelos más acordes a las teorías actuales del origen del trastorno esquizofrénico, que sean precisos y con una alta capacidad traslacional en humanos, de forma que faciliten la inventiva de nuevas drogas y terapias eficaces. Todo esto, ligado a modelos adaptados a una problemática social real, como puede ser el consumo de drogas en mujeres embarazadas, o su administración como anestesia en los casos donde exista la necesidad de una intervención quirúrgica por motivos de salud.

## **IV. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo general**

- Estudiar las posibles alteraciones neurobiológicas, relacionadas con la esquizofrenia, de la administración de ketamina en ratas durante el período gestacional.

### **4.2. Objetivos específicos**

- Inducir un fenotipo esquizofrénico en la progeñie por medio de la administración de ketamina al término de la segunda semana de gestación en ratas.
- Evaluar los posibles cambios en el comportamiento de los animales experimentales por medio de pruebas conductuales.
- Analizar a nivel morfológico las posibles alteraciones del hipocampo dorsolateral en el cerebro de los animales sometidos al tratamiento con ketamina.
- Comparar el desarrollo neurobiológico de las ratas en el estadio juvenil y en la adultez temprana.

## V. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 5.1. Neurotransmisión glutamatérgica

El glutamato es el neurotransmisor más importante para la función normal del encéfalo (Hayashi, 1954). Casi todas las neuronas del sistema nervioso central son glutamatérgicas y se estima que más del 50% de todas las sinapsis del encéfalo liberan este agente. Desempeña un papel fundamental en la neurología clínica dado que concentraciones elevadas de glutamato, producto de alguna lesión nerviosa o desregulación de los sistemas de neurotransmisión, tienen un efecto excitotóxico sobre las células del sistema nervioso central (Purves *et al.*, 2004).

El glutamato es un aminoácido no esencial que no atraviesa la barrera hematoencefálica y, por lo tanto, debe ser sintetizado en las neuronas a partir de precursores locales. El precursor más importante es la glutamina, que es liberada por las células gliales. Una vez liberada, la glutamina es captada por las terminaciones presinápticas y metabolizada a glutamato por la enzima mitocondrial glutaminasa. El glutamato también puede ser sintetizado por la transaminación del 2-oxoglutarato, un intermediario del ciclo de los ácidos tricarbónicos.

El glutamato sintetizado en el citoplasma de las neuronas presinápticas es empaquetado en vesículas sinápticas por transportadores denominados VGLUT (*vesicular glutamate transporter*; transportador vesicular de glutamato). Una vez liberado, el glutamato es eliminado de la hendidura sináptica por los EAATs (*excitatory amino acid transporter*; transportador de aminoácidos excitatorios), presentes en células gliales y terminaciones sinápticas. El glutamato captado por las células gliales es convertido en glutamina por la acción de la glutamina sintetasa; la glutamina es transportada luego fuera de las células gliales y hacia el interior de las terminaciones nerviosas. Esta secuencia de acontecimientos en conjunto se denomina ciclo del glutamato-glutamina.

Existen seis tipos principales de receptores de glutamato. Tres de ellos son ionotrópicos: receptores NMDA, receptores AMPA, y receptores de cainato. Derivan sus nombres de los agonistas que los activan: N-metil-D-aspartato (NMDA), alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA), y ácido caínico, respectivamente. Los receptores de glutamato ionotrópicos son canales catiónicos selectivos que permiten el paso de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y, en el caso de los receptores NMDA, de  $\text{Ca}^{+2}$  (en menor medida). Producen potenciales excitatorios y, debido a su permeabilidad para el  $\text{Ca}^{+2}$ , juegan un papel importante en los procesos de señalización celular en las neuronas. Los otros tres restantes son receptores glutamatérgicos metabotrópicos (mGluR). Estos receptores modulan los canales iónicos postsinápticos de forma indirecta, mediante procesos de señalización celular (Purves *et al.*, 2004).

Los efectos de la desregulación del sistema glutamatérgico en la esquizofrenia están bien documentados. En pacientes esquizofrénicos se observa una disminución de los niveles de glutamato y aumento de los niveles de glutamina en la corteza frontal, a medida que envejecen, como producto de la afectación del ciclo glutamina-glutamato. Esto produce desensibilización de las vías de neurotransmisión por glutamato, lo que ocasiona además disminución de la neurotransmisión por ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), principiante vía receptores  $\text{GABA}_A$  (en interneuronas gabaérgicas activadas por glutamato), y un posible daño neuronal asociado a éstas alteraciones en la neurotransmisión (Marsman *et al.*, 2013).

### **5.1.1. Receptores NMDA: estructura y función**

Siete genes codifican para cada una de las subunidades de los receptores NMDA (NR1A, NR2A-2D y NR3A-B); cada una de estas subunidades posee más de 900 residuos de longitud (Traynelis *et al.*, 2010). Los receptores propiamente dichos son heterotetrámeros conformados por dos copias de las subunidades NR1 y NR2, principalmente. Los receptores NMDA se activan con la unión conjunta de glicina o D-serina en la subunidad NR1, y L-glutamato en la subunidad NR2, además de la remoción de un átomo de magnesio (que bloquea el poro del canal) por la despolarización de la membrana (Mayer *et al.*, 1984).

La apertura de los receptores NMDA conlleva a la despolarización de la neurona postsináptica por influjo de  $\text{Na}^+$ , pero desencadena también cascadas de señalización celular como producto de la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a la célula. Estas cascadas de señalización controlan la fuerza de la conectividad neuronal y juegan un papel determinante en la neuroplasticidad.

Las subunidades de los receptores NMDA contienen dominios modulares que son responsables de controlar sus distintas funciones. El dominio amino terminal contribuye a controlar la probabilidad de apertura del canal iónico y velocidad de desactivación; puede ser regulado alostéricamente por zinc (NR2A y NR2B), ifenprodilo (NR2B), poliaminas (NR2B), entre otros compuestos. En el dominio de unión a ligandos se unen los diferentes agonistas y antagonistas que controlan la apertura del canal. El dominio transmembrana forma el canal iónico heterotetramérico. Por último, el dominio carboxilo terminal está asociado a proteínas postsinápticas, las cuales facilitan la señalización celular fundamental para la neuroplasticidad (Traynelis *et al.*, 2010).

### **5.1.2. Papel de los receptores NMDA en la plasticidad sináptica a largo plazo**

Muchas sinapsis en el sistema nervioso central de los mamíferos muestran formas duraderas de plasticidad sináptica, las cuales se han relacionado con cambios duraderos en el comportamiento, propios de proceso de aprendizaje y memoria. Algunos patrones de actividad sináptica en el sistema nervioso central producen un aumento prolongado en la fuerza sináptica conocido como potenciación a largo plazo, mientras que otros patrones de actividad generan una disminución prolongada de la fuerza sináptica, denominada depresión a largo plazo. Ambos son términos amplios que sólo describen la dirección del cambio en la fortaleza sináptica: los mecanismos moleculares que subyacen tales cambios pueden ser muy diversos.

Se cree que los receptores NMDA juegan un papel importante en la plasticidad sináptica a largo plazo. Dentro del hipocampo, un tren de estímulos de alta frecuencia en los colaterales de Schaffer (axones de células piramidales en la región CA3 del hipocampo con aferencias en

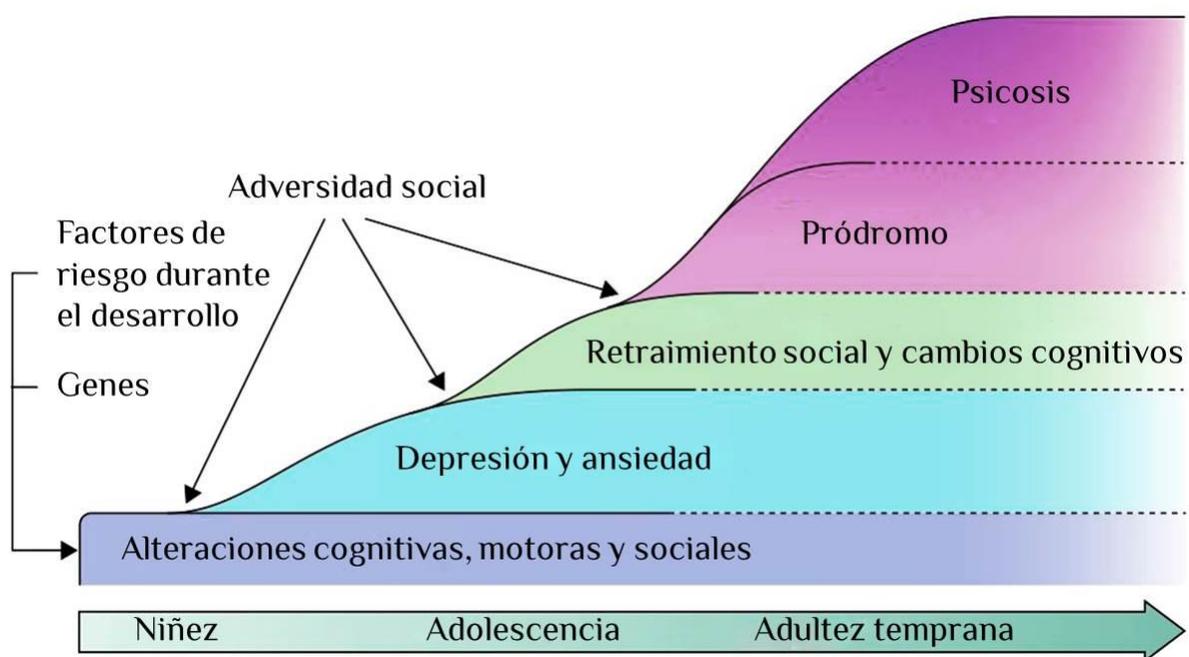
la región CA1 del mismo), conlleva al fortalecimiento (potenciación) a largo plazo de la transmisión sináptica. Esta plasticidad a largo plazo se ha asociado a los procesos de aprendizaje y memoria (Kessels & Malinow, 2009). El aumento de las concentraciones de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular activa diversas proteincinasas: la proteincinasa II dependiente de  $\text{Ca}^{+2}$ /calmodulina (CaMKII), la proteincinasa C (PKC), y la proteincinasa A (PKA), principalmente. Estas proteínas actúan en la fosforilación a nivel de sustrato, desencadenando procesos de transcripción en la célula que conllevan al aumento de la densidad de receptores AMPA (Citri & Malenka, 2008). El aumento de la densidad de estos receptores aumenta la sensibilización de la neurona postsináptica al glutamato, y se cree que este aumento en la densidad es la causa del fenómeno de potenciación a largo plazo (Kerchner & Nicoll, 2008).

La desregulación del sistema glutamatérgico afecta los procesos de plasticidad sináptica a largo plazo. Un diverso número de enfermedades psiquiátricas están vinculadas con el incremento y disminución de la actividad de los receptores NMDA. Entre estas se incluyen el Alzheimer, trastornos del estado de ánimo, enfermedad de Huntington, psicosis tóxica (debido al consumo de drogas y sustancias psicoactivas), lupus eritematoso sistémico neuropsiquiátrico (inflamación en regiones del cerebro como resultado de una respuesta inmunológica alterada), y esquizofrenia (Lakhan *et al.*, 2013). La relación de la neurotransmisión glutamatérgica con este último trastorno psiquiátrico se detallará más adelante.

## **5.2. El trastorno esquizofrénico**

La esquizofrenia es una enfermedad neuropsiquiátrica crónica, caracterizada por psicosis, aislamiento social, desmotivación, y problemas cognitivos. Se estima que afecta al 1% de la población mundial (Lewis & Lieberman, 2000; van Os & Kapur, 2009). Perturba múltiples ámbitos de la vida del individuo, como las relaciones personales, desempeño laboral, cuidado personal y educación. La enfermedad empieza a desarrollarse en la adolescencia y adultez temprana mediante el surgimiento de los síntomas prodrómicos (Fig. 1), los cuales constituyen el conjunto de síntomas previos al desarrollo de la enfermedad. Tal fase es seguida de los

primeros episodios psicóticos, punto a partir del cual el avance de la patología es progresivo, con aseveración de la sintomatología con el transcurso del tiempo. La expectativa de vida de los afectados por el trastorno se ve disminuida unos 12-15 años, no solo como resultado del suicidio, sino también por el desarrollo de hábitos perjudiciales para la salud (sedentarismo, obesidad, alcoholismo, consumo de drogas, consumo de cigarrillos) (Saha *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Evolución de los síntomas de la esquizofrenia. Adaptada de Howes & Murray (2014).

La esquizofrenia se caracteriza por un fenotipo que abarca cuatro síntomas principales (Konopaske & Coyle, 2015):

**a) Síntomas positivos:** comprenden los síntomas asociados a la psicosis. El término positivo se refiere un exceso o distorsión del comportamiento normal, o una manifestación más activa del comportamiento anormal. Incluyen alucinaciones, delirios, y disfunción mental general. Las alucinaciones constan de experiencias sensoriales en ausencia de un estímulo externo. Pueden ser visuales, táctiles, gustativas, y auditivas (el caso más común). Los delirios se refieren a la creencia de ideas falsas, manteniendo el individuo una posición firme de

defensa de estas ideas, incluso ante una clara evidencia contradictoria. La disfunción mental puede manifestarse como desorden del pensamiento, comunicación verbal dificultada, comportamiento extraño (estereotipado), y pérdida de conectividad con el mundo exterior (estado “disociado”).

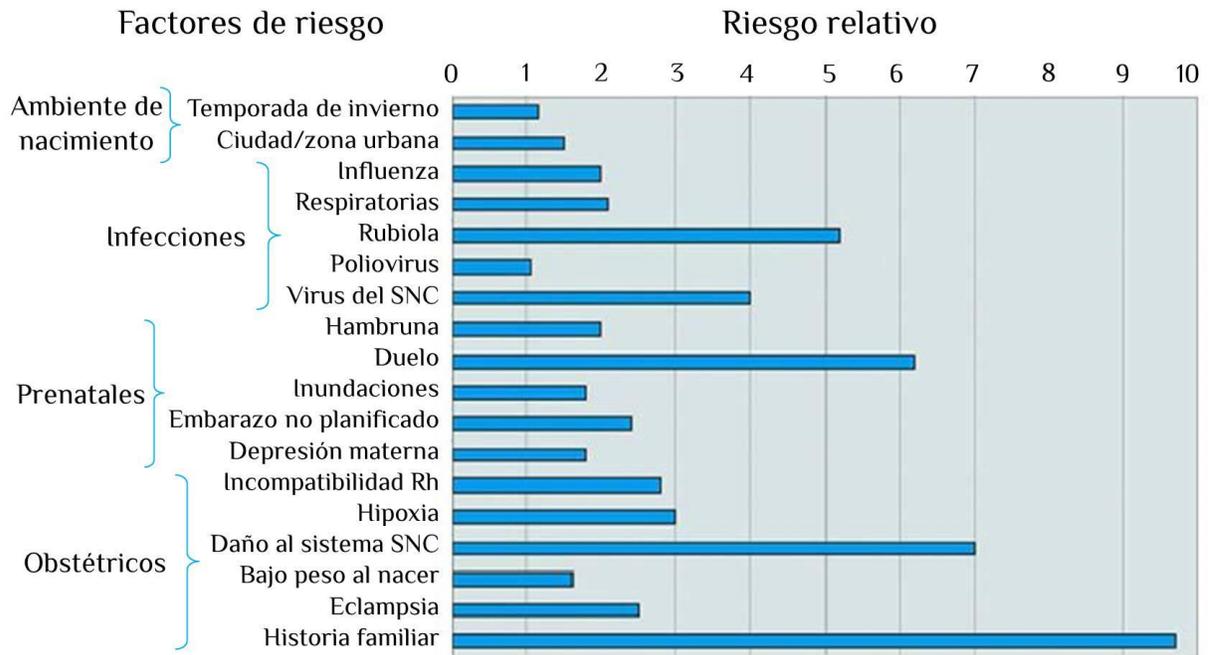
**b) Síntomas negativos:** este término se refiere a una pérdida de función o disminución de alguna característica del comportamiento. Incluyen disminución de la reactividad emocional, desmotivación, habla desacelerada, incapacidad de sentir placer (anhedonia), y atención reducida. Los pacientes con síntomas negativos tienden a aislarse socialmente, descuidar su higiene personal, su salud, relaciones personales, y consecuentemente ven dificultadas sus oportunidades para desempeñarse en un empleo y desarrollar una vida independiente.

**c) Síntomas cognitivos:** estos síntomas, en conjunto con los síntomas negativos, parecen ser los más difíciles de tratar, mostrando los antipsicóticos convencionales desarrollados hasta los momentos poca efectividad. Comprenden la afectación de la memoria de trabajo, memoria episódica, memoria espacial, y aprendizaje.

**d) Síntomas afectivos:** incluyen ansiedad, impulsividad, depresión, manía y embotellamiento afectivo. Los síntomas afectivos, no obstante, son más bien característicos del trastorno esquizoafectivo y de otros trastornos psicóticos (p.e., trastorno bipolar) (van Os & Kapur, 2009). Algunos de los síntomas ligados al estado anímico en pacientes esquizofrénicos surgen como consecuencias del estilo de vida y la desmoralización producto de la enfermedad.

La sintomatología no es uniforme entre los pacientes esquizofrénicos. Puede variar de acuerdo a las experiencias del individuo en conjunto con factores ambientales. Esto complica el diagnóstico de la enfermedad en humanos. Nuevas directrices, enfocadas en métodos moleculares de diagnóstico con mayor precisión, surgen como consecuencia de la mayor comprensión de las bases neurobiológicas de la enfermedad.

El trastorno, por su carácter multifactorial, posee componentes genéticos, ambientales y sociales. Complicaciones obstétricas, ligadas a la predisposición genética, distorsión del núcleo familiar y estrés psicosocial realizan contribuciones importantes al desarrollo de la esquizofrenia (Fig. 2).



**Figura 2.** Factores de riesgo más comunes para la esquizofrenia. La historia familiar comprende el factor de mayor impacto en el desarrollo de la enfermedad, y está relacionado con el componente genético del trastorno. SNC: sistema nervioso central. Adaptada de Sullivan (2005).

### 5.2.1. Hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia

La dopamina es un neurotransmisor de gran importancia, involucrado en múltiples funciones como el movimiento, emociones, respuesta a estímulos de recompensa, y en la cognición. Los receptores de dopamina son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Se reconocen cinco subtipos de receptores de dopamina ( $D_1$ - $D_5$ ); los receptores  $D_2$  y  $D_4$  son los de mayor relevancia para el trastorno esquizofrénico (Goldstein & Deutch, 1992).

En humanos, existen cinco regiones principales involucradas en la neurotransmisión dopaminérgica: regiones mesolímbica, mesocortical, talámica, tuberoinfundibular, y nigroestriatal. Las vías dopaminérgicas mesolímbica y mesocortical son las de mayor relevancia en la patología de la esquizofrenia (Konopaske & Coyle, 2015). La vía mesolímbica comprende aferencias dopaminérgicas que parten del área tegmental ventral (en el mesencéfalo) al cuerpo estriado, hipocampo y amígdala. La vía mesocortical parte igualmente del área tegmental ventral y se proyecta hasta la corteza cerebral, incluyendo la corteza prefrontal. El incremento en la actividad dopaminérgica en la vía mesolímbica está asociado al desarrollo de los síntomas positivos, mientras que una disminución de la actividad en la vía mesocortical se cree que está involucrado en el desarrollo de los síntomas negativos y cognitivos (Coyle & Konopaske, 2012).

Los primeros antipsicóticos, denominados antipsicóticos típicos (p.e., clorpromazina, haloperidol, y perfenazina) actúan como antagonistas de receptores  $D_2$ . Estos permiten tratar de forma efectiva los síntomas positivos de la esquizofrenia, pero producen efectos adversos agudos y crónicos como temblor, rigidez, distonía y disquinesia. La segunda generación de antipsicóticos, conocidos como antipsicóticos atípicos (p.e., clozapina, y olanzapina), poseen menor especificidad por los receptores  $D_2$  y afinidad adicional para los receptores serotoninérgicos del tipo  $5-HT_{2A}$  (a manera de antagonistas). Estas características aminoran los posibles efectos adversos. No obstante, pueden producir obesidad, hiperlipemia y diabetes tipo II (Lieberman *et al.*, 2005; Keefe *et al.*, 2007).

La administración de agonistas dopaminérgicos, como la cocaína, la anfetamina, y alucinógenos (como el ácido lisérgico), puede producir efectos psicotrópicos similares a los síntomas positivos. Esto, en conjunto con el conocimiento acumulado del mecanismo de acción de los antipsicóticos (tanto típicos como atípicos), da solidez a la hipótesis de la hiperfunción dopaminérgica como origen del trastorno esquizofrénico (Murray *et al.*, 2008).

Otros estudios señalan el papel determinante de los receptores D<sub>1</sub> en la corteza prefrontal como causa del desarrollo de los síntomas cognitivos. En pacientes con esquizofrenia, estudios de tomografía de emisión de positrones demuestran incremento en la expresión de los receptores D<sub>1</sub> en la corteza prefrontal, correlacionada a una disminución de las funciones cognitivas. A su vez, revelan incremento de la neurotransmisión dopaminérgica en el cuerpo estriado y alteración en la expresión de los receptores D<sub>2</sub> y D<sub>4</sub> en diversas regiones del cerebro (Laruelle *et al.*, 1996).

Otros estudios enfocados en la recaptación de dopamina de la hendidura sináptica por los transportadores de dopamina (DAT, *dopamine transporter*), revelan el papel crítico de la regulación de los niveles de dopamina en la función normal del cerebro. En ratones *knockout* para el gen *DAT1* se encontraron mayores niveles de dopamina en el cerebro, asociados a un incremento de la actividad locomotora (hiperactividad), y supresión sensomotora evaluada por la prueba de inhibición por prepulso (PPI) (Powell *et al.*, 2009).

La totalidad de los datos acumulados (genéticos, moleculares, farmacológicos, etológicos, imagenológicos) dan una fuerte validez a la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia.

### **5.2.2. Hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia**

La hipótesis dopaminérgica se ve debilitada por estudios clínicos y moleculares recientes. Se estima que el 30% de los pacientes esquizofrénicos que reciben tratamiento con antipsicóticos antagonistas de receptores de dopamina D<sub>2</sub> no experimentan mejoría tras el tratamiento. Estos antipsicóticos solo permiten tratar la sintomatología positiva de la enfermedad, más no la sintomatología negativa y cognitiva efectivamente. Esto, asociado además a los numerosos efectos secundarios, pone en duda la efectividad de estos antipsicóticos (Lieberman *et al.*, 2005; Keefe *et al.*, 2007).

Los modelos animales de esquizofrenia basados en la hipótesis dopaminérgica, si bien pueden producir los síntomas positivos y algunos de los síntomas cognitivos del trastorno, fallan en replicar los síntomas negativos. Fármacos disociativos, como la fenciclidina y la ketamina, los cuales actúan como antagonistas de receptores NMDA, exacerbaban los síntomas positivos, negativos y cognitivos en pacientes esquizofrénicos; producen además déficits cognitivos en individuos sanos (Cohen *et al.*, 1962; Krystal *et al.*, 1994). Un gran número de estudios sugieren una desregulación del sistema glutamatérgico como causa del trastorno esquizofrénico, lo que se conoce como hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia.

Estudios de resonancia magnética espectroscópica revelan elevados niveles de glutamina en la corteza cingulada anterior de pacientes esquizofrénicos, quienes experimentan por primera vez episodios psicóticos. Pacientes que reciben un tratamiento crónico con antipsicóticos muestran una reducción de los niveles de glutamina y glutamato en tal región, así como de los niveles de N-acetil aspartato (un indicador de integridad neuronal) (Théberge *et al.*, 2003). Razonablemente, el metabolismo del glutamato parece estar alterado de esta forma en la esquizofrenia. El glutamato es retirado de la hendidura sináptica por los astrocitos por medio de los EAATs. La expresión de estos transportadores se ve aumentada en la corteza prefrontal, y disminuida en el giro parahipocampal de pacientes esquizofrénicos (Ohnuma *et al.*, 2000; Matute *et al.*, 2005). Una vez dentro del astrocito, una porción del glutamato es convertido en glutamina por la glutamina sintetasa, y otra porción en amonio y  $\alpha$ -ketoglutarato por la glutamato deshidrogenasa. En la esquizofrenia, la expresión de la glutamina sintetasa y de la glutamato deshidrogenasa se ve alterada en la corteza prefrontal (Konopaske & Coyle, 2015).

Anormalidades neuroanatómicas se han detectado en estudios de neuroimagen, donde se ven alterados varios genes involucrados en la neurotransmisión glutamatérgica. Una mutación en el gen *GRM3*, el cual codifica para el receptor metabotrópico de glutamato 3 (mGluR3, *metabotropic glutamate receptor 3*), está asociada con patrones anormales de activación neuronal en la corteza prefrontal e hipocampo de pacientes esquizofrénicos, con niveles elevados del indicador N-acetil-aspartato (Egan *et al.*, 2004).

Se sabe que la activación de los receptores NMDA requiere de la unión conjunta de glutamato y de un coagonista al receptor. En las regiones cortical y límbica del cerebro, la D-serina es el principal coagonista de los receptores NMDA. La D-serina es sintetizada por la enzima serina racemasa, y catabolizada por la D-aminoácido oxidasa, cuya actividad es modulada por la proteína G72. Mutaciones que afectan los genes que codifican para estas tres proteínas se han asociado con el desarrollo de esquizofrenia, con un fenotipo que comprende atrofas corticales, y reducción de la longitud y densidad de espinas dendríticas de neuronas piramidales corticales (Balu *et al.*, 2012). Más aún, 7 de los 40 genes de riesgo identificados para la esquizofrenia comprenden genes relacionados con la neurotransmisión glutamatérgica (Konopaske & Coyle, 2015).

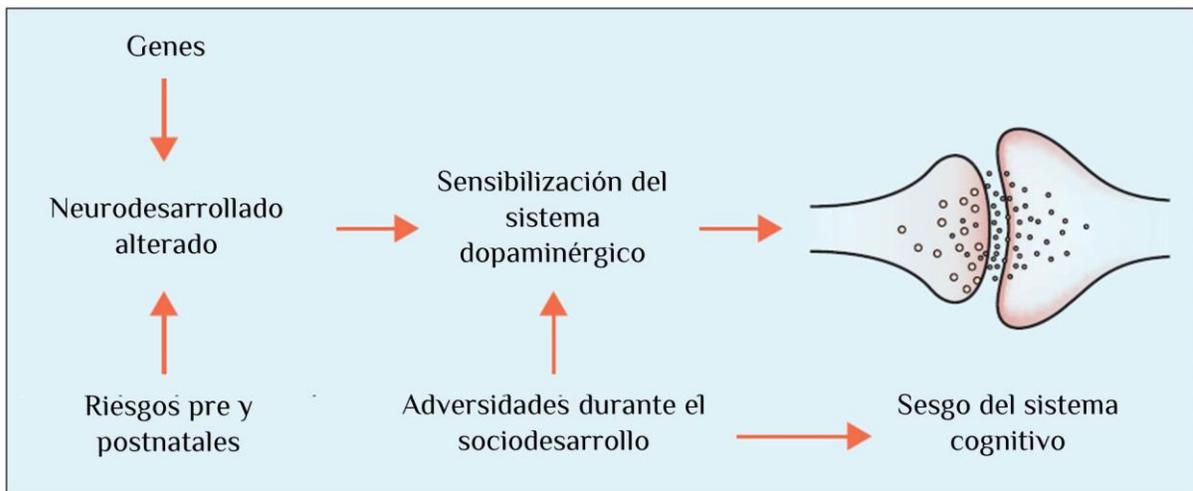
La expresión diferencial de otros receptores involucrados en la neurotransmisión por glutamato puede desencadenar igualmente en el desarrollo de esquizofrenia. En pacientes esquizofrénicos se ha observado disminución de la expresión de los receptores AMPA en la corteza prefrontal (Dracheva *et al.*, 2005). Una posible afectación de la potenciación sináptica a largo plazo mediada por glutamato pudiese ser una posible consecuencia de la disminución de la densidad estos receptores en tales regiones. Esto concuerda con los hallazgos que relacionan una hipofunción glutamatérgica con las disfunciones cognitivas en pacientes esquizofrénicos.

Investigaciones recientes en la neurobiología de la neurotransmisión glutamatérgica han conllevado al desarrollo de nuevos fármacos antipsicóticos, diferentes a los antagonistas de receptores de dopamina. El fármaco LY404039, todavía bajo pruebas clínicas, ha mostrado una eficacia similar al antipsicótico atípico olanzapina. Este fármaco actúa como un agonista altamente selectivo para receptores metabotrópicos de glutamato mGluR<sub>2/3</sub>. Otros estudios, enfocados en el efecto de los coagonistas de receptores NMDA, glicina y D-serina, muestran que la administración conjunta de estos coagonistas con antipsicóticos convencionales mejora la sintomatología positiva, negativa y cognitiva de pacientes esquizofrénicos. Asimismo, un inhibidor del transportador de glicina (GlyT1, *glycine transporter 1*) desarrollado por la

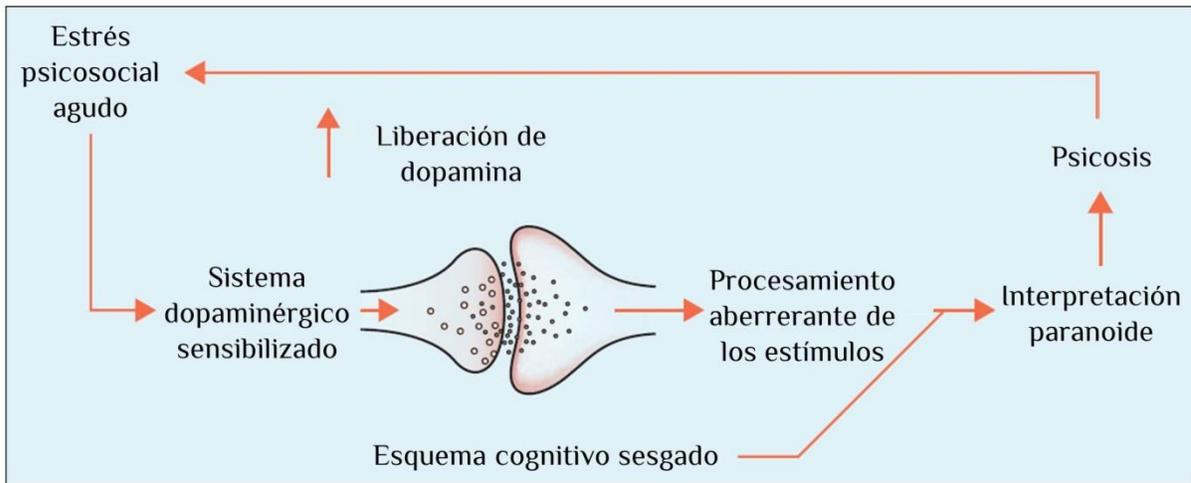
farmacéutica Roche muestra reducir efectivamente los síntomas negativos de pacientes esquizofrénicos que reciben tratamiento con antipsicóticos convencionales (Lin *et al.*, 2012).

### 5.2.3. Modelos duales de esquizofrenia

Howes & Murray (2014) proponen un modelo teórico mixto, donde el desarrollo social y el desarrollo neuronal actúan sinérgicamente para producir el trastorno esquizofrénico. Combinan aspectos de las hipótesis dopaminérgica, del neurodesarrollo y del sociodesarrollo. Las alteraciones durante el neurodesarrollo debido al efecto de genes, estrés prenatal, y adversidades durante la niñez afectan el normal desarrollo del individuo y sensibilizan el sistema dopaminérgico (Fig. 3). Al mismo tiempo, la adversidad social polariza el esquema cognitivo que el individuo utiliza para interpretar las experiencias, originando así las interpretaciones psicóticas del mundo exterior. El estrés subsecuente resulta en una mayor liberación de dopamina, lo que fomenta los episodios psicóticos produciendo más estrés y liberación de dopamina (Fig. 4). Se establece así un círculo vicioso, que desencadena una progresiva desregulación de la neurotransmisión dopaminérgica desde el primer episodio psicótico.



**Figura 3.** Sensibilización del sistema dopaminérgico. La afectación de la neurotransmisión por dopamina produce la interpretación aberrada de los estímulos externos, consecuencias de un neurodesarrollo alterado y del estrés psicosocial. Adaptada de Howes & Murray (2014).



**Figura 4.** Modelo de producción de un episodio psicótico. En ausencia de un tratamiento eficaz, cada episodio de psicosis produce más estrés, causando mayor sensibilización del sistema dopaminérgico, y con ello el empeoramiento de los síntomas de la esquizofrenia. Adaptada de Howes & Murray (2014).

Se han propuesto algunos modelos mixtos compatibles con el modelo combinado del socio y neurodesarrollo. Entre estos, destaca la aplicación de un modelo farmacológico en neonatos, en conjunto con diversos modelos de aislamiento social. Los modelos de aislamiento social causan estrés en las etapas tempranas del neurodesarrollo de los neonatos; poseen un origen fundado en el desarrollo neuronal. En ratas, la separación temprana de las crías de la madre produce respuestas fisiológicas concretas en los neonatos, como alteraciones en la frecuencia cardíaca, en los ritmos circadianos, aumento de los niveles de corticosterona, y disminución de los niveles de la hormona del crecimiento (Siegel *et al.*, 1988; Kuhn *et al.*, 1990). Ratas adultas sometidas a aislamiento materno en el estadio neonatal presentan mayores índices de ansiedad, menor comportamiento agresivo, menor instinto maternal (Boccia & Pedersen, 2001), comportamiento de aseo (*grooming behavior*) incrementado (Zimmerberg *et al.*, 1999) y déficit en tareas de aprendizaje (Sandstrom & Hart, 2005).

La estrategia “dual” o mixta está fundamentada en la multifactorialidad del trastorno esquizofrénico, ligando la hipofunción glutamatérgica con eventos adversos en etapas tempranas del desarrollo ontogenético del organismo. Gilabert-Juan *et al.* (2013) aplican un tratamiento combinado en ratones, consistente en la aplicación de dizocilpina (1 mg/kg), un

potente antagonista de receptores NMDA llamado también MK-801, con el aislamiento luego del destete en el día postnatal 21. Reportan una disminución del volumen del hipocampo y corteza prefrontal medial, alteraciones en la expresión de proteínas parvalbúminas, y disminución de la transcripción del gen *GAD67*. Este gen codifica para la enzima glutamato descarboxilasa, enzima clave para la síntesis del neurotransmisor inhibitorio GABA; una disminución en la expresión del gen *CAD67* se ha observado en pacientes con esquizofrenia y desorden bipolar (Woo *et al.*, 2004). En los primeros días postnatales, el desarrollo neurológico en los ratones es equivalente al contemplado en el segundo trimestre del desarrollo en humanos (Bayer *et al.*, 1993), vinculando así este modelo con la hipótesis del neurodesarrollo.

Gaskin *et al.* (2014) proponen un modelo dual en ratas, similar al anterior ya expuesto. Para ello, combinan la administración de PCP (10 mg/kg) en los días postnatales 7, 9 y 11 con el aislamiento luego del destete en el día postnatal 23, evaluando el comportamiento de los animales a la sexta semana del nacimiento. Reportan una disminución de la supresión sensoriomotora en las ratas sometidas al modelo combinado, más no en ratas sometidas solo al modelo de PCP en neonatos. Reportan además menor condicionamiento al miedo y deficiencias en la memoria (medida con la prueba de reconocimiento de objetos) en el modelo dual respecto a los tratamientos unitarios. De esta forma, el tratamiento combinado produce un cuadro más severo de síntomas que los tratamientos por separados.

Más recientemente, Kekesi *et al.* (2015) desarrollaron un modelo triple complejo de esquizofrenia en ratas, y estudiaron los diferentes cambios en el comportamiento tanto en machos como en hembras. El modelo consiste en aplicar el aislamiento luego del destete por 28 días (desde la 4ta hasta la 7ma semana del nacimiento), en conjunto con la administración de ketamina (30 mg/kg) 5 veces a la semana, durante 3 semanas (15 días en total, desde la 5ta a la 7ma semana). Los animales que presentaron mayores déficits en las distintas pruebas conductuales se seleccionaron para reproducción. Las siguientes generaciones se sometieron al mismo tratamiento, hasta alcanzar las 17 generaciones de ratas. De esta forma producen una cepa con susceptibilidad genética a la esquizofrenia, en la cual prueban el efecto del bloqueo

de receptores NMDA desde el estadio prepuberal al puberal, en paralelo al aislamiento social: se incluyen así factores genéticos, manipulación farmacológica y adversidades sociales.

Este modelo, si bien es extenso metodológicamente y requiere de un tiempo de ejecución prolongado, permite simular muchas de las características del trastorno en humanos, incluyendo una menor susceptibilidad en las hembras de desarrollar esquizofrenia. Respecto a las diferencias entre sexos, solo los machos de la cepa susceptible, y tratada con ketamina y aislamiento social, muestran una reducción a los estímulos de dolor en la *tail-wick test* (sumersión de la cola en agua caliente, a 48 °C). Las hembras expuestas a las mismas condiciones muestran reducción de la reacción de sobresalto en la PPI, señal de déficit en la supresión sensomotora. Además, solo los machos presentaron desempeño disminuido en la memoria de trabajo y memoria referencial en la *Hole board test* (prueba de la tabla de agujeros). Estos resultados señalan una menor susceptibilidad en las hembras a padecer de esquizofrenia, tal cual se aprecia en humanos. Estas diferencias pueden deberse a factores hormonales propios de cada sexo: la testosterona y hormonas masculinas parecen aumentar la susceptibilidad de padecer trastornos psicóticos, mientras que los estrógenos actúan como factor protector (Häfner, 2003).

### **5.3. Validez general de los modelos animales**

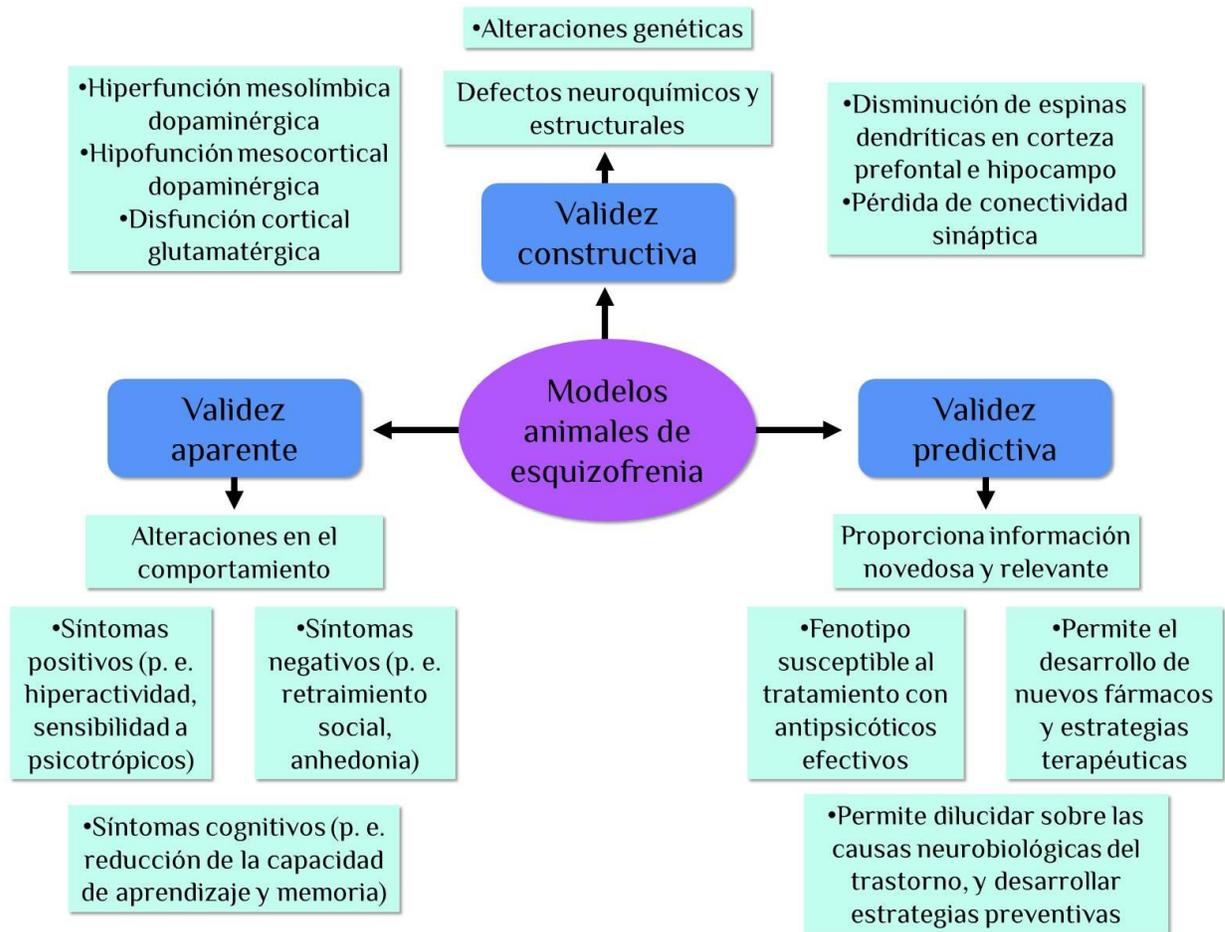
Uno de los objetivos que se plantea al desarrollar un modelo animal de alguna patología clínica, es precisamente que el modelo pueda ser extrapolado a las condiciones clínicas en humanos. Cualquier información que pueda obtenerse de la patología de la enfermedad, derivará de qué tan preciso y confiable sea el modelo animal desarrollado. Se debe enfatizar que ningún modelo animal puede cumplir todos los requisitos de validez al mismo tiempo. Por ende, el criterio de validez está usualmente demarcado por el propósito del modelo. Esto, no obstante, no ha frenado la búsqueda de modelos más precisos y más adaptados a la realidad de las patologías humanas. En general, existen tres criterios fundamentales para validar un

modelo animal con relevancia clínica (Lipska & Weinberger, 2000; Meyer & Feldon, 2010; Jones *et al.*, 2011), los cuales se exponen a continuación (Fig. 5):

**a)** Validez aparente: constituye la similitud fenomenológica y sintomatológica entre el modelo propuesto y las condiciones clínicas observadas. En trastornos psiquiátricos, un modelo adecuado debería poder simular los cambios del comportamiento, fisiopatológicos y moleculares del trastorno. Un modelo poseerá mayor validez aparente mientras mejor pueda “mimetizar” el fenotipo clínico del trastorno en humanos.

**b)** Validez constructiva: refleja la similitud entre los mecanismos causales de la patología clínica y los mecanismos causales del fenotipo del modelo desarrollado. En otras palabras, un modelo posee mayor validez constructiva mientras mayor sea la relación entre el diseño metodológico y las causas observadas que conllevan a desarrollar el fenotipo patológico. Así, la validez constructiva se refiere a qué tanto se adaptan los mecanismos causales del trastorno a la realidad clínica en humanos. En enfermedades heterogéneas complejas, como es el caso de muchos trastornos psiquiátricos, deben tenerse en cuenta los componentes genéticos, embriológicos, neuroquímicos y sociológicos que originan el trastorno.

**c)** Validez predictiva: la predictibilidad se refiere a la capacidad de extrapolación del modelo de una especie a otra (por ejemplo, de roedores a primates o a humanos), y de una condición a otra (de estudios preclínicos en animales a estudios clínicos como tal). En la psicofarmacología y neuropsiquiatría, la validez predictiva está muy relacionada con la similitud entre el efecto de los fármacos y drogas sobre el cuadro clínico en humanos y el efecto observado en el modelo animal propuesto. Este criterio de predictibilidad atañe a la sensibilidad de los modelos a la administración de drogas que mejoren el cuadro clínico. Este punto es de gran importancia dado que una de las razones fundamentales por la que se desarrolla un nuevo modelo animal con relevancia clínica es que este modelo permita tanto entender el trastorno como permitir el diseño de fármacos, terapias y estrategias de medicina preventiva que mejoren la sintomatología.



**Figura 5.** Validez de los modelos de esquizofrenia. Diagrama esquemático dónde se indican las características que debe cumplir un modelo animal de esquizofrenia para poseer un criterio preciso de validez. Imagen adaptada de Jones *et al.*, 2011).

#### 5.4. Trasladando los síntomas clínicos a los modelos animales

A la hora de estudiar una patología o trastorno en un modelo animal, es de gran importancia trazar un puente entre los síntomas clínicos en humanos y el fenotipo producido en el modelo. En el caso de los trastornos psiquiátricos, la complejidad del comportamiento humano y de los procesos psíquicos complican la interpretación de los síntomas en los animales: ¿cómo puede estarse seguro de si un animal presenta alucinaciones?, ¿cómo estudiar procesos complejos como el habla y la memoria en animales? Muchos síntomas clínicos no poseen una equivalencia directa; otros sí están expresados más explícitamente. Por ejemplo, las

alucinaciones y delirios no pueden comprobarse directamente en roedores (hasta los momentos). Un aumento drástico en la actividad locomotora del animal, producto de la administración de anfetamina, puede producir también alucinaciones y delirios en pacientes esquizofrénicos. De esta forma, puede relacionarse la hiperactividad asociada a la administración de una droga o fármaco con los síntomas positivos de la esquizofrenia. En los modelos animales, algunas variables conductuales de importancia en el estudio de la esquizofrenia comprenden (Geyer & Moghaddam, 2002):

**a)** Actividad locomotora y comportamiento estereotípico: ligados a los síntomas positivos. La administración de psicoestimulantes en ratas y ratones puede producir hiperlocomoción y, en dosis altas, movimientos estereotipados, entendiéndose por este término cualquier movimiento o conducta poco común o extraña (giros inusuales del cuerpo, correr en círculos). En humanos sanos, estas sustancias pueden producir alucinaciones y delirios similares a los presentados en pacientes esquizofrénicos. La hiperlocomoción en animales puede ser causada por una situación de estrés, tal cual un evento estresante puede desencadenar un episodio psicótico en personas esquizofrénicas.

**b)** Filtrado de la información (*gating*): relacionado con los síntomas positivos. Muchos pacientes esquizofrénicos presentan deficiencias en el procesamiento de la información, incluyendo la incapacidad de filtrar o procesar los datos provenientes de los estímulos sensoriales, dando lugar a una falsa conceptualización de la realidad.

En los modelos animales se suelen utilizar pruebas de habituación para evaluar este paradigma del procesamiento de la información. La habituación hace referencia a la disminución de la respuesta hacia un estímulo cuando este se repite cierto número de veces o durante cierto tiempo, en ausencia de otro tipo de agente externo. Dos pruebas son ampliamente usadas para evaluar la habituación: la prueba de inhibición por prepulso (PPI, *prepulse inhibition*) y el P50 (*pulse-50*). En la primera se utilizan pulsos acústicos débiles durante 30-500 milisegundos, los cuales disminuyen la respuesta a un estímulo posterior de

mayor intensidad. En la segunda, dos pulsos de 500 milisegundos de duración son presentados en una rápida sucesión, y se espera que el primer pulso disminuya la respuesta al segundo. Tanto en la PPI y el P50 los pacientes esquizofrénicos muestran una respuesta exorbitada al estímulo final, denominada aumento de la reacción de sobresalto, y se cree que es consecuencia de un déficit del proceso de supresión sensoriomotora. Esta respuesta exagerada puede reproducirse también en los modelos animales de esquizofrenia.

**c)** Comportamiento social: forma parte de los síntomas negativos. La prueba depende de la especie a tratarse, debido a la variabilidad en los mecanismos de comunicación entre las distintas especies de animales. En roedores, suele medirse el tiempo utilizado en la interacción social, así como el tipo de interacción (agresiva, no agresiva).

**d)** Déficit de atención: relacionado con los síntomas cognitivos. Refiere al tiempo de respuesta o reacción del animal ante un evento determinado. En roedores, suele evaluarse con la *Five-Choice Serial Reaction Time task* (Robbins *et al.*, 1989). La prueba, en su forma básica, consiste en la detección por parte de la rata de destellos breves de luz en uno de cinco agujeros. Suele medirse el tiempo en que el animal tarda en detectar el destello de luz.

**e)** Memoria espacial: habilidad de guiar el recorrido mediante la formación de una representación interna del estímulo (una representación del espacio físico o de la ubicación espacial) que ya no se encuentra presente en el ambiente. Una disminución de esta función constituye parte de los síntomas cognitivos. Suele evaluarse con diversas pruebas, comúnmente efectuadas en laberintos: alternación espontánea en el laberinto en T, alternación en el laberinto radial y laberinto en Y, además de la piscina de Morris (*Morris water maze*) utilizada para aprendizaje y memoria espacial.

Por supuesto, actualmente existe un cuantioso número de pruebas en animales para el estudio de los trastornos psiquiátricos de las cuales no se hace mención en esta sección. En la

Tabla 1 se relacionan algunos síntomas clínicos de la esquizofrenia con sus contrapartes en los modelos animales.

**Tabla 1.** Síntomas clínicos de la esquizofrenia y su relación con los modelos animales. Adaptada de Lipska & Weinberger (2000).

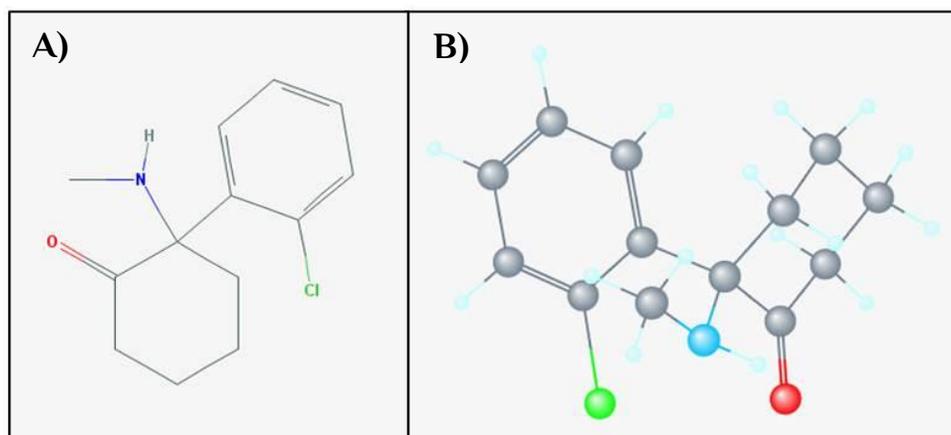
<b>Esquizofrenia: aspectos clínicos</b>	<b>Modelos animales: cambios en el comportamiento</b>
Síntomas psicóticos	Comportamientos relacionados con el incremento de la neurotransmisión por dopamina: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiperlocomoción inducida por dopamina</li> <li>• Reducción de la catalepsia (inmovilización momentánea del cuerpo) producida por haloperidol (un antipsicótico clásico)</li> </ul>
Comportamientos estereotípicos	Movimientos estereotipados producidos por dopamina
Desmejoramiento de los síntomas psicóticos por antagonistas de receptores NMDA	Hiperlocomoción producida por antagonistas de receptores NMDA
Vulnerabilidad al estrés	Hiperlocomoción producida por estrés
Déficit en el procesamiento de la información	Déficit en el proceso de supresión sensomotora
Déficit de atención	Déficit en el proceso de inhibición latente
Problemas cognitivos	Desempeño reducido en las pruebas de memoria espacial
Retraimiento social	Contacto reducido con conespecíficos no familiares (desconocidos)

## 5.5. Ketamina

La ketamina es una sustancia con propiedades narcóticas y psicotrópicas, regulada en la mayoría de los países del mundo. Fue introducida primeramente como un agente anestésico en los años 1960 en medicina humana y veterinaria. Los primeros reportes de su uso como droga recreacional remontan al año 1967, principalmente entre los profesionales del área de la salud, los cuales poseían fácil acceso a esta droga. En los años 1980 y 1990 empezó a ganar popularidad en Estados Unidos y el resto del mundo. Es una droga “disociativa”, término referente a la adopción de un estado alejado (“disociado”) de la realidad, que produce alucinaciones, relajación, y paranoia (Wolff & Winstock, 2006). En la Encuesta Nacional sobre

el Uso de Drogas y Salud (*National Survey on Drug Use and Health*) del 2006 en Estados Unidos, los reportes estiman que unas 23 millones de personas han utilizado ketamina como droga recreativa en algún momento de su vida, con una prevalencia en personas mayores de 12 años del 0.1% (aproximadamente 23000 estadounidenses) (Li *et al.*, 2013).

La ketamina posee un peso molecular de 273.73 g/mol, con la siguiente estructura química:  $C_{13}H_{16}ClNO$  (Fig. 6). Su punto de fusión se encuentra entre los 258 y 261 °C. Es soluble en solventes acuosos y lipídicos, lo que la hace adecuada para su administración por diferentes vías, atravesando rápidamente la barrera hematoencefálica (Sinner & Graf, 2008).



**Figura 6.** Estructura química de la ketamina. **A)** Modelo bidimensional. **B)** Modelo de esferas y barras. Los colores verde, azul y rojo representan átomos de cloro, nitrógeno y oxígeno, respectivamente. Imagen generada en [pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ketamine](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ketamine).

En la nomenclatura IUPAC, el nombre sistemático de la ketamina corresponde a la 2-(2-clorofenil)-2-(metilamino)ciclohexan-1-ona. Actúa como antagonista de receptores NMDA, con una estructura similar a la PCP. Existe como dos isómeros ópticos S(+) y R(-). Ambos comparten el mismo mecanismo de acción, sin embargo se diferencian por su afinidad por los distintos receptores, en especial por los receptores NMDA, lo que resulta en respuestas fisiológicas distintas (Wolff & Winstock, 2006). Además, la ketamina posee una afinidad muy baja por los receptores  $GABA_A$ , receptores muscarínicos, acetilcolínicos, nicotínicos y receptores opioides (Sinner & Graf, 2008). A nivel clínico, el isómero S(+) posee

aproximadamente entre tres y cuatro veces la potencia anestésica del isómero R(-) (White *et al.*, 1980).

La ketamina, al igual que la mayoría de las drogas, puede cruzar la placenta y llegar al feto. Es además una droga de transferencia en exceso (*exceeding transfer type 2 drugs*), alcanzando una mayor concentración en el feto que en el plasma de la madre (Griffiths & Campbell, 2015).

Para una revisión completa de la ketamina, sus efectos en el sistema nervioso central, en los circuitos cerebrales, en la neurotransmisión, toxicidad, uso y epidemiología, véase Li *et al.* (2013) y Sinner & Graf (2008).

### **5.5.1. Farmacocinética**

La ketamina parece que interrumpe selectivamente el sistema talamocortical del paciente. Su administración causa que el paciente entre rápidamente en un estado de trance, con los ojos ampliamente abiertos y nistagmus (movimientos involuntarios de los ojos). La anestesia disociativa es resultado de la reducción de la activación de las estructuras talamocorticales, y un incremento de la actividad del sistema límbico y del hipocampo (Domino *et al.*, 1965).

La biodisponibilidad de la dosis administrada es del 93% por la vía intramuscular, 25-50% por la intranasal, y del 17% por la oral. La ketamina es rápidamente distribuida al cerebro y otros tejidos altamente perfundidos; el 12% de la ketamina se une a las proteínas del plasma. La administración intravenosa produce los primeros efectos de la anestesia en unos pocos segundos, la intramuscular entre 1-5 min, por vía nasal entre 5-10 min, y oralmente entre 15-20 min. Si es inyectada, los efectos de la anestesia pueden durar hasta 60 min (Sinner & Graf, 2008).

Ambos isómeros poseen una vida media  $\alpha$  corta (2-4 min). Este tiempo de vida media se define como el tiempo necesario para que haya disminuido la concentración de la droga en el plasma en un 50%, como consecuencia de su distribución en los distintos tejidos. La vida media  $\beta$ , relacionada con la eliminación de la droga por el metabolismo, está entre los 8-16 min en adultos. La ketamina es metabolizada en el hígado a norketamina producto de la N-desmetilación por la oxidasa CytP450 3A4 (*cytochrome P450 3A4*); la norketamina mantiene una sexta parte del poder anestésico de la ketamina. Otra vía de eliminación comprende la hidroxilación del anillo de ciclohexano de la ketamina resultando en la formación de hidroxiketamina, con solo el 0.1% de la potencia anestésica original. El metabolismo de la ketamina y sus metabolitos posee una vida media entre 2.5-3 h; la excreción se da principalmente por la orina (Geisslinger *et al.*, 1993).

### **5.5.2. Efectos en el sistema nervioso central**

La ketamina es un antagonista no competitivo de receptores NMDA que produce síntomas positivos y negativos similares a los del trastorno esquizofrénico (Ebert *et al.*, 2012). Hallazgos farmacológicos y neuroanatómicos en esquizofrenia sugieren que existen alteraciones en diversos circuitos cerebrales, los cuales comprenden varios sistemas de neurotransmisión que incluyen a la dopamina, glutamato, y GABA (Sharp & Hendren, 2007).

Estudios fármaco-imagenológicos de resonancia magnética nuclear, usados para investigar el efecto directo de drogas sobre el cerebro, indican que la administración de antagonistas de receptores NMDA desencadena la liberación de glutamato en la corteza frontal, tálamo anterior, giro temporal superior, giro parahipocampal, y disminuye la concentración del neurotransmisor en la corteza orbitofrontal medial y en el polo temporal del cerebro (Deakin *et al.*, 2008).

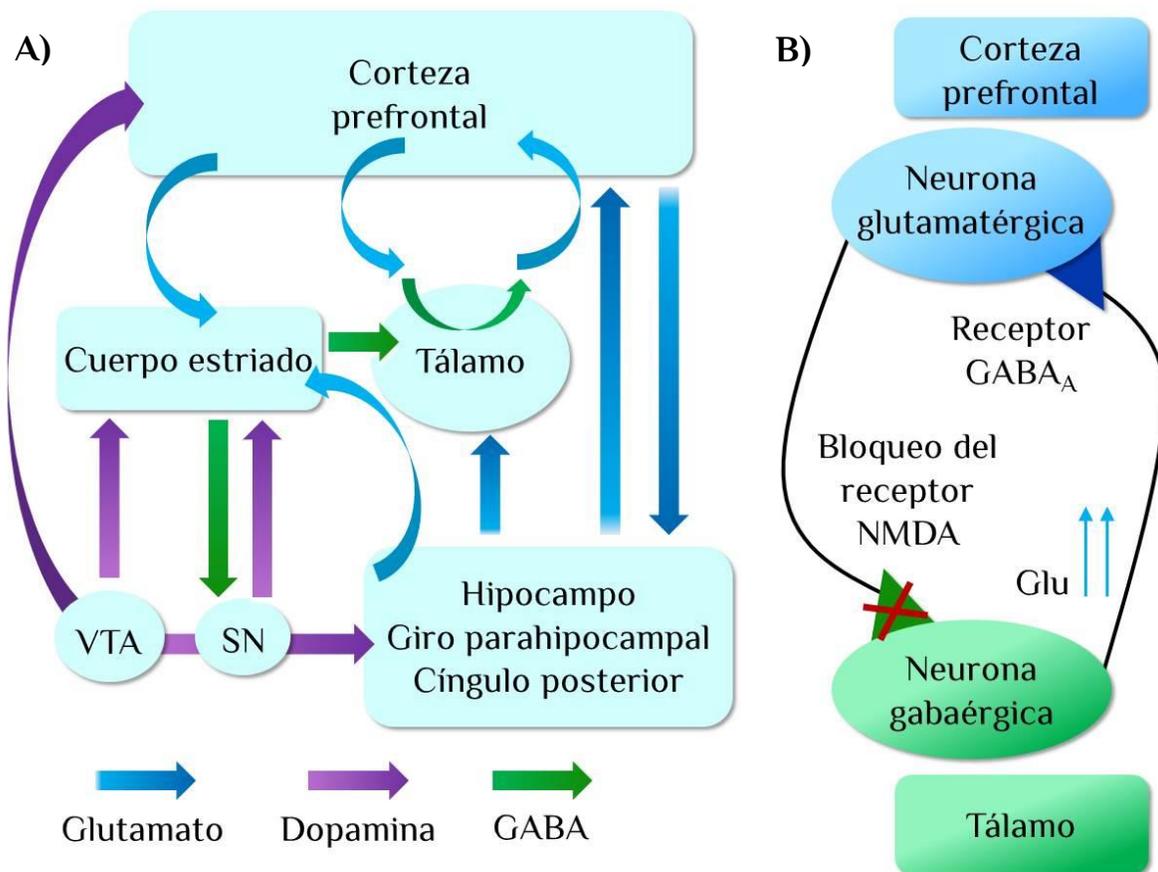
En concordancia con la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia, la administración de ketamina altera la frecuencia de disparo de las neuronas dopaminérgicas mesocorticales y

mesolímbicas, lo que conlleva a un incremento de la concentración de dopamina en el cuerpo estriado y corteza prefrontal (Verma & Moghaddam, 1996). Este patrón es observado en pacientes esquizofrénicos que presentan síntomas positivos. Se cree que el glutamato modula los niveles de dopamina del cuerpo estriado al nivel de los cuerpos celulares dopaminérgicos del área tegmental ventral (VTA) y sustancia nigra (SN), así como al nivel de las aferencias glutamatérgicas de la corteza prefrontal, que a su vez modulan las concentraciones de dopamina en el VTA, SN, y cuerpo estriado por excitación de las interneuronas gabaérgicas (Sesack & Pickel, 1992). En otras palabras, la afectación de la neurotransmisión glutamatérgica tiene efectos directos en los niveles de dopamina del cuerpo estriado por el aumento de la actividad de las proyecciones dopaminérgicas que parten del VTA y SN, e indirectos por la disminución de la actividad de las interneuronas gabaérgicas del mesencéfalo que proyectan hacia el cuerpo estriado, y consecuentemente aumenta la actividad dopaminérgica del circuito VTA/SN-cortical-límbico (Fig. 7A).

Otra vía por la cual la ketamina causa desregulación de los circuitos cerebrales, comprende el bloqueo de los receptores NMDA de interneuronas inhibitorias gabaérgicas en el núcleo reticular del tálamo (Fig. 7B). Esto resulta en la inhibición de la modulación por GABA de las aferencias glutamatérgicas, colinérgicas y serotoninérgicas hacia la corteza cingulada anterior, derivando en el aumento de la actividad de estas vías de neurotransmisión (Olney *et al.*, 1991). En consecuencia, se produce un triple efecto excitotóxico en las neuronas piramidales de la corteza cingulada posterior con el daño subsecuente.

### **5.5.3. Toxicidad aguda**

El uso de ketamina es raramente asociado con problemas clínicos severos, incluso se acepta su uso terapéutico (dentro de cierto margen) como antidepresivo. En dosis lo suficientemente elevadas como para producir un efecto anestésico de sedación profunda no desencadena complicaciones cardiorespiratorias. Consecuentemente, los consumidores recurrentes de ketamina no desarrollan compromisos clínicos severos (Kalsi *et al.*, 2011).



**Figura 7.** Efecto de la ketamina sobre la actividad neuronal en el SNC. **A)** Circuitos neuronales afectados por la administración de ketamina. Las proyecciones glutamatergicas que parten de la corteza prefrontal, en conjunto con aquellas que parten del sistema límbico (hipocampo, cíngulo posterior y giro parahipocampal) se conectan con el tálamo formando una parte funcional del circuito cortical-límbico-talámico-cortical. Las interneuronas gabaérgicas del cuerpo estriado proyectan a la SN y modulan la liberación de dopamina a través del circuito VTA/SN-cortical-límbico; además, este circuito posee aferencias gabaérgicas al tálamo, regulando la liberación cortical de dopamina. SNC: sistema nervioso central, SN: sustancia nigra, VTA: área tegmental ventral. **B)** Bloqueo del receptor NMDA de las interneuronas gabaérgicas en el circuito cortical-talámico. El bloqueo disminuye la inhibición por GABA de las proyecciones de las neuronas del tálamo hacia la corteza prefrontal. La interrupción de la inhibición por GABA causa sobreexcitación en la corteza prefrontal por un incremento de la liberación de glutamato. Modificada de Li *et al.* (2013).

En el marco neuropsiquiátrico, sí se reportan efectos agudos que incluyen alucinaciones, agitación, agresión y paranoia. Efectos menos comunes incluyen dolor en el pecho y taquicardia por el aumento de la presión sanguínea y ritmo cardíaco (Li *et al.*, 2013). La mortalidad asociada al consumo de la ketamina se asocia a su uso conjunto con alcohol u otras

drogas de abuso. La afectación de la conciencia y percepción del mundo exterior es causa de traumatismos, al disminuir las habilidades cognitivas y reflejos del individuo bajo los efectos de la droga. En Hong Kong, entre 1996 y 2000, en el 9% de los accidentes de tráfico severos (motivo del consumo de drogas o alcohol) la ketamina ha estado involucrada (Cheng *et al.*, 2005).

#### **5.5.4. Toxicidad crónica**

Fuera del sistema nervioso se reporta que el consumo de ketamina produce, a largo plazo, daños en la vejiga, riñones, mucosa del intestino, glándulas adrenales, páncreas, sistema inmune e hígado. Causa dilatación del volumen del corazón, y producción de un fenotipo similar al de individuos isquémicos. Los efectos crónicos se agravan con el consumo paralelo de ketamina, alcohol y otras drogas de abuso (Li *et al.*, 2013).

Los efectos de mayor severidad se observan a nivel del sistema nervioso central. El consumo de ketamina como droga recreacional durante largos períodos de tiempo puede conducir al desarrollo de efectos similares a los síntomas positivos y negativos de la esquizofrenia (Cohen *et al.*, 1962; Krystal *et al.*, 1994). Se ha reportado igualmente afectación de la memoria de trabajo, memoria episódica (memoria relacionada con sucesos autobiográficos: lugares visitados, contexto temporal y emocional asociados), y en la memoria a corto y largo plazo. Este efecto parece ser más marcado en hombres que en mujeres.

Las regiones más afectadas por la administración crónica de ketamina comprenden la corteza sensorial, el hipocampo, la corteza prefrontal y el cuerpo estriado. En estudios de resonancia magnética nuclear se han reportado cambios en el volumen de la materia blanca en la corteza temporoparietal y lóbulos frontales, así como disminución de la materia gris en el giro frontal derecho superior y frontal medio inferior. Los cambios están correlacionados con la magnitud de la dosis de ketamina, y con la frecuencia de consumo (Liao *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2011).

La ketamina posee un efecto neurotóxico grave durante los estadios prenatal y perinatal. La mayor severidad se observa en dosis repetidas y continuas de ketamina, como las empleadas durante la anestesia o durante su consumo a largo plazo como droga recreativa. Hayashi *et al.* (2002) muestran que dosis únicas de ketamina (25, 50, 75 mg/kg) en ratas en el día postnatal 7 no producen mayores niveles de neurodegeneración respecto al grupo control (inyección salina). Sin embargo, dosis repetidas de ketamina (25 mg/kg) a intervalos de 90 min durante 9 h, producen neurodegeneración marcada en la amígdala basomedial, región CA1 del hipocampo, corteza temporal, giro dentado, y tálamo laterodorsal, mediodorsal y ventromedial.

### **5.5.5. Efecto sobre los receptores NMDA**

El sitio de unión de la ketamina se encuentra en el interior del receptor NMDA y se solapa parcialmente con el sitio de unión al magnesio. De esta forma, bloquea el canal abierto y reduce su tiempo promedio de apertura (Wolff & Winstock, 2006).

La hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia señala que el trastorno psiquiátrico es producto de una hipofunción de los receptores NMDA, en especial en la corteza prefrontal (Mouri *et al.*, 2007). En muchas áreas cerebrales, la dopamina inhibe la liberación de glutamato, y viceversa. Por ende, drogas que actúen como antagonistas de receptores glutamatérgicos deben potenciar la neurotransmisión por dopamina en acorde a la hipótesis dopaminérgica.

Se espera que la administración aguda de ketamina incremente la liberación presináptica de glutamato, produciendo los efectos psicotrópicos asociados. Estos efectos van desapareciendo a medida que la droga es metabolizada y excretada (Wolff & Winstock, 2006). En cambio, la administración crónica de ketamina sensibiliza el sistema dopaminérgico. La exposición a ketamina por tiempo prolongado produce, como ya se ha señalado, efectos excitotóxicos por la concentración elevada de glutamato, con la consiguiente producción de daño neuronal y depresión de la actividad cerebral (Hayashi *et al.*, 2002).

## 5.6. Efecto de la ketamina y la anestesia sobre el neurodesarrollo

Si bien la neurotoxicidad de la ketamina y de otros compuestos homólogos, como la PCP y el MK-801, está bien documentada, su efecto en el estadio prenatal está poco explorado en comparación con los efectos observados en el estadio perinatal, puberal y adulto. Además, son escasos los estudios donde se tome en cuenta la intervención farmacológica del receptor NMDA durante el período gestacional en el desarrollo de un posible modelo de esquizofrenia en animales.

Los primeros modelos de ketamina fueron concebidos con el surgimiento de la hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia. Como en estos modelos el fármaco era aplicado en los estadios adolescente y adulto del animal, lo cual no estaba acorde con la hipótesis esquizofrénica del neurodesarrollo (Jones *et al.*, 2011), han surgido diversos estudios que evalúan los cambios neurobiológicos de la ketamina, y mayoritariamente la PCP, vinculando dichos cambios con un posible “modelo base” acorde a la hipótesis del desarrollo neuronal. El mayor uso de la PCP en lugar de la ketamina radica en el menor potencial neurotóxico de esta última (Li *et al.*, 2013).

El primer modelo glutamatérgico acorde a la hipótesis del neurodesarrollo corresponde a la aplicación perinatal de antagonistas de receptores NMDA. Mouri *et al.* (2007) agruparon una serie de estudios que vinculan la administración de PCP en neonatos con un posible modelo de esquizofrenia. Muestran que la administración de PCP (10 mg/kg) en dosis sub-crónica en la segunda semana postnatal en ratas (equivalente al tercer trimestre del embarazo en humanos), desencadena una serie de cambios en el comportamiento de la progeñie en la adultez: aumento de la actividad locomotora, deficiencia en la memoria de trabajo en el laberinto de agua de Morris, alternancia espacial demorada evaluada en el laberinto en T, deficiencia en la memoria de trabajo en la prueba de reconocimiento de objetos, y disminución de la supresión sensomotora en la prueba de PPI. Todas estas afectaciones del comportamiento pudieron ser aminoradas con la administración de antipsicóticos atípicos. Asimismo, reportan

en las ratas sometidas al modelo un incremento de la proteína BDNF (*brain neurodevelopmental factor*, factor de neurodesarrollo cerebral) en el hipocampo; vinculan la alteración de los niveles de esta proteína con los cambios en el comportamiento observados. Reportan igualmente disminución del peso total del cerebro, mayores niveles de gliólisis, neurodegeneración y apoptosis en la corteza frontal, en conjunto con una mayor actividad de la enzima caspasa-3 en la misma.

Un primer intento de producir un modelo utilizando un antagonista de receptores NMDA durante el período prenatal lo realizan Abekawa *et al.* (2007). En ratas preñadas, administraron MK-801 (0.2 mg/kg) durante los días embrionarios 15 a 18. El tratamiento disminuyó la densidad de neuronas parvalmúnicas inmunoreactivas en la corteza prefrontal medial, densidad determinada en los días postnatales 35 y 63; tal efecto se observó tanto en los machos como en las hembras. Una proporción importante de estas neuronas está constituida por interneuronas gabaérgicas. Una disminución de la densidad de estas neuronas y de su actividad se ha vinculado fuertemente al desarrollo de esquizofrenia. Adicionalmente, el tratamiento parece aumentar la hiperlocomoción consecuente de la administración de PCP en las ratas en el día postnatal 63. Los animales de esta edad mostraron igualmente actividad locomotora aumentada por la sensibilización a la metanfetamina. Los efectos no se observaron en las ratas más jóvenes. El tratamiento con muscinol, un agonista de receptores GABA<sub>A</sub>, disminuye la locomoción causada por la administración de PCP.

Los resultados de Abekawa *et al.* se apoyan en la hipótesis formulada por Olney & Farber (1995): las interneuronas gabaérgicas que están destinadas a ser inervadas por glutamato, vía receptores NMDA, en el sistema nervioso central del adulto pueden expresar receptores NMDA durante el estadio fetal. Estos receptores alcanzan un pico de estimulación excitotóxica relativamente pronto en el embarazo. Este efecto excitotóxico puede eliminar selectivamente las interneuronas gabaérgicas que reciben inervaciones glutamatérgicas vía receptores NMDA. Esto produce la hipofunción cortical glutamatérgica observada en pacientes esquizofrénicos. Así, tanto la disminución de la señalización por GABA<sub>A</sub> y glutamato vía receptores NMDA

como el aumento de la actividad dopaminérgica pueden producir la hiperlocomoción asociada a los síntomas positivos de la esquizofrenia.

Los efectos de agentes neurotóxicos durante el neurodesarrollo no son producidos solo por dosis crónicas, como en los modelos de PCP mencionados hasta el momento. Diversos estudios reportan alteraciones neurobiológicas por dosis agudas, como por ejemplo en la anestesia aplicada previamente a una intervención quirúrgica.

Jevtovic-Todorovic *et al.* (2003) se enfocaron en el efecto combinado de tres anestésicos en ratas en el estadio neonatal (día postnatal 7): midazolán (una benzodiazepina) e isoflurano, (ambos agonistas de receptores GABA<sub>A</sub>), y NO<sub>2</sub> (un antagonista de receptores NMDA). Reportan deficiencias en la memoria de trabajo en ratas juveniles (día postnatal 31) y adultas (día postnatal 131), aumento de la actividad de la caspasa-3 con la consiguiente apoptosis asociada, y alteraciones en la función sináptica del hipocampo.

Ing *et al.* (2012), en un estudio de seguimiento de 2868 niños nacidos entre 1989 y 1992, demostraron que la exposición temprana a anestesia en niños menores de 3 años conlleva al desarrollo de deficiencias en el lenguaje, funciones cognitivas, habilidades motoras y comportamiento en general, aspectos evaluados a los 10 años de edad. Las consecuencias de la exposición son más severas en niños menores de 3 años, los cuales son más susceptibles a los efectos de agentes neurotóxicos.

Los estudios ya descritos exponen las consecuencias de la administración de agentes neurotóxicos durante el período perinatal. La intervención en el período prenatal, donde el neurodesarrollo está todavía en su fase temprana, puede tener consecuencias neurobiológicas más severas.

Slikker *et al.* (2007) estudiaron el efecto apoptótico de la anestesia con ketamina en distintos estadios del desarrollo del mono de la india (coloquio: macaco). Mantienen un plano

completo de anestesia por 24 horas mediante la administración de ketamina por vía intravenosa durante tal lapso de tiempo. Compararon el efecto de la anestesia en el día gestacional 122, y en los días postnatales 5 y 35. Reportan aumento de la actividad de la caspasa-3 y de los niveles de apoptosis en los monos sometidos a anestesia en los tres períodos mencionados, con efectos más severos en el día gestacional 122 y postnatal 5. Aunque entre estos dos últimos no se evidencia una diferencia estadísticamente significativa, si se observa una tendencia del incremento de los niveles de apoptosis en las ratas sometidas a la anestesia con ketamina en el día gestacional 122. Estos resultados sugieren un mayor efecto neurotóxico de la anestesia en las fases más tempranas del neurodesarrollo.

Zheng *et al.* (2013) administraron, en el día gestacional 14 en ratones, anestesia con sevoflurano, un anestésico de uso común en cirugías que actúa como agonista de receptores GABA<sub>A</sub> (Nishikawa & Harrison, 2003), durante 2 horas a una concentración del 2.5%. Evalúan los cambios en el tejido cerebral de los fetos y de la prole (día postnatal 31). La anestesia con sevoflurano incrementó los niveles de actividad de la caspasa-3 en el tejido cerebral, aumentó los niveles de interleucina-6, y disminuyó la expresión de la proteína PSD-95 (*postsynaptic density 95*, densidad postsináptica 95) y los niveles sinaptofisina, tanto en los fetos como en la prole. En estos últimos observan deficiencias en la memoria espacial y aprendizaje (evaluados en el laberinto de Morris), efecto aminorado con enriquecimiento ambiental. Los anestésicos, en general, incrementan los niveles citosólicos de calcio (Yang *et al.*, 2008), lo que conlleva a la liberación de citoquinas proinflamatorias por las microglías, entre ellas la interleucina-6 (Kim *et al.*, 2010). Este proceso proinflamatorio incrementa la actividad de la caspasa-3, desencadenando en un proceso apoptótico en el tejido cerebral. Adicionalmente, se presentó disminución de la PSD-95, una molécula asociada a una región de alta agregación de proteínas conocida como densidad postsináptica. Esta proteína juega un papel importante en el fortalecimiento de las sinapsis entre neuronas (Takeuchi *et al.*, 1997), y su disminución tiene como causa predominante el proceso de neuroinflamación desencadenado por el sevoflurano.

En ratas preñadas expuestas a un anestésico homólogo al sevoflurano, el isoflurano, se reportan deficiencias en la memoria de trabajo en la descendencia. Las madres no presentaron ningún tipo de trastorno del comportamiento respecto al grupo control, lo que sugiere que el efecto de la anestesia es perjudicial en los fetos durante su desarrollo, pero no llega a afectar a la madre en sí (Palanisamy *et al.*, 2011). En otros estudios, la administración isoflurano al 3% en el día gestacional 14 en ratas preñadas conllevó al aumento de la actividad de la caspasa-3 en la región CA1 del hipocampo, alteraciones en la sinapsis en el giro dentado y región CA1 del mismo, y afectación de la memoria de trabajo, memoria retentiva y percepción espacial (Kong *et al.*, 2012).

Lu *et al.* (2011) aplicaron PCP (5 mg/kg) en forma sub-crónica en ratones durante los días embrionarios 6 a 18. Demostraron que, en líneas generales, la administración de PCP afecta la neurotransmisión glutamatérgica. Reportan reducción del peso inicial de las crías al nacer, deficiencias en la memoria en la prueba de reconocimiento de objetos, y aumento del tiempo de inmovilización en la prueba de nada forzado. En la corteza prefrontal señalan una tendencia (no estadísticamente significativa) en la sobreexpresión de las proteínas GLAST y GLT-1, las cuales están implicadas en la recaptación de glutamato (Danbolt, 2001), en las ratas sometidas al tratamiento con PCP. En la misma región observan disminución de los niveles extracelulares de glutamato, y desensibilización de la neurotransmisión glutamatérgica reversible con la administración del antipsicótico DL-TBOA (DL-treo-beta-benciloxi aspartato).

Su *et al.* (2010) estudiaron algunos efectos, en los infantes luego del nacimiento, del consumo de ketamina en mujeres embarazadas. Cuantifican los niveles de ketamina residuales en el cabello de los infantes recién nacidos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Reportan altos niveles de ketamina en el cabello de los recién nacidos, incluso en madres que afirman haber dejado el consumo de ketamina durante el embarazo. Los niños presentaron un bajo peso al nacer, hipotonía (disminución del tono muscular, es decir, flacidez), y disfunción cerebral moderada medida por medio de electroencefalografía.

Otros estudios enfocan sus directrices en las alteraciones de los oligodendrocitos del sistema nervioso central durante el desarrollo. La integridad de la vaina de mielina es de importancia para la óptima transmisión de los impulsos nerviosos. Perturbaciones en la mielinización, durante el desarrollo o posteriormente, se han asociado con desórdenes neurobiológicos (Duncan *et al.*, 1992). Se ha reportado que los oligodendrocitos y células progenitoras son susceptibles a la señalización por  $\text{Ca}^{+2}$  glutamatérgica (Itoh *et al.*, 2002), siendo esto un incentivo para desentrañar el efecto de potenciales agentes neurotóxicos sobre el destino de dichas células.

Lindahl *et al.* (2008) aplicaron de forma sub-crónica PCP (10 mg/kg) desde el momento de la concepción hasta el día gestacional 20, determinando su efecto en astrocitos y oligodendrocitos en distintas etapas del desarrollo. Los resultados muestran que los niveles de marcadores celulares en astrocitos (GFAP, NeuN) no se ven alterados, no obstante, a costa de alteraciones en los oligodendrocitos. En fases tempranas del desarrollo, una disminución del marcador celular NG2 (un proteoglicano del tipo condroitinsulfato que se expresa en células progenitoras de oligodendrocitos en animales jóvenes) sugiere que la exposición prenatal a PCP conlleva a la muerte celular de las células progenitoras destinadas a diferenciarse en oligodendrocitos. Esto, producto de concentraciones excitotóxicas de glutamato, en consecuencia de una hipofunción glutamatérgica derivada de la administración sub-crónica de PCP. En etapas intermedias del desarrollo, un incremento de los niveles de los marcadores O4 (un anticuerpo que reconoce un antígeno sulfatado de membrana) y de la CNPasa, ambos expresados en oligodendrocitos inmaduros, sugiere que las células progenitoras sobrevivientes proliferan y reconstituyen la población de oligodendrocitos. Sin embargo, una disminución de los marcadores MOG (*myelin oligodendrocyte glycoprotein*, glicoproteína oligodendrocítica de la mielina) y MBP (*myelin basic protein*, proteína básica de la mielina) en oligodendrocitos maduros, apunta a una reducción de la diferenciación de las células progenitoras en oligodendrocitos. Estos resultados dan a dilucidar que la exposición prenatal a antagonistas de receptores NMDA reduce el número de oligodendrocitos maduros en individuos adultos, lo que conlleva a una reducción de la mielinización en el sistema nervioso central.

En un estudio más reciente, Zhao *et al.* (2014) probaron el efecto de la anestesia con ketamina en el día gestacional 14 en ratas. En el día postnatal 30, reportan mayores niveles de ansiedad, depresión, disminución de la respuesta a estímulos de recompensa (anhedonia), y aumento del tiempo de latencia en el laberinto de agua de Morris (déficit de memoria espacial). A nivel morfológico, perciben una disminución de la densidad neuronal en la región CA3 del hipocampo, disminución del número de ramificaciones, de espinas dendríticas y de la longitud total de las espinas en neuronas piramidales del hipocampo. En esta misma estructura reportan depreciación de la neurogénesis, de los niveles de BDNF y reducción de la PSD-95. Indican a su vez un incremento de la expresión de la subunidad NR2A, y reducción de la expresión de la subunidad NR2B de los receptores NMDA. Vinculan la posible alteración de la expresión de estas subunidades en el hipocampo con los cambios neurobiológicos en las ratas sometidas a la administración prenatal de ketamina. La disminución de la densidad de neuronas en la región CA3 y de la neurogénesis en el hipocampo se presenta en los días postnatales 0 y 30. Esto es indicativo de que los cambios a nivel celular y molecular, producto del tratamiento con ketamina, se manifiestan desde etapas tempranas de la ontogenia del organismo.

Por último, Zhao *et al.* (2016), estudiaron el efecto de la anestesia con ketamina durante un lapso de 2 h sobre el desarrollo de la corteza prefrontal en ratas. La exposición a la ketamina resultó en apoptosis celular y neuronal en el cerebro de los fetos, y disminución de la densidad neuronal en las láminas II-III de la corteza prefrontal. Las neuronas de la corteza prefrontal mostraron un mayor número de espinas dendríticas en el día postnatal 30, mientras que los cultivos celulares de neuronas extraídas de esta región en el día postnatal 0 presentaron menos neuritas (cualquier proyección del cuerpo de una neurona, ya sean dendritas o axones, que soportan la comunicación interneuronal) que el control. Además, el tratamiento invirtió la expresión de las subunidades NR2B/2A del receptor NMDA, y perturbó la expresión de las proteínas pre y postsinápticas de la corteza prefrontal. Ambos estudios llevados por el grupo de Zhao confirman el efecto neurotóxico de la ketamina durante el estadio prenatal, hecho causal de las anormalidades en el comportamiento de la progenie.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Animales de ensayo

Se emplearon ratas Sprague-Dawley (*Rattus norvegicus*) proporcionadas por el Bioterio de la Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (Barquisimeto, Venezuela). El apareamiento se llevó a cabo en el animalario de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (Facyt) de la Universidad de Carabobo. Para ello, las hembras se dispusieron de a pares con un solo macho en jaulas individuales durante 15 días. Los animales no se perturbaron, salvo durante el tiempo de limpieza y mantenimiento de las jaulas. Se utilizó como criterio, del inicio del embarazo, el hinchamiento de los pezones en la hembra. Una vez confirmado el embarazo, la hembra se ubicó en una jaula individual.

Los animales experimentales se colocaron en grupos de cuatro individuos (a excepción de las hembras preñadas, las cuales se dispusieron individualmente) en jaulas de acero inoxidable de 50 x 40 x 20 cm, a una temperatura de  $24.2 \pm 0.4$  °C,  $38.5 \pm 4.9\%$  de humedad relativa, con 12 h de ciclo luz/oscuridad, y suministro de agua y alimento *ad libitum*. Los animales experimentales se trataron en acuerdo con lo establecido en la “*Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research*” (van Sluyters & Obernier, 2004). Se construyeron dos grupos experimentales:

**a) Grupo ketamina (KT):** formado con hembras preñadas ( $n = 4$ ), a las cuales se les administró anestesia con ketamina (Imalgene®, Merial C.A.) al término de la segunda semana del embarazo. Primeramente, una dosis de ketamina (60 mg/kg) se aplicó por vía intramuscular (la aplicación intraperitoneal puede causar daño físico a los fetos) para producir un estado inicial de relajación. Posteriormente, la ketamina pasó a ser administrada en bolos intramusculares de 20 mg/kg cada 20 min (60 mg/kg/h), durante 3 h. Este tratamiento mantiene un estado intermedio entre una anestesia ligera y una sedación profunda, estado determinado por la ausencia de movimientos voluntarios, flacidez, reflejos al dolor reducidos,

sin que se evidencie afectación de la función respiratoria. Durante la anestesia, se mantuvo la temperatura corporal entre 36.5 y 37.5 °C empleando una lámpara infrarroja. La temperatura de la sala se ajustó a  $24.0 \pm 1.0$  °C. La cantidad de anestesia suministrada se reguló dependiendo del plano de anestesia presente en el animal. El tratamiento se aplicó en horario diurno (a partir de las 8:00 am).

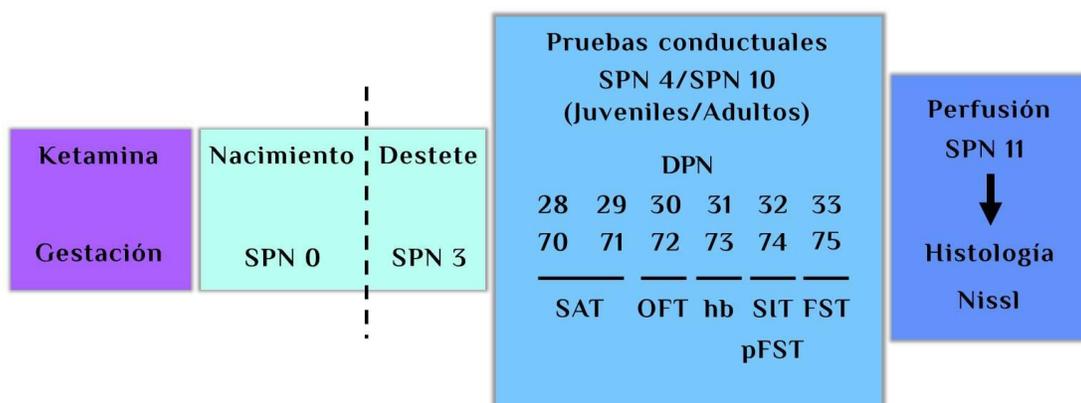
**b)** Grupo control (CT): formado con hembras preñadas ( $n = 4$ ), las cuales solo se trasladaron al laboratorio durante 3 h, sin aplicarles ningún tipo de tratamiento. Transcurrido el tiempo, se regresaron nuevamente al animalario.

Luego del nacimiento de las crías, se determinó su peso en el día post-natal (DPN) 3. Estas se mantuvieron junto a su madre hasta el momento del destete en el DPN 21, momento en el cuál se registró igualmente su peso. Con el fin de eliminar las posibles variaciones neurobiológicas dependientes del sexo, las hembras quedaron excluidas del estudio. Llegada la fecha, las madres se sacrificaron por contusión craneal; las crías hembras se utilizaron para un proyecto paralelo.

Con el fin de evaluar la evolución de los cambios neurobiológicos en la progeñe con el tiempo, se realizó el análisis en dos fases temporales. Para ello, las pruebas conductuales se efectuaron primeramente en la semana post-natal (SPN) 4, para los juveniles, y nuevamente en la SPN 10, para los adultos. En relación a la ontogenia, la adolescencia en ratas comprende el período que va desde el destete (DPN 21) hasta la adultez temprana (DPN 60), y este período puede dividirse en adolescencia temprana (DPN 21-33), media (DPN 34-46) y tardía (DPN-59), según la clasificación establecida por Tirelli *et al.* (2003). Por consiguiente, las pruebas se efectuaron en el período correspondiente al inicio de la adolescencia en ratas, y al inicio de la adultez en las mismas. De esta forma, se formaron cuatro subgrupos de los dos grupos principales (CT y KT): **a)** control-juvenil (CTJ,  $n = 12$ ), **b)** control-adulto (CTA,  $n = 12$ ), **c)** ketamina-juvenil (KTJ,  $n = 12$ ) y **d)** ketamina-adulto (KTA,  $n = 11$ ). En la Fig. 8 se muestra el esquema general de trabajo.

## 6.2. Pruebas conductuales

Se utilizó como sistema de video una webcam conectada a una portátil Hp Compaq Presario® V2000. Los videos se grabaron con el software Windows Movie Maker 16.4.3 a una resolución de 480p y a 24 fotogramas por segundo. Las pruebas se realizaron sobre un fondo negro, con la finalidad de aumentar el contraste con los animales. Éstas se efectuaron a partir de las 12 m, con el propósito de adaptar las pruebas al ciclo de actividad regular de las ratas. Las condiciones del área de pruebas comprenden una temperatura de  $24.0 \pm 1.0$  °C,  $38.6 \pm 3.3\%$  de humedad relativa, y  $17^\circ$  lux de intensidad lumínica.



**Figura 8.** Esquema de trabajo general. El tratamiento con ketamina se aplicó durante el término de la 2da semana de gestación. SPN: semana postnatal, DPN: día postnatal, SAT: prueba de alternación espontánea, OFT: prueba de campo abierto, hb: habituación en el campo abierto, SIT: prueba de interacción social, pFST: prueba preliminar al nado forzado, FST: prueba de nado forzado.

Diversas consideraciones deben tomarse al momento de realizar las pruebas conductuales. El observador debe colocarse de tal forma que no proyecte su sombra sobre las estructuras de prueba. La presencia del observador disminuye la ambulación del animal (Hughes, 1978), por lo que éste no debe notar la presencia del mismo.

Las pruebas deben realizarse con iluminación baja (cercana a los  $10^\circ$  lux) y difusa, para evitar producir sombras en las estructuras que alteren el patrón de comportamiento. Tal consideración es de gran importancia dada la aversión natural, evolucionariamente conservada,

de las ratas y ratones a los ambientes amplios e iluminados (Valle, 1970; Blizard, 1971; Krsiak, 1971; File & Hyde, 1978).

El estrés ambiental también debe ser minimizado, por lo que la sala de pruebas debe estar lo más aislada del ruido en la medida de lo posible. El ruido actúa como un agente estresor, incrementando la ansiedad en los roedores. Adicionalmente, deben eliminarse las posibles pistas olfatorias depositadas por los animales (orina, heces) en pruebas previas, limpiando con etanol 70% las estructuras de prueba al finalizar cada ensayo, o cuando se indique que sea necesario.

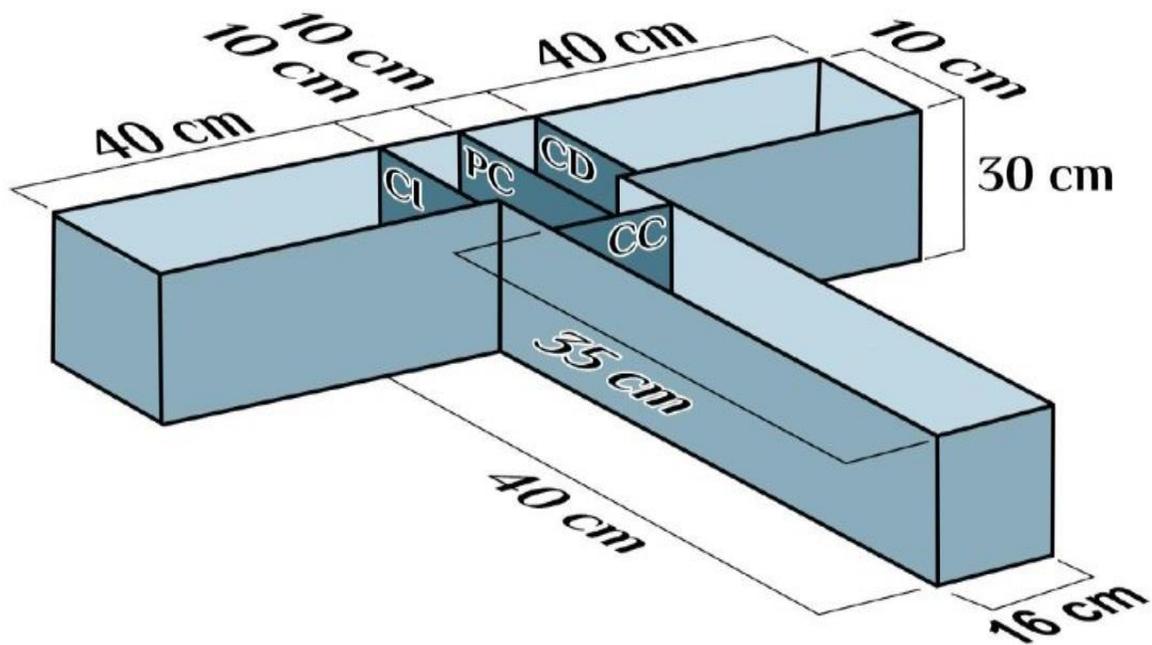
El orden de las pruebas y su momento de aplicación se muestra en la Fig 8. A pesar de que la prueba más invasiva (prueba de nado forzado) se realizó como prueba terminal, algunos estudios muestran que ésta no parece tener efecto sobre las pruebas efectuadas en el campo abierto (Blokland *et al.*, 2012). No obstante, se optó igualmente por colocar las pruebas más susceptibles a agentes ansiogénicos al inicio de la batería de pruebas.

### **6.2.1. Prueba de alternación espontánea (SAT)**

Con el fin de evaluar la memoria espacial en ratas se empleó la prueba de alternación espontánea (SAT) en el laberinto en T (*T-maze*), según el protocolo de Deacon & Rawlins (2006). La estructura comprende un laberinto con paredes de policloruro de vinilo (PVC) de color gris mate, de 30 cm de altura y 3 mm de espesor. El laberinto posee compuertas deslizantes en diferentes zonas: compuerta del brazo izquierdo (CI) y derecho (CD), y compuerta de la partición central (CC). La partición central se divide simétricamente con un tabique longitudinal. En la Fig. 9 se aprecia el diseño del laberinto.

Al momento de la prueba, el animal es colocado suavemente en el punto de inicio del laberinto con todas las compuertas abiertas. En el momento en que la rata entre a cualquiera de los extremos de la partición central, se cierra la CC. Al entrar en el brazo, se cierra la

compuerta correspondiente, manteniéndose la rata encerrada por 30 seg. Esta primera etapa corresponde a la fase de acopio de información, donde el animal forma en su memoria el camino que ha tomado. Transcurrido el tiempo, se retira la rata y se coloca nuevamente en el punto de inicio (con todas las compuertas abiertas) y se deja que seleccione uno de los extremos (fase de elección). Se tomará la prueba como positiva si selecciona el extremo opuesto; negativa si selecciona el mismo extremo. Si transcurridos 2 min el animal no selecciona ningún extremo, es retirado para aplicar la prueba posteriormente.



**Figura 9.** Diseño estructural del laberinto en T. CI: compuerta izquierda, CD: compuerta derecha, CC: compuerta central, PC: partición central.

Al finalizar cada prueba (y al término de cada subensayo en un mismo animal), se remueven las piezas fecales y se limpia la base del laberinto con etanol 70%.

Las ratas se observaron directamente desde la computadora portátil por medio del sistema de video, desde el plano cenital a 1.35 m de altura de la superficie del laberinto. Se realizaron 10 pruebas por rata, en dos bloques de 5 pruebas por día, midiéndose la proporción de aciertos positivos por animal en cada grupo por conteo manual *in situ*.

### 6.2.2. Prueba de campo abierto (OFT)

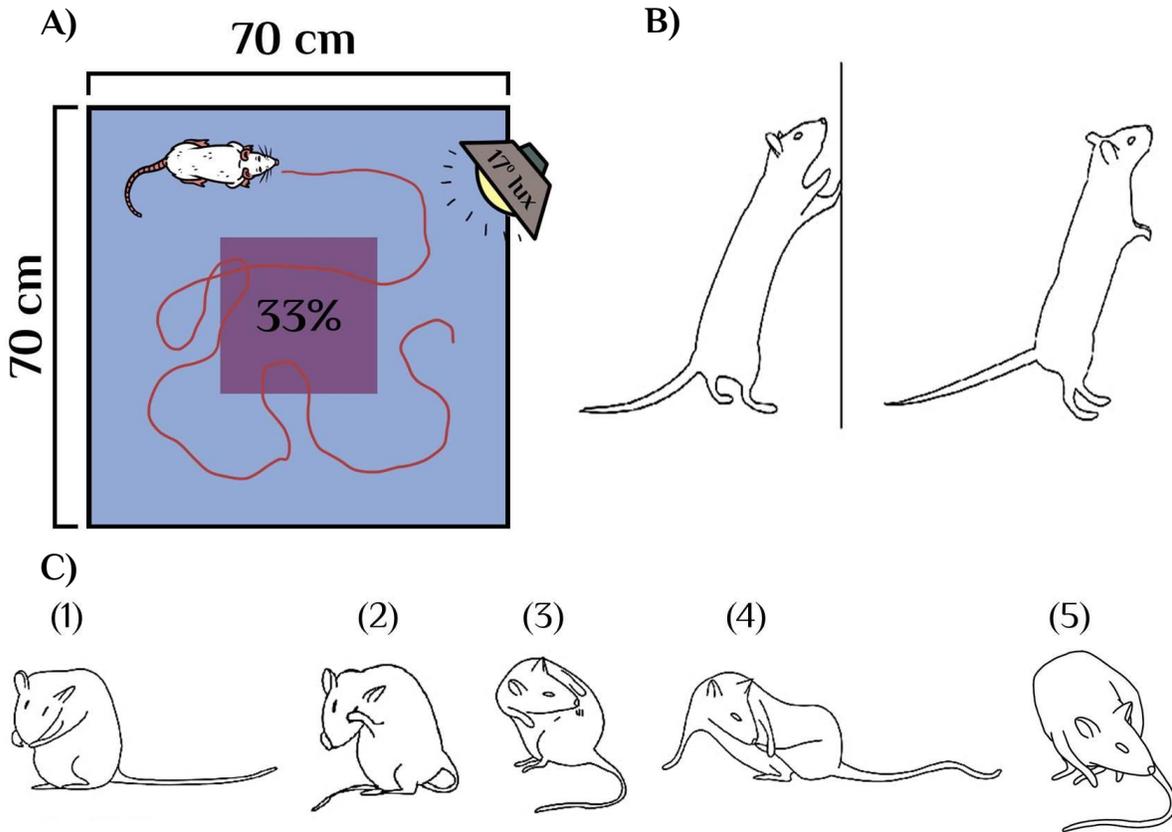
Para la medida de la actividad exploratoria general y ansiedad se utilizó la prueba de campo abierto (OFT), según el protocolo descrito por Gould *et al.* (2009). Se empleó una arena rectangular de madera oscura de 70 x 70 x 35 cm, con un área central correspondiente al 33% del área total de la arena, tal como se presenta en la Fig. 10A.

Con el fin de minimizar el estrés, producto de la exposición a un ambiente novedoso, el animal no fue cambiado de jaula en las 24 h previas a la prueba. Antes del inicio de la misma, la arena de pruebas debe limpiarse previamente con etanol 70%. Al inicio de la prueba, se coloca al animal de forma gentil cerca de una de las paredes de la arena; no debe colocarse en el centro: esto puede aumentar los niveles iniciales de ansiedad del animal.

Las grabaciones se realizaron en el plano cenital a una altura de 1.35 m de la superficie del campo abierto, por un tiempo de 10 min. Se cuantificó las distancia total recorrida y el tiempo total de estadía en la región central. Asimismo se contabilizó, como número total de observaciones en los 10 min de duración total del video, el levantamiento del animal sobre sus patas traseras (*rearing behavior*), distinguiéndose dos tipos: a) con apoyo sobre las paredes, y b) sin apoyo, como se muestra en la Fig. 10B. Por razones de conveniencia, se llamó al levantamiento con apoyo “escalamiento” (no confundir con el “escalado” de la prueba de nado forzado), y al levantamiento sin apoyo “actividad vertical”.

Como medida complementaria del estrés y ansiedad en el campo abierto, se evaluó el comportamiento de aseo del animal (*grooming behavior*), según el protocolo expuesto por Smolinsky *et al.* (2009). Se cuantificó el tiempo invertido en aseo, así como el % de transiciones incorrectas. Esta última variable se define como la relación porcentual del número total de transiciones incorrectas entre el número total de eventos de aseo observados, en los 10 min de duración de la prueba. Una transición incorrecta es aquel evento individual de aseo que

no sigue los siguientes pasos en orden estricto, presentados en la Fig. 4C: patas delanteras, cabeza, torso, patas traseras, cola y/o genitales.



**Figura 10.** Diseño y variables de la prueba de campo abierto. **A)** Diseño del campo de pruebas. **B)** Levantamientos con soporte (izquierda), y sin soporte (derecha). **C)** Secuencia correcta de aseo cefalocaudal: (1) patas delanteras, (2) rostro/cabeza, (3) cuerpo/torso, (4) patas traseras, y (5) cola/genitales. Figura modificada de Casarrubea *et al.* (2015).

Finalizada la prueba, el animal es colocado en una jaula, aislado del grupo al cual no se le ha aplicado la misma, y se limpia la arena con etanol 70% para luego proseguir con la siguiente rata.

Los videos se procesaron con el software Tracker 4.87 (Brown, 2009), a una frecuencia de 0.625 Hz para un total de 961 mediciones por video. Los animales se marcaron en el centro del lomo con una tintura fucsia intenso, de forma que pueda hacerse un contraste fuerte entre

la marca y el fondo negro del área de pruebas. El seguimiento del animal en cada video se efectuó de forma automática con la herramienta “*autotracking*” de Tracker. Con la misma, el programa realiza un seguimiento del animal usando como referencia (el punto de seguimiento) la tintura fucsia sobre el lomo del mismo. Con la data obtenida, se procedió a calcular la actividad locomotora y tiempo de estadía en la región central con el software R 3.1.3 (R Core Team, 2015), empleando el Algoritmo 1 del Anexo A.

El resto de las variables a evaluar se cuantificaron manualmente por dos previamente entrenados para el reconocimiento de los eventos de interés en cada video.

### **6.2.3. Prueba de interacción social (SIT)**

La prueba de interacción social (SIT) se realizó con el propósito de evaluar el comportamiento social en los animales experimentales. Dicha prueba se efectuó en una caja de madera cuadrangular (la arena de pruebas) de 70 x 70 x 35 cm. Se utilizó una modificación del protocolo propuesto originalmente por File & Hyde (1978). La modificación implica el no aislamiento previo de los animales antes de la realización de la prueba; tal condición de aislamiento incrementa la interacción social. Empero, solamente la interacción entre animales desconocidos (sin contacto previo) incrementa el interés por dicha actividad (File & Hyde, 1978).

Cada rata, independientemente del grupo, es colocada con un compañero no conocido y que no ha recibido tratamiento alguno. Esta última condición garantiza que cualquier variación en la interacción social puede asociarse solamente al tratamiento en cuestión. Cada par está constituido por animales del mismo sexo, que no difieren de los 10 g de peso.

Se optó por condiciones de ensayo poco estresantes: a) poca luminosidad: 17 °lux; b) arena familiar: 2 días antes de la prueba los animales son familiarizados con la arena del

campo abierto, para lo cual son colocados unitariamente en la misma durante 10 min, y dispuestos de vuelta en sus respectivas jaulas al finalizar el tiempo.

En el momento de la prueba las ratas se colocan en la arena y se separan por una pared de PVC. La prueba empieza al retirar la pared, permitiendo que las ratas interaccionen durante 7 min. Las grabaciones se realizaron en el plano cenital a una altura de 1.35 m de la superficie de la arena de pruebas. Se cuantificó el comportamiento no agresivo (olfateo, juegos, seguimiento, acicalamiento) y comportamiento agresivo (mordiscos, rasguños, lucha). Cada par debe usarse solamente una vez por prueba. Al finalizar cada ensayo, como cada sesión de familiarización previa, debe limpiarse la estructura con etanol 70%.

Las variables a evaluar se cuantificaron manualmente por dos observadores previamente entrenados para el reconocimiento de los eventos de interés en cada video.

#### **6.2.4. Prueba de nado forzado (FST)**

Para estudiar el nivel de depresión en ratas, como falta de una contra respuesta a una situación estresante, se realizó la prueba de nado forzado (FST) siguiendo el protocolo de Slattery & Cryan (2012). Se empleó un cilindro de polimetilmetacrilato transparente, de 25 cm de diámetro y 50 cm de altura. El cilindro se llenó con agua corriente hasta una profundidad de 30 cm, ajustada a 23-25 °C de temperatura.

Un día antes a la realización de la prueba se ejecutó una prueba preliminar de 10 min de duración con el objetivo de aumentar la inmovilidad observada en la prueba formal al exponer al animal a una situación estresante 24 h antes de la ejecución de la misma (Lucki, 1997), haciendo más notorio el efecto de algún posible tratamiento con la inmovilidad presentada. Al momento de la prueba, la rata es colocada gentilmente en el cilindro con agua durante 5 min, grabando en el plano cenital a una altura de 0.4 m de la superficie superior del cilindro. Finalizada la prueba, la rata es retirada, secada (con un secador de pelo) y colocada de nuevo

en su jaula. El agua del cilindro es cambiada, se ajusta nuevamente la temperatura y se procede con la siguiente rata.

Las variables cuantificadas comprenden a) inmovilización: el animal queda suspendido en el agua, sin realizar movimientos mayores que los necesarios para mantenerse a flote; b) nado (*swimming*): movimientos horizontales de las patas a lo largo del cilindro, con desplazamiento horizontal notorio; y c) escalado (*climbing*): movimientos verticales de las patas delanteras hacia las paredes del cilindro. En la Fig. 11 se muestra el diseño del cilindro junto con las variables consideradas. Se determinó el comportamiento predominante en cada intervalo de 5 seg de los 300 seg que dura la prueba, para un total de 60 observaciones. Finalizado todo el conjunto de pruebas, la estructura se limpia con etanol 70%.

Las variables a evaluar se cuantificaron manualmente por dos observadores previamente entrenados para el reconocimiento de los eventos de interés en cada video.

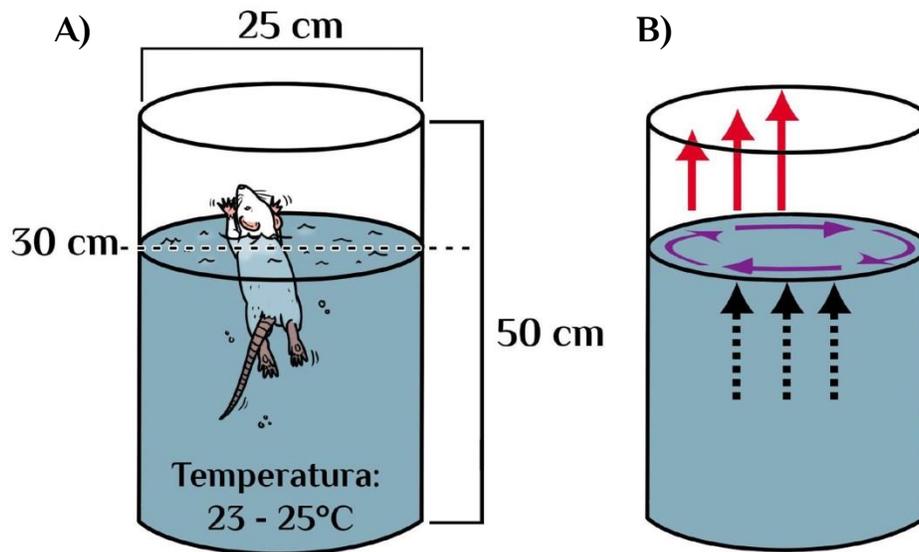
### **6.3. Histología del hipocampo**

#### **6.3.1. Fijación del tejido nervioso**

El proceso de fijación del tejido nervioso corresponderá a una modificación del descrito por Gregory *et al.* (2012), principalmente del sistema de perfusión elaborado en el laboratorio.

#### ***Anestesia***

Se utilizó como anestesia ketamina (150 mg/kg) combinada con diazepam (30 mg/kg) aplicados por vía intraperitoneal. Se consideró que el animal entró en un plano completo de anestesia cuando se observó ausencia de reflejos en la cola, patas y párpados. Se administró una cantidad extra de anestesia en los casos en que fuese necesario.



**Figura 11.** Diseño y variables de la prueba de nado forzado. **A)** Cilindro de nado. **B)** Variables consideradas en la prueba: nado (flechas moradas), escalado (flechas rojas), inmovilización (flechas negras dirigías hacia la superficie).

### ***Intervención quirúrgica***

El animal es colocado en posición decúbito dorsal sobre una superficie de madera acolchada, fijando las patas a la superficie con alfileres en las muñecas.

Se lava ligeramente el tórax del animal con etanol 70%. Seguidamente se realiza una incisión de 4-6 cm a través del tegumento y la pared abdominal, justo debajo de la cavidad torácica. Luego se efectúa una incisión de igual amplitud en el diafragma, extendiendo dicha incisión a lo largo de toda la longitud de la caja torácica hasta exponer la cavidad pleural. Se prosigue cortando a través de la caja torácica, desde uno de los lados de las costillas hasta la clavícula; se realiza un corte similar en el lado contralateral. El esternón se levanta e inmoviliza de tal manera que quede expuesto el corazón. Se retira el pericardio cuidadosamente, apartando con una pinza de sujeción roma los tejidos cercanos al corazón.

Previo a la canulación, se inyectan 0.5 mL de heparina sódica (1000 U.I./mL) en el ventrículo izquierdo para luego insertar la cánula en el mismo hasta la entrada de la aorta

ascendente, sujetando la cánula con la ayuda de un mosquito. Finalmente se realiza un corte discreto en la aurícula derecha, evitando causar daño alguno a la aorta descendente.

### ***Perfusión***

Se utilizó como sistema de perfusión una inyectora de 60 mL de capacidad, conectada a un sistema de manguerillas quirúrgicas, finalizando en una cánula, con una válvula para controlar el flujo de solución. Se adaptará al sistema una “trampa” para evitar el paso de burbujas de aire a través de la cánula y de allí al corazón.

Primeramente se realizó un lavado con 200-300 mL de tampón fosfato salino (PBS), pH 7.4, con 1000 U.I./L de heparina sódica. El aclarado del hígado se tomó como un indicio de que el lavado se realizó correctamente. La fijación se efectuó con 200-300 mL de formol 10% en tampón fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4.

### ***Disección***

Se realizó una incisión en la línea media a lo largo del tegumento del cuello hasta la nariz, exponiendo el cráneo. Se retiran los músculos del cuello y cabeza con la ayuda de tijeras y una hojilla. Se introduce una tijera iris por el agujero occipital del cráneo, deslizándola con cuidado por la superficie interna de este. Se realiza un corte hasta el borde distal de la superficie del cráneo posterior; el corte se repite en el lado contralateral.

Con pinzas romas se remueve cuidadosamente el cráneo hasta exponer el cerebelo. Se continúa cortando desde la esquina posterior distal dorsal a la distal frontal por ambos lados. Se expone el cerebro, para posteriormente cortar los bulbos olfatorios y conexiones nerviosas a lo largo de la superficie ventral.

El cerebro es retirado con una espátula empujándolo suavemente hacia afuera, y almacenado hasta su posterior procesamiento a 4 °C en formol 10% en tampón fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4, usando un volumen 10 veces mayor al volumen del cerebro,

### **6.3.2. Construcción de los bloques**

Para el proceso de deshidratación, aclaración, impregnación e inclusión se utilizó un protocolo propio estandarizado en el laboratorio. Las muestras son deshidratadas por pasos breves en soluciones de alcohol isopropílico de concentración ascendente, sumergidas en xilol absoluto y luego embebidas en parafina líquida. El protocolo se muestra en la Tabla 2. Antes del procesamiento de las muestras, éstas se cortaron a nivel del hipocampo dorsolateral en secciones de 3 mm de espesor (de bregma  $-3.50$  a  $-3.80$ ), utilizando como referencia el atlas estereotáxico del cerebro de rata (Paxinos & Watson, 2007).

### **6.3.3. Microtomía**

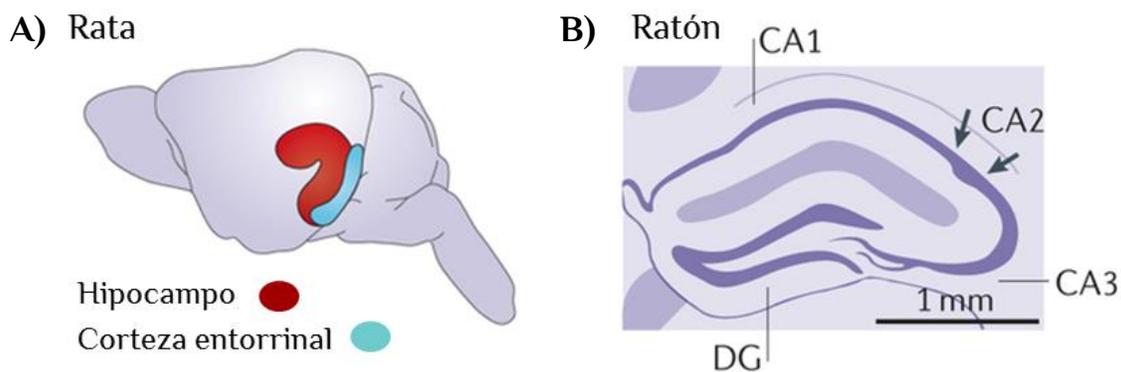
Se realizaron cortes coronales seriados de 30  $\mu\text{m}$  de espesor con un microtomo rotatorio Leica® RM2265 para el estudio de las características morfológicas y celulares del hipocampo. El mismo se aprecia en la Fig. 12. Los cortes por muestra se realizaron por duplicado, y colocados en láminas previamente tratadas con poli-L-lisina 0.1% como adhesivo catiónico.

### **6.3.4. Tinción, captura y procesamiento de las imágenes**

Los cortes se tiñeron con una tinción de Nissl, empleando azul de metileno 0.1% (pH 4.2) como colorante. El protocolo empleado se muestra en la Tabla 3. Al finalizar la tinción, las muestras son aclaradas con xilol y montadas en bálsamo de Canadá para su posterior observación en el microscopio.

El azul de metileno (un colorante catiónico) tiñe las estructuras celulares con cargas negativas, como por ejemplo el núcleo y el retículo endoplasmático rugoso (cuerpos de Nissl),

de un color azul intenso contrastando con un fondo azul claro. Los axones y dendritas no se visualizan. El nivel de especificidad de la tinción depende del pH de la solución que contiene el colorante; se pierde especificidad a medida que la solución se vuelve más neutra o alcalina (Kiernan, 2008). El molibdato de amonio actúa como agente mordiente, asegurando que el colorante no se lave del tejido al someterlo a sucesivos baños de alcohol y agua destilada. En la Fig. 13 se muestra, como ejemplo, el resultado obtenido por este método.



**Figura 12.** Anatomía del hipocampo. **A)** Ubicación espacial del hipocampo en el cerebro de rata. **B)** Morfología del hipocampo de ratón. DG: giro dentado. Imagen adaptada de Strange (2014).

**Tabla 2.** Rutina de deshidratación, aclaración e impregnación para muestras de tejido nervioso.

Tratamiento	Solución	Tiempo
1	Formol salino 10%	24 h
2	Isopropanol 75%	30 min
3	Isopropanol 85%	30 min
4	Isopropanol 95%	30 min
5	Isopropanol 100%	30 min
6	Isopropanol 100%	30 min
7	Xilol	1 h
8	Xilol	1 h
9	Parafina (58 °C)	45 min
10	Parafina (58 °C)	45 min

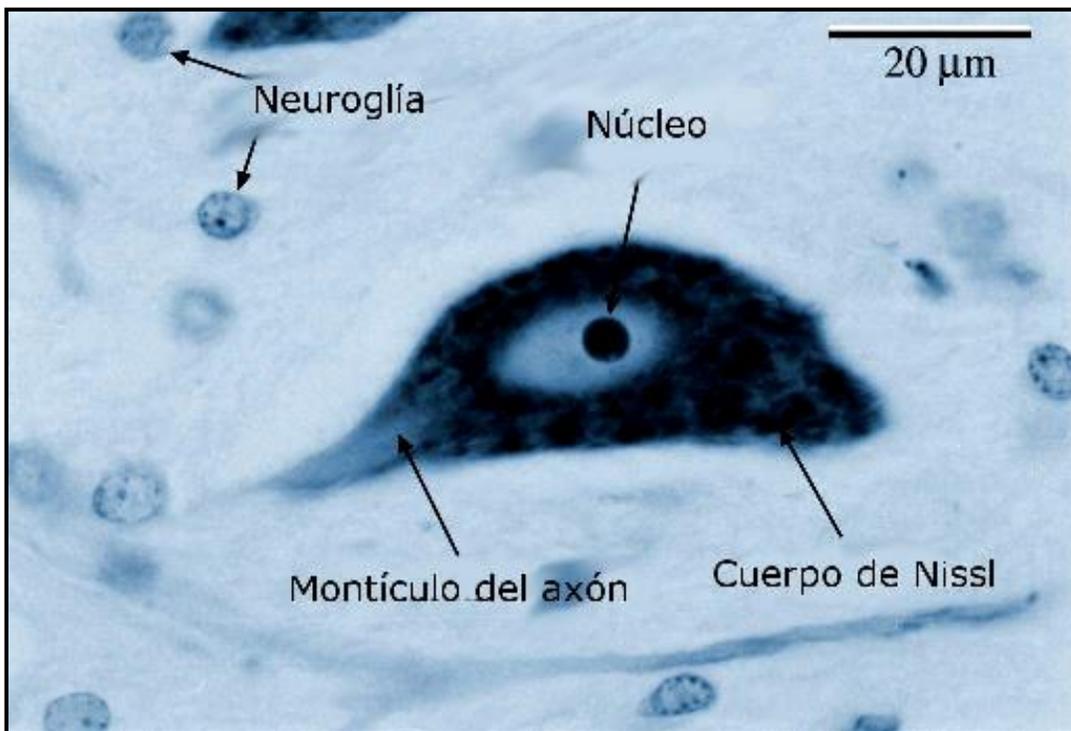
**Tabla 3.** Rutina de tinción de Nissl con azul de metileno para tejido nervioso. \*pH ajustado a 4.2 con tampón ácido acético-acetato.

Tratamiento	Solución	Tiempo
1	Xilol	3 min
2	Isopropanol 50%	3 min
3	Isopropanol 100%	3 min
4	Agua destilada	3 min
5	Azul de metileno 0.1%*	6 min
6	Molibdato de amonio 5%	6 min
7	Agua destilada	Breve lavado
8	Isopropanol 50%	3 min
9	Isopropanol 100%	3 min
10	Xilol	3 min

Las microfotografías se tomaron con una cámara Canon Powershot® 570, en un microscopio Leica® DM1000. Imágenes con una magnificación de 40x se utilizaron para estimar la densidad de neuronas por mm<sup>2</sup> en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo dorsolateral, así como el grosor promedio de la capa celular. Tales imágenes se analizaron de forma automatizada por medio del software ImageJ 1.50i (Schneider *et al.*, 2012), empleando el *plugin* ITCN (University of California, USA).

#### 6.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software R 3.1.3 (R Core Team, 2015). Las pruebas conductuales se analizaron con una prueba de Kruskal-Wallis. Se utilizó la prueba de Dunn de rangos y signos (Dunn, 1964) como prueba *a posteriori*, empleando el paquete “dunn.test” (Dinno, 2016). Para disminuir la probabilidad de cometer un error tipo I, se ajustó el valor probabilístico con una corrección de Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995).



**Figura 13.** Estructuras visibles en una tinción de Nissl. El retículo endoplasmático rugoso (cuerpos de Nissl), el núcleo y, en general, las estructuras con carga negativa se tiñen de azul intenso, contrastando con un fondo azul pálido. Magnificación: 1000x. Imagen modificada de <http://brainmaps.org>.

Para el análisis de los pesos de las crías e histología se empleó una prueba de *t*-student. Todos los datos se analizaron previamente con las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene para verificar el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, respectivamente. Con el propósito de vincular uno de los comportamientos más insigntes de los trastornos psicóticos en modelos animales, la hiperlocomoción o hiperactividad, se decidió correlacionar la actividad locomotora en la OFT con el resto de las variables conductuales mediante la prueba no paramétrica de correlación por rangos de Spearman. Así mismo, el procedimiento se realizó igualmente para la alternación en el laberinto en T y el número de piezas fecales contabilizadas al finalizar la prueba.

Para comprobar gráficamente que los grupos de animales juveniles y adultos, sometidos o no al tratamiento con ketamina, pueden separarse en base al conjunto total de las variables de comportamiento que los describen, se realizó un escalamiento multidimensional no métrico

(NMDS) con el paquete “vegan” (Oksanen *et al.*, 2016). Para evitar el efecto del peso de la escala de medida de cada variable, las observaciones se estandarizaron restando la media y dividiendo entre la desviación estándar. Se utilizó como índice de disimilitud la distancia de Manhattan, definida como la suma de las longitudes de las proyecciones del segmento que une a dos puntos en un eje de coordenadas.

El resultado del NMDS se complementó con una prueba de PERMANOVA (Anderson, 2001) usando el paquete “vegan”, incluyendo igualmente todo el conjunto de variables, y utilizando el índice de disimilitud de Manhattan. El análisis *a posteriori* se realizó con pruebas de PERMANOVA pareadas, empleando la corrección de Benjamini-Hochberg para disminuir la probabilidad de cometer un error tipo I.

Se consideró un resultado estadísticamente significativo el correspondiente a un valor de  $p < 0.05$ . Los descriptivos y gráficos de barras se representan como media  $\pm$  dev. Los diagramas de cajas están constituidos por la mediana, el 2do y 3er cuartil, y el valor mínimo y máximo de la distribución.

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Respuesta a la anestesia

Todas las hembras se recuperaron exitosamente de la anestesia con ketamina. La dosis promedio administrada por rata fue de  $248.7 \pm 60.8$  mg/kg ( $n = 4$ ). El tiempo de recuperación de la anestesia fue de  $68.1 \pm 7.9$  min. Las ratas no recuperaron su total movilidad hasta transcurridas 1-2 h después de despertar del procedimiento. Esto posiblemente tenga como causa la vía de administración utilizada (bolos intramusculares consecutivos), pudiendo la ketamina liberarse lentamente durante un mayor tiempo (efecto residual). Las hembras parieron sin complicaciones a los 5-9 días posteriores al tratamiento.

### 7.2 Cambio en el peso de las crías

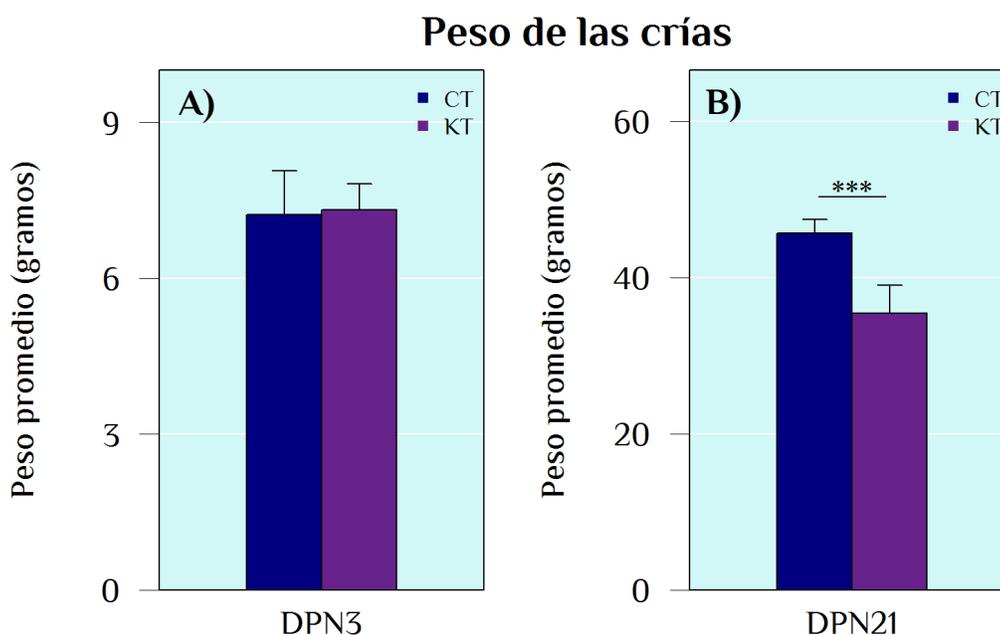
No se encontraron diferencias significativas en el peso de las crías en el DPN3 ( $7.3 \pm 0.5$  g vs  $7.2 \pm 0.8$  g del grupo control;  $p = 0.560$ ,  $t = 0.583$ ,  $n = 36/40$ ). No obstante, las crías expuestas al tratamiento con ketamina presentaron un peso 22.5% menor que el control en el DPN 21 ( $35.4 \pm 3.6$  g vs  $45.7 \pm 1.8$  g del grupo control;  $p < 0.001$ ,  $t = -15.634$ ,  $n = 36/40$ ). Los datos se presentan en la Fig. 14.

### 7.3. Pruebas conductuales

#### 7.3.1. Prueba de alternación espontánea (SAT)

Los animales de cada grupo mostraron un desempeño disímil en el laberinto en T, traducido en índices de alternación desiguales entre ellos. La prueba de Kruskal-Wallis muestra diferencias significativas entre todos los grupos ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2_{47,3} = 22.437$ ). Las ratas del grupo CTA presentaron el mayor nivel de alternación ( $79.2 \pm 10.8\%$ ) en relación a los grupos CTJ ( $51.7 \pm 11.2\%$ ;  $p < 0.001$ ,  $z = -4.467$ ,  $n = 12/12$ ), KTJ ( $63.3 \pm 10.7\%$ ;  $p < 0.05$ ,  $z = -2.530$ ,

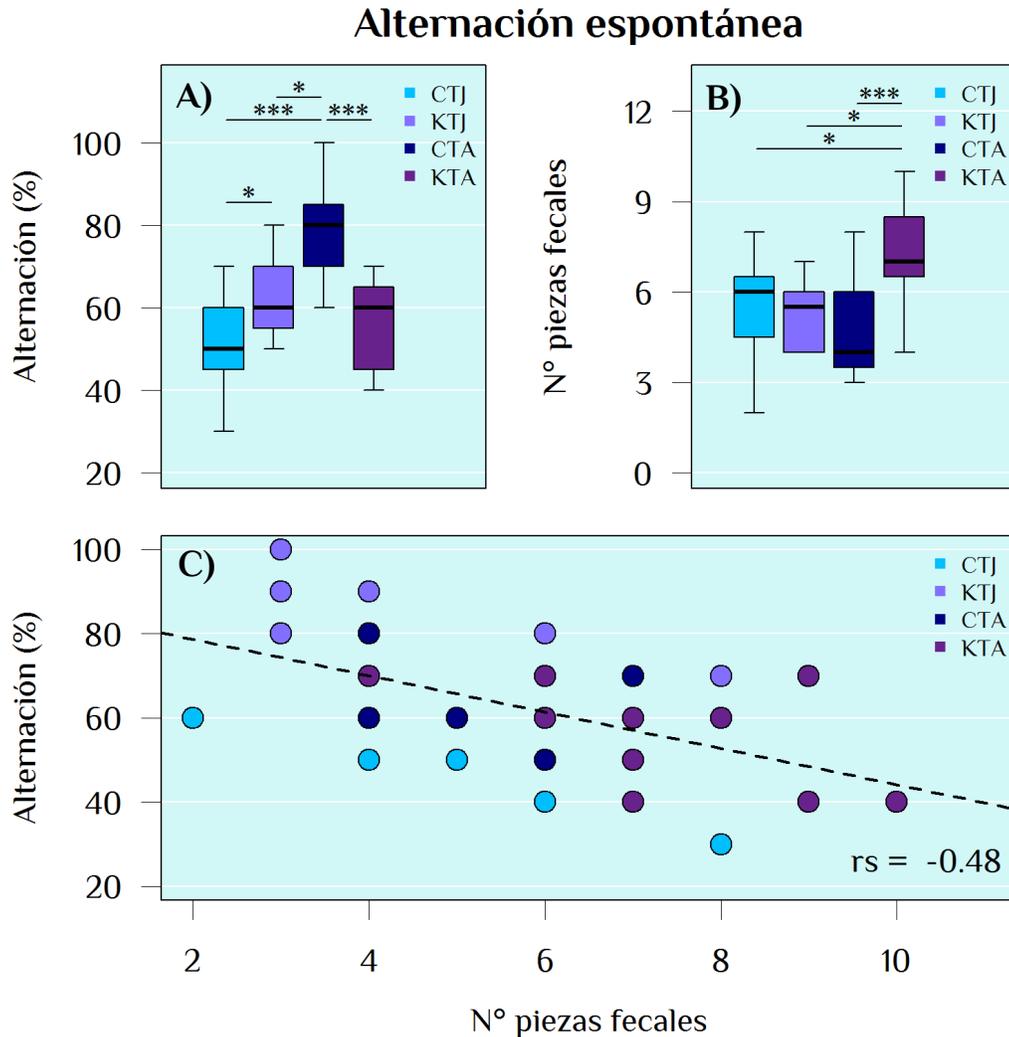
n = 12/12), y KTA ( $58.2 \pm 9.8\%$ ;  $p < 0.001$ ,  $z = -3.551$ , n = 12/11). El grupo KTJ presentó un mayor nivel de alternancia que el CTJ ( $p < 0.05$ ,  $z = 1.937$ , n = 12/12), e igual al del grupo KTA ( $p = 0.169$ ,  $z = -1.077$ , n = 12/11). Los resultados se presentan en la Fig. 15A. Los mismos parecen indicar que el tratamiento con ketamina aumenta la alternación en el laberinto en T, evento asociado a su vez a un mayor reconocimiento del entorno (capacidad de memoria espacial) en el estadio juvenil, pero afectando el desempeño de los animales en la prueba llegada la adultez, a tal punto que pudiesen presentar un nivel de alternancia igual o menor al de los individuos juveniles.



**Figura 14.** Peso de las crías **A)** DPN3, y **B)** DPN21. n = 40/36. \*\*\* $p < 0.001$ .

Los grupos experimentales presentaron diferencias significativas, respecto al número de piezas fecales totales contabilizadas al finalizar todo el conjunto de subensayos por animal ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2_{47,3} = 14.109$ ). El grupo KTA se diferencia del resto al contarse un mayor número de piezas fecales ( $7.4 \pm 1.7$ ) en contraste con los grupos CTJ ( $5.6 \pm 1.7$ ;  $p < 0.05$ ,  $z = 2.149$ , n = 11/12), CTA ( $4.6 \pm 1.6$ ;  $p < 0.001$ ,  $z = 3.681$ , n = 11/12), y KTJ ( $5.3 \pm 1.1$ ;  $p < 0.05$ ,  $z = 2.558$ , n = 11/12). Los resultados se muestran en la Fig. 15B. Al mismo tiempo, la correlación

por rangos de Spearman (incluyendo a todos los grupos simultáneamente) arroja una correspondencia negativa entre la alternación espontánea y el número de piezas fecales ( $p < 0.001$ ,  $r_s = -0.48$ ,  $n = 47$ ), tal como se aprecia en la Fig. 15C.



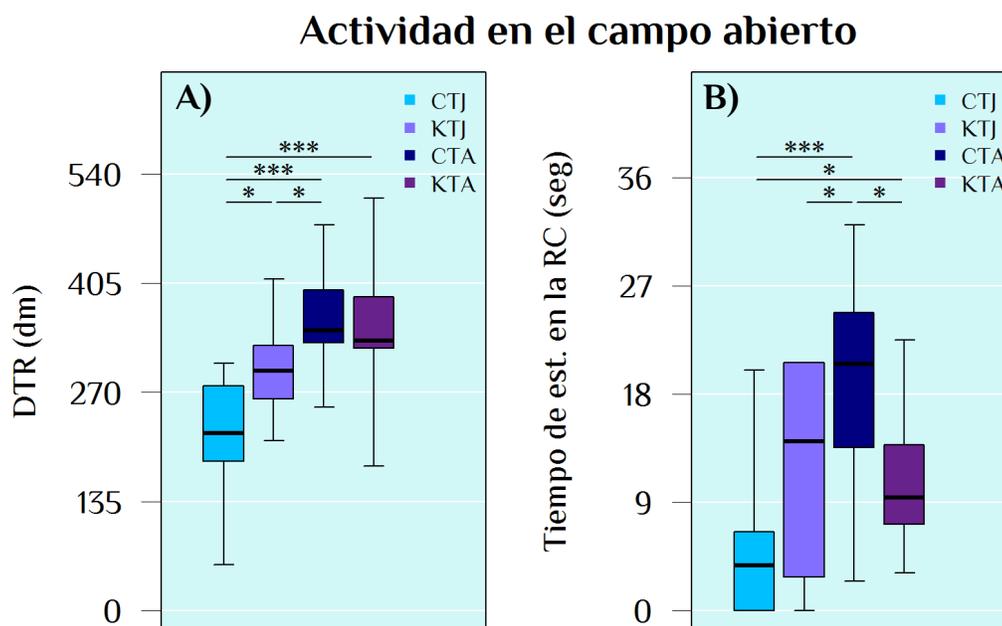
**Figura 15.** Alternación espontánea en el laberinto en T. **A)** % alternación (aciertos positivos) en el laberinto. **B)** N° total de piezas fecales promedio recolectadas por rata. **C)** N° de piezas fecales vs % alternación (correspondencia negativa).  $n = 12/12/12/11$  para las figuras superiores,  $n = 47$  para la inferior. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

No se halló correlación alguna entre la actividad locomotora y la alternación espontánea en el grupo CTJ ( $p = 0.973$ ,  $n = 12$ ), más sí una correlación positiva en los grupos KTJ ( $p <$

0.05,  $r_s = 0.61$ ,  $n = 12$ ), y CTA ( $p < 0.05$ ,  $r_s = 0.69$ ,  $n = 12$ ). El grupo KTA presentó una correspondencia negativa entre dichas variables ( $p < 0.05$ ,  $r_s = -0.62$ ,  $n = 11$ ).

### 7.3.2. Prueba de campo abierto (OFT)

Se hallaron diferencias significativas en la distancia total recorrida por animal ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2_{47,3} = 19.932$ ), como medida de la actividad locomotora general. El grupo CTJ presentó la menor inmovilidad ( $221.2 \pm 69.8$  dm) en comparación con los grupos CTA ( $359.5 \pm 69.7$  dm;  $p < 0.001$ ,  $z = -4.035$ ,  $n = 12/12$ ), KTJ ( $295.0 \pm 56.6$  dm;  $p < 0.05$ ,  $z = -1.935$ ,  $n = 12/12$ ), y KTA ( $347.6 \pm 82.3$  dm;  $p < 0.001$ ,  $z = -3.522$ ,  $n = 12/11$ ). A pesar de que el grupo KTJ se diferencia significativamente del CTA ( $p < 0.05$ ;  $z = -2.099$ ,  $n = 12/12$ ), no muestra diferencias con el grupo KTA ( $p = 0.062$ ;  $z = -1.629$ ,  $n = 12/11$ ). Así, los animales expuestos al tratamiento con ketamina parecen tener una movilidad aumentada (hiperlocomoción) en el estado juvenil, que parece normalizarse en el estadio adulto (Fig. 16A).

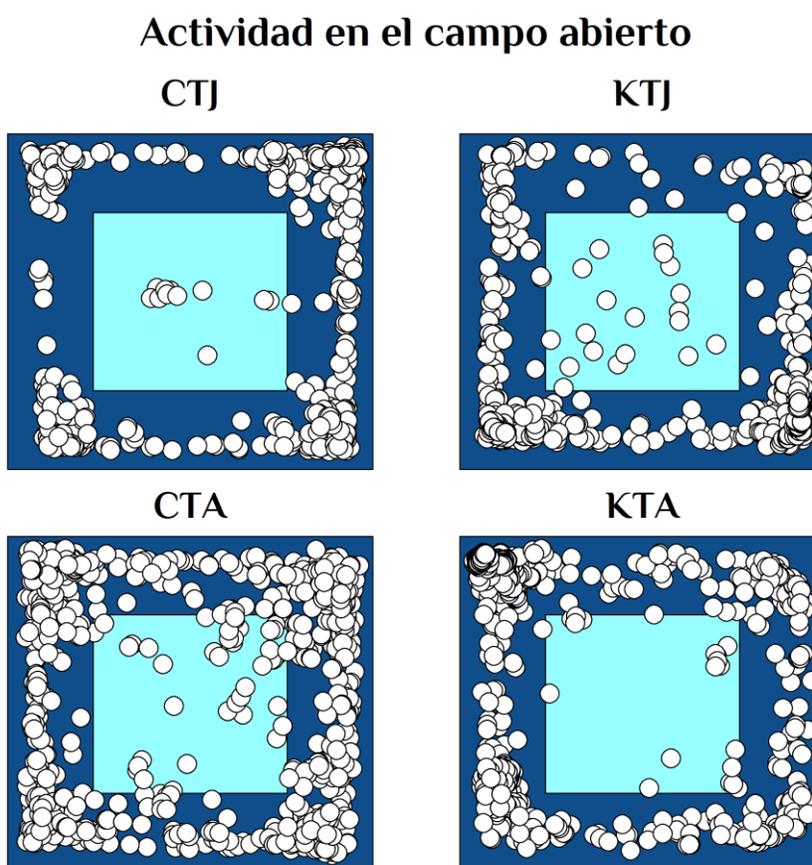


**Figura 16.** Actividad general en la prueba de campo abierto. **A)** Distancia total recorrida (DTR) en decímetros, medida de la actividad locomotora. **B)** Tiempo de estadía en la región central (RC) en segundos.  $n = 12/12/12/11$ . \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

En relación al tiempo invertido o tiempo de estadía en la región central, se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2_{47,3} = 16.086$ ). El grupo CTJ representa al grupo con menor actividad en el centro ( $4.9 \pm 5.7$  seg), en contraste con los grupos CTA ( $19.3 \pm 8.7$  seg;  $p < 0.001$ ,  $z = -4.010$ ,  $n = 12/12$ ), y KTA ( $10.6 \pm 5.6$  seg;  $p < 0.05$ ,  $z = -2.023$ ,  $n = 12/11$ ). A pesar que no se consiguieron diferencias significativas en el tiempo de estadía en el centro entre los grupos CTJ y KTJ, el valor cercano al punto crítico de rechazo podría sugerir que el grupo CTJ invierte menos tiempo en el centro que el KTJ ( $11.6 \pm 10.6$  seg;  $p = 0.056$ ,  $z = -2.035$ ,  $n = 12/12$ ). Asimismo, el grupo CTA presenta mayor tiempo de actividad en la región central que los grupos KTJ ( $p < 0.05$ ,  $z = 1.975$ ,  $n = 12/12$ ), y KTA ( $p < 0.05$ ,  $z = 1.899$ ,  $n = 12/11$ ). Los resultados se presentan en la Fig. 16B. Esto pudiera sugerir un posible estado de desinhibición inicial en el grupo juvenil expuesto a la ketamina, seguido de un incremento de los niveles de ansiedad en el estadio adulto (Fig. 17).

En relación al *rearing behavior*, vinculado regularmente con la actividad locomotora y actividad exploratoria en el campo abierto, se encontraron diferencias significativas entre los grupos, tanto en el escalamiento ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2_{47,3} = 17.384$ ), como en la actividad vertical ( $p < 0.05$ ,  $\chi^2_{47,3} = 8.695$ ). Respecto al escalamiento, en el grupo KTA se contabilizó el mayor número de observaciones por animal durante toda la prueba ( $54.1 \pm 10.1$ ) respecto a los grupos CTJ ( $28.3 \pm 9.3$ ;  $p < 0.001$ ,  $z = 4.137$ ,  $n = 11/12$ ), CTA ( $44.3 \pm 10.5$ ;  $p < 0.05$ ,  $z = 1.769$ ,  $n = 11/12$ ), y KTJ ( $39.3 \pm 19.6$ ;  $p < 0.05$ ,  $z = 2.221$ ,  $n = 11/12$ ). Al contrario, el grupo CTJ presentó menor actividad de escalamiento que los grupos KTJ ( $p < 0.05$ ,  $z = -1.960$ ,  $n = 12/12$ ), y CTA ( $p < 0.05$ ,  $z = -2.422$ ,  $n = 12/12$ ). En la actividad vertical (levantamiento sin apoyo), en el grupo KTA se registró mayor número de observaciones durante la prueba ( $10.6 \pm 5.8$ ) en comparación con los grupos CTA ( $3.8 \pm 3.6$ ;  $p < 0.05$ ,  $z = 2.801$ ,  $n = 11/12$ ), y KTJ ( $5.3 \pm 5.4$ ;  $p < 0.05$ ,  $z = 2.216$ ,  $n = 11/12$ ), más no con el grupo CTJ ( $6.7 \pm 5.8$ ;  $p = 0.130$ ,  $z = 1.514$ ,  $n = 11/12$ ). No se hallaron diferencias significativas entre el resto de los grupos. Los resultados se aprecian en la Fig. 18.

Respecto a la correlación entre el escalamiento y la actividad locomotora, se halló una correspondencia positiva en los grupos CTJ ( $p < 0.01$ ,  $r_s = 0.79$ ,  $n = 12$ ), KTJ ( $p < 0.01$ ,  $r_s = 0.81$ ,  $n = 12$ ), CTA ( $p < 0.001$ ,  $r_s = 0.95$ ,  $n = 12$ ), y KTA ( $p < 0.01$ ,  $r_s = 0.79$ ,  $n = 11$ ). En la actividad vertical, solo el grupo CTA presentó una correlación significativa con la actividad locomotora ( $p < 0.01$ ,  $r_s = -0.72$ ,  $n = 12$ ).



**Figura 17.** Patrón de desplazamiento en el campo abierto. Cada punto representa la posición del animal en cada intervalo de 0.625 seg de la duración total de la prueba (10 min). El rectángulo azul oscuro representa la arena de 70 x 70 cm, mientras que el azul claro el 33% del área de la misma.

En el indicativo auxiliar de ansiedad y estrés, referente al comportamiento de aseo (*grooming behavior*), se encontraron diferencias significativas entre los grupos tanto en el tiempo total usado en aseo ( $p < 0.05$ ,  $\chi^2_{47,3} = 8.924$ ), como en el porcentaje de transiciones incorrectas ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2_{47,3}$ ). En el grupo CTJ se registró un mayor tiempo invertido en aseo

(55.3 ± 34.3 seg) que en el grupo CTA (19.8 ± 11.1 seg;  $p < 0.05$ ,  $z = 2.726$ ,  $n = 12/12$ ), más no se encontraron diferencias significativas con los grupos KTJ (39.2 ± 32.1 seg;  $p = 0.150$ ,  $z = 1.281$ ,  $n = 12/12$ ), y KTA (63.5 ± 55.5 seg;  $p = 0.382$ ,  $z = 0.300$ ,  $n = 12/11$ ). Al contrario, el grupo CTA empleó menos tiempo en esta actividad que el KTA ( $p < 0.05$ ,  $z = -2.366$ ,  $n = 12/11$ ).

En relación a las transiciones incorrectas, en los animales del grupo CTJ se observó un menor porcentaje de transiciones mal efectuadas (62.8 ± 17.0%) respecto al orden correcto de aseo (desde el extremo anterior al posterior del animal. Véase Fig. 10C) que en los del grupo KTJ (89.7 ± 13.3%;  $p < 0.01$ ,  $z = -3.341$ ,  $n = 12/12$ ), y el grupo KTA (86.0 ± 18.1%;  $p < 0.01$ ,  $z = -3.047$ ,  $n = 12/11$ ), más no se hallaron diferencias significativas con el grupo CTA (65.9 ± 9.0%;  $p = 0.497$ ,  $z = 0.008$ ,  $n = 12/12$ ). De la misma forma, los animales del grupo CTA realizaron (en promedio) de forma incorrecta un menor número de transiciones que los del grupo KTJ ( $p < 0.01$ ,  $z = -3.349$ ,  $n = 12/12$ ), y los del KTA ( $p < 0.01$ ,  $z = -3.054$ ,  $n = 12/11$ ).

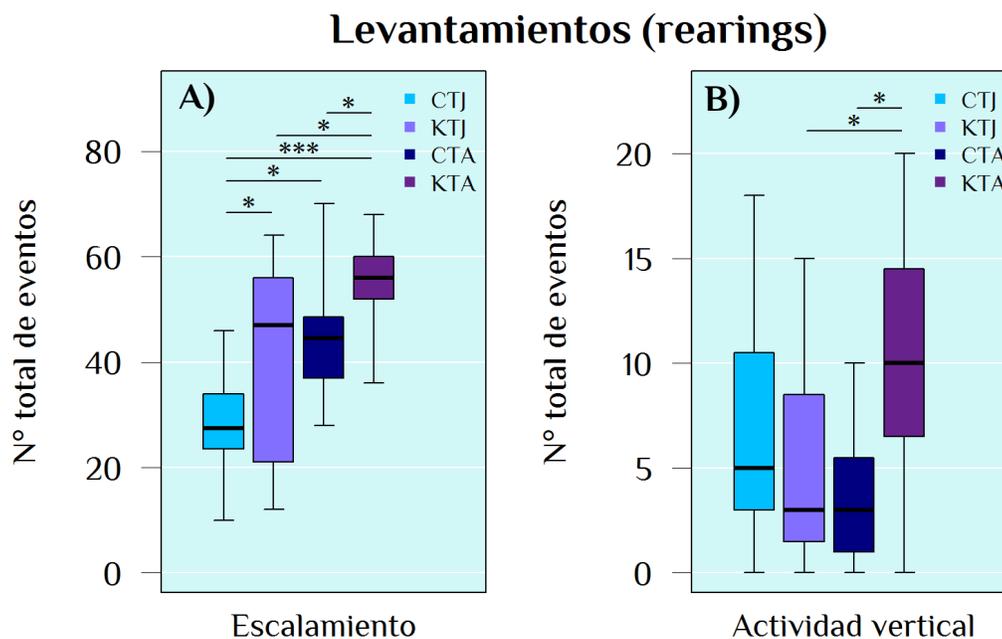
Los resultados sugieren un incremento de la reacción al estrés en los animales expuestos al tratamiento con ketamina. Empero, la respuesta conductual parece diferir entre los juveniles y adultos expuestos al tratamiento. Estos resultados se presentan en la Fig. 19.

Se halló una correlación positiva, entre el tiempo usado en aseo y la actividad locomotora, con el grupo KTA ( $p < 0.05$ ,  $r_s = 0.66$ ,  $n = 11$ ). No se encontraron correspondencias significativas con el resto de los grupos.

### **7.3.4 Prueba de interacción social (SIT)**

En la interacción social, se hallaron diferencias significativas entre los grupos, tanto en el comportamiento no agresivo ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2_{47,3} = 19.323$ ), como en el comportamiento agresivo ( $p < 0.05$ ,  $\chi^2_{47,3} = 9.581$ ). En relación a la primera, los animales del grupo KTA presentaron el

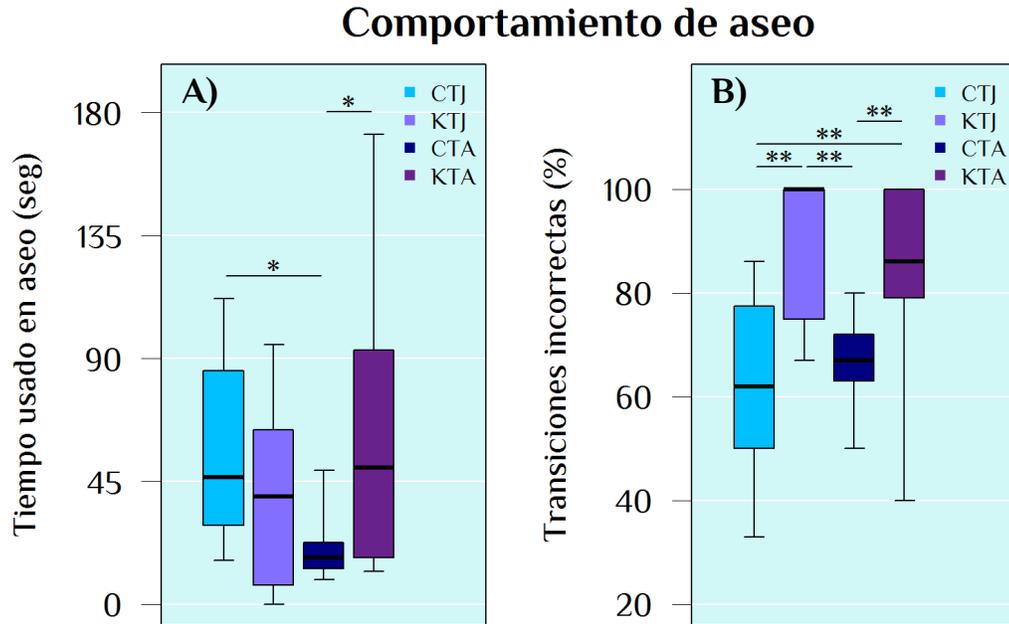
menor número de eventos no agresivos durante el desarrollo de la prueba ( $10.4 \pm 4.3$ ) en comparación con los grupos CTJ ( $19.2 \pm 5.5$ ;  $p < 0.01$ ,  $z = -3.212$ ,  $n = 11/12$ ), CTA ( $20.0 \pm 8.3$ ;  $p < 0.01$ ,  $z = -3.132$ ,  $n = 11/12$ ), y KTJ ( $21.6 \pm 4.4$ ;  $p < 0.001$ ,  $z = -4.153$ ,  $n = 11/12$ ). Conjuntamente, el grupo KTA mostró mayores niveles de agresividad al contabilizarse un mayor número de eventos agresivos ( $4.6 \pm 4.6$ ) que en los grupos CTJ ( $0.5 \pm 0.8$ ;  $p < 0.05$ ,  $z = 2.774$ ,  $n = 11/12$ ), y CTA ( $1.1 \pm 1.7$ ;  $p < 0.05$ ,  $z = 2.180$ ,  $n = 11/12$ ). En el grupo KTJ se observaron igualmente más eventos agresivos ( $2.4 \pm 2.4$ ) que en el grupo CTJ ( $p < 0.05$ ,  $z = 1.977$ ,  $n = 12/12$ ), más no con los grupos CTA ( $p = 0.128$ ,  $z = 1.371$ ,  $n = 12/12$ ), y KTA ( $p = 0.241$ ,  $z = -0.840$ ,  $n = 12/11$ ). Los resultados se muestran en la Fig. 20.



**Figura 18.** Levantamientos (*rearing behavior*) en la prueba de campo abierto. **A)** Escalamiento (levantamiento con apoyo en las paredes de la arena). **B)** Actividad vertical (levantamiento sin apoyo).  $n = 12/12/12/11$ . \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

En los animales expuestos a la ketamina, la desinhibición social parece ser una característica propia del estadio adulto, sin embargo el comportamiento agresivo parece expresarse desde la etapa juvenil. En este punto contrastan de manera marcada los animales

del grupo control (juveniles y adultos), los cuales muestran niveles nulos o casi nulos de agresividad, con pocas observaciones limitadas solo a unos cuantos animales



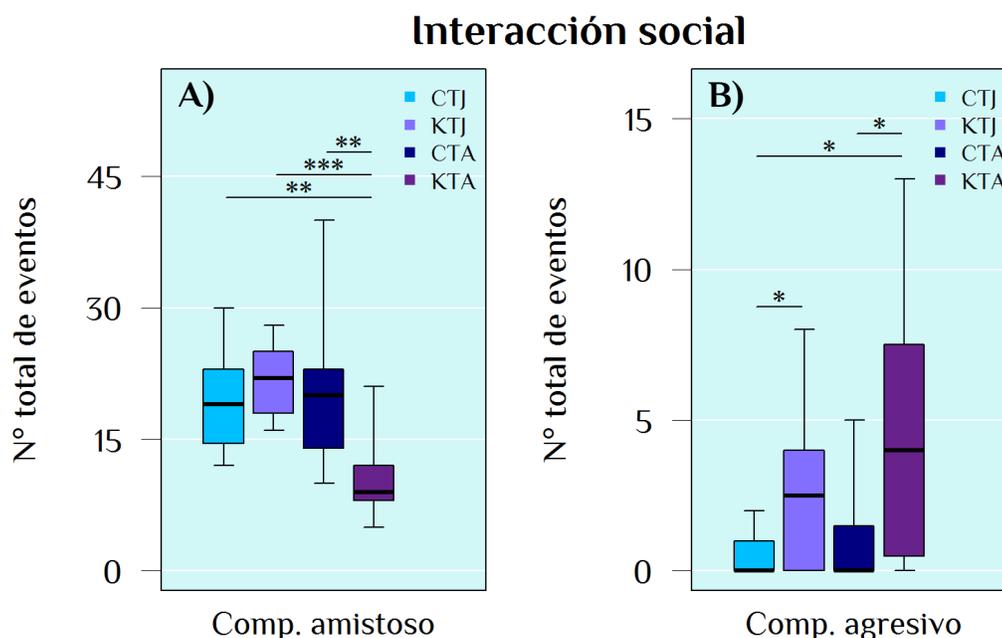
**Figura 19.** Comportamiento de aseo (*grooming behavior*) en la prueba de campo abierto. **A)** Tiempo total utilizado en la actividad de aseo al término de la prueba. **B)** % transiciones incorrectas (transiciones que no siguen el orden de aseo cefalocaudal).  $n = 12/12/12/11$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Se hallaron correlaciones estadísticamente significativas, entre el comportamiento agresivo y la actividad locomotora, en los grupos KTJ ( $p < 0.001$ ,  $r_s = 0.96$ ,  $n = 12$ ), CTA ( $p < 0.05$ ,  $r_s = 0.62$ ,  $n = 12$ ), y KTA ( $p < 0.001$ ,  $r_s = 0.99$ ,  $n = 11$ ), más no con el grupo CTJ ( $p = 0.679$ ).

### 7.3.5. Prueba de nado forzado (FST)

Los animales de cada grupo mostraron tanto niveles distintos de inmovilización ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2_{47,3} = 19.413$ ), como de nado ( $p < 0.05$ ,  $\chi^2_{47,3} = 10.341$ ), y escalado ( $p < 0.001$ ,  $\chi^2_{47,3} = 17.965$ ). Los animales del grupo CTJ presentaron menor inmovilidad ( $10.6 \pm 3.1$  puntuaciones) durante todo el transcurso de la prueba, que los animales de los grupos CTA ( $17.0 \pm 8.3$  puntuaciones;  $p < 0.05$ ,  $z = -1.799$ ,  $n = 12/12$ ), y KTA ( $24.4 \pm 7.1$  puntuaciones;  $p < 0.001$ ,  $z$

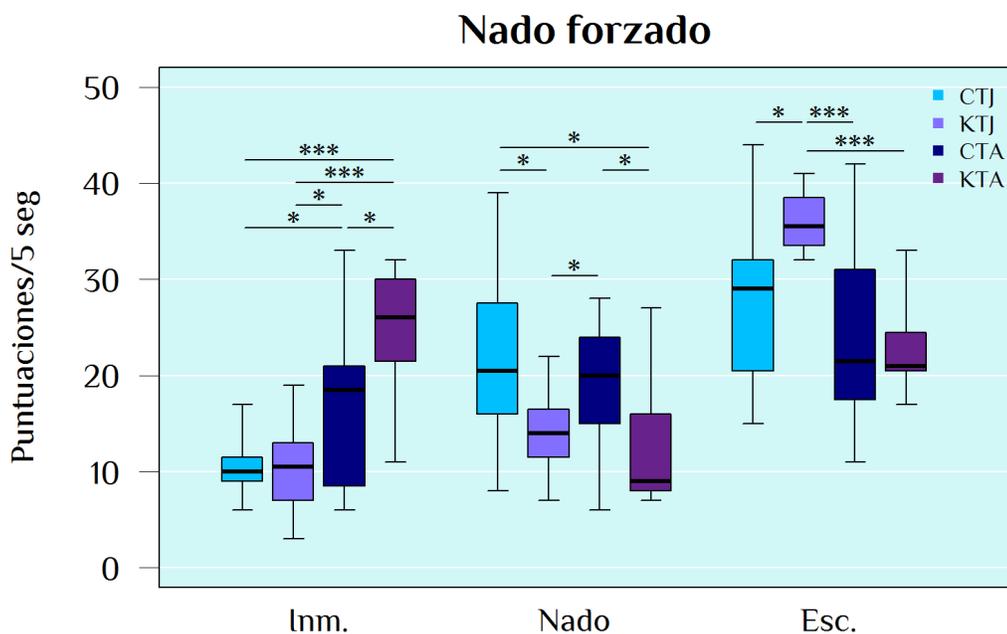
= -3.758, n = 12/11). De igual forma, el grupo KTJ presentó menor inmovilidad ( $10.1 \pm 4.5$  puntuaciones) que los grupos CTA ( $p < 0.05$ ,  $z = -1.858$ , n = 12/12), y KTA ( $p < 0.001$ ,  $z = -3.817$ , n = 12/11). Los animales del grupo CTA mostraron menor inmovilidad que los del grupo KTA ( $p < 0.05$ ,  $z = -1.999$ , n = 12/11). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos CTJ y KTJ ( $p = 0.476$ ,  $z = 0.060$ , n = 12/12), exhibiendo así ambos niveles muy similares de inmovilización. El resultado global de la prueba se presenta en la Fig. 21.



**Figura 20.** Patrón de comportamiento en la prueba de interacción social. **A)** N° total de eventos amistosos (olfateo, juegos, seguimiento, acicalamiento). **B)** N° total de eventos agresivos (mordiscos, rasguños, lucha). n = 12/12/12/11. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

De las otras dos variables a considerar, el grupo KTJ presentó el mayor nivel de actividad de escalado ( $36.2 \pm 3.0$  puntuaciones) en relación a los grupos CTJ ( $28.0 \pm 8.7$  puntuaciones;  $p < 0.05$ ,  $z = 2.452$ , n = 12/12), CTA ( $23.8 \pm 9.2$  puntuaciones;  $p < 0.001$ ,  $z = 3.526$ , n = 12/12), y KTA ( $22.8 \pm 4.6$  puntuaciones;  $p < 0.001$ ,  $z = 3.776$ , n = 12/11). No se encontraron diferencias significativas entre ninguno de los otros grupos. En relación al nado, el grupo KTJ mostró reducción de esta actividad ( $13.8 \pm 4.1$  puntuaciones) en comparación a los grupos CTJ ( $21.5 \pm 9.00$  puntuaciones;  $p < 0.05$ ,  $z = -2.207$ , n = 12/12), y CTA ( $19.2 \pm 6.6$  puntuaciones;

$p < 0.05$ ,  $z = -1.923$ ). De igual manera, el grupo KTA muestra una reducción del nado ( $12.8 \pm 7.1$ ) en contraste con los grupos CTJ ( $p < 0.05$ ,  $z = -2.577$ ,  $n = 11/12$ ), y CTA ( $p < 0.05$ ,  $z = -2.300$ ,  $n = 11/12$ ). No se encontraron diferencias significativas entre la actividad de nado del grupo KTJ con el KTA ( $p = 0.405$ ,  $z = 0.429$ ,  $n = 12/11$ ).



**Figura 21.** Actividad en la prueba de nado forzado. Cada variable corresponde a la actividad predominante en cada intervalo de 5 seg de duración de la prueba, anotándose como puntuaciones. Inm: inmovilización, Esc: escalado.  $n = 12/12/12/11$ . \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

Cabe destacar que, a pesar de que los grupos CTJ y KTJ muestran el mismo nivel de inmovilización, parecen diferenciarse en el comportamiento activo predominante: el grupo KTJ escala durante un mayor tiempo que el CTJ, y al mismo tiempo nada durante menor tiempo. En paralelo, el aumento de la inmovilización en el grupo KTA con respecto al CTA tiene como causa la reducción del comportamiento nado, al no encontrarse diferencias significativas entre el escalado entre ambos grupos ( $p = 0.371$ ,  $z = 0.328$ ,  $n = 11/12$ ). La actividad de escalado pasa a normalizarse (disminución respecto al estadio juvenil) en los adultos sometidos al tratamiento con ketamina, más la actividad de nado permanece inalterada.

No se halló correlación alguna de la inmovilización y el comportamiento de nado con la actividad locomotora. Sin embargo, se encontró que la actividad de escalado depende negativamente de la actividad locomotora en los grupos KTJ ( $p < 0.01$ ,  $r_s = 0.78$ ,  $n = 12$ ), CTA ( $p < 0.01$ ,  $r_s = 0.73$ ,  $n = 12$ ), y KTA ( $p < 0.05$ ,  $r_s = 0.64$ ,  $n = 11$ ). Los resultados de todas las correlaciones para cada variable se presentan de forma resumida en la Tabla 4.

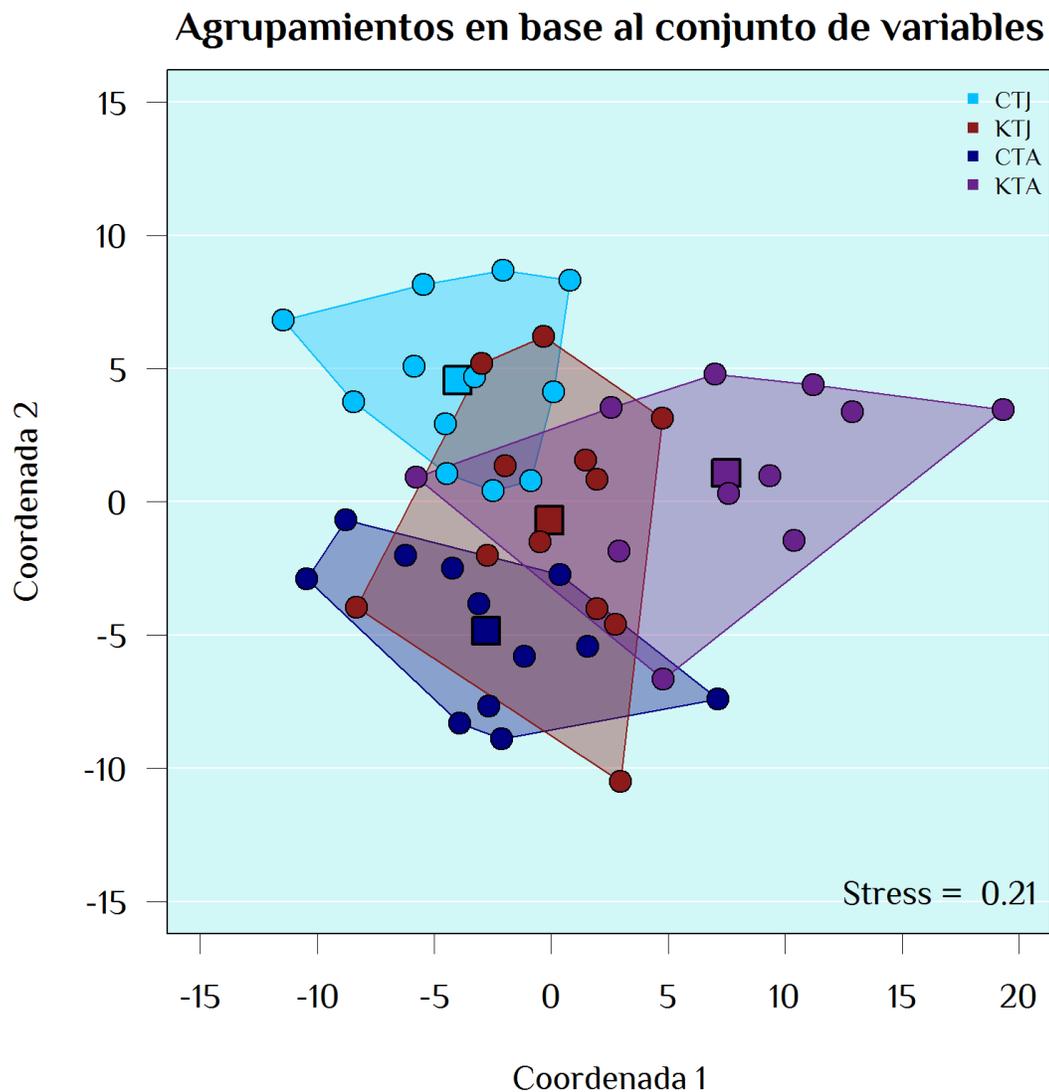
**Tabla 4.** Resumen de las correlaciones entre las variables conductuales con la actividad locomotora. Las mismas se realizaron en los grupos por separados. LA: actividad locomotora, IN: inmovilización, SW: nado, CB: escalado, SA: alternación espontánea, FB: defecación, CN: actividad en la región central, V1: escalamiento, V2: actividad vertical, GM: aseo, IG: transiciones incorrectas, SC: comportamiento social amistoso, AG: comportamiento social agresivo. Se presenta el índice  $r_s$  de correlación de Spearman. Solo se muestran las correlaciones significativas.  $n = 12/12/12/11$  (CTJ/KTJ/CTA/KTA). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Prueba	Variable	CTJ	KTJ	CTA	KTA
		LA	LA	LA	LA
Nado forzado	IN				
	SW				
	CB		0.78 (**)	0.73 (**)	0.64 (*)
Alternación espontánea	SA		0.61 (*)	0.69 (*)	-0.62 (*)
	FB				
Campo abierto	CN				
	V1	0.79 (**)	0.81 (***)	0.95 (***)	0.79 (**)
	V2			-0.72 (**)	
	GM				0.66 (*)
	IG				
Interacción social	SC				
	AG		0.96 (***)	0.62 (*)	0.99 (***)

#### 7.4. Pruebas multivariadas

El análisis gráfico por medio del NMDS, presentado en la Fig. 22, se llevó a cabo tomando en cuenta solamente dos coordenadas. El conjunto de las trece variables queda

reducido así a un espacio bidimensional. El *stress* de la prueba se calculó en 0.21, un valor que puede considerarse adecuado. Este parámetro es una medida de la discrepancia del arreglo obtenido por el NMDS respecto a la matriz de distancia o disimilitud inicial. Así, valores más cercanos a cero representan un ajuste adecuado del modelo en relación a los datos originales. El valor obtenido (0.21) asegura que se conserva el 95.59% de la variabilidad original del sistema.



**Figura 22.** Agrupamientos por escalamiento métrico no multidimensional. Los polígonos corresponden al área del gráfico que encierra todos los puntos u observaciones de un grupo particular. Los cuadrados representan los centroides de grupo.

En la Fig. 22 puede observarse una clara separación de los grupos CTJ y CTA. Estos a su vez presentan una leve superposición con los polígonos del grupo KTA. No obstante, la marcada separación entre los centroides de grupo ligado a la relativamente baja superposición en relación al tamaño de los polígonos permite suponer que los grupos pudiesen ser distintos. El grupo KTJ se solapa en gran medida con el resto, especialmente con los grupos CTA y KTA.

Los resultados del NMDS se compararon con los obtenidos mediante la prueba de PERMANOVA. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ,  $F_{3,12} = 8.769$ ) entre los grupos CTJ, CTA, KTJ y KTA, en base a todo el conjunto de variables conductuales que los representan. El análisis *a posteriori* muestra que el grupo CTJ puede separarse de los grupos CTA ( $p < 0.001$ ,  $F_{1,12} = 8.984$ ), KTJ ( $p < 0.01$ ,  $F_{1,12} = 6.078$ ), y KTA ( $p < 0.001$ ,  $F_{1,12} = 11.030$ ); el grupo CTA puede separarse de los grupos KTJ ( $p < 0.001$ ,  $F_{1,12} = 7.309$ ), y KTA ( $p < 0.001$ ,  $F_{1,12} = 8.747$ ); y por último el grupo KTJ se distingue del KTA ( $p < 0.001$ ,  $F_{1,12} = 9.834$ ). En otras palabras, todos los grupos son estadísticamente diferentes entre sí.

El alto nivel de superposición del grupo KTJ con el resto, en el NMDS de la Fig. 22, podría deberse a una varianza relativamente alta en los grupos experimentales, o a características propias del mismo grupo. Siendo éste estadísticamente distinto de los otros tres restantes, la interposición observada podría indicar que posee características en común con el resto de los grupos, características que en conjunto hacen al grupo KTJ distinto de los demás.

## **7.5. Histología del hipocampo dorsolateral**

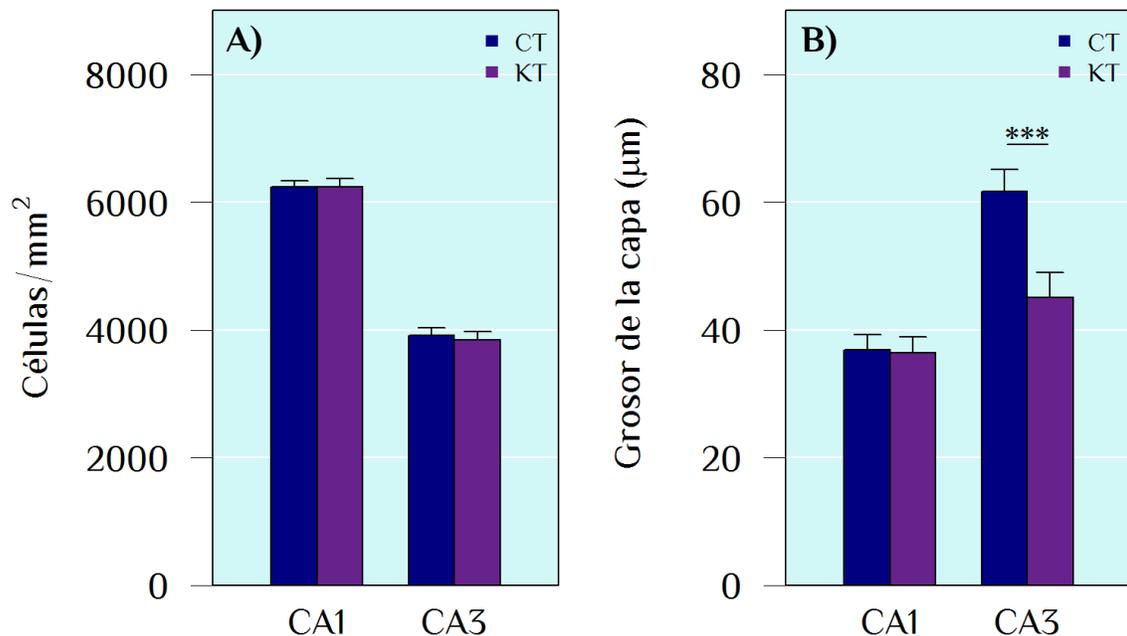
En los adultos, los cerebros debidamente lavados y fijados (Fig. 23) se utilizaron finalmente para el análisis histológico del hipocampo dorsolateral. No se hallaron diferencias significativas, entre los grupos CT y KT, en la densidad neuronal en las regiones CA1 ( $6239.9 \pm 134.5$  cel./mm<sup>2</sup> vs  $6237.4 \pm 91.3$  cel./mm<sup>2</sup> del grupo control;  $p = 0.970$ ,  $t = 0.039$ ,  $n = 8/8$ )

y CA3 ( $3841.6 \pm 128.6$  cel./mm<sup>2</sup> vs  $3916.3 \pm 112.2$  cel./mm<sup>2</sup> del control;  $p = 0.237$ ,  $t = -1.237$ ,  $n = 8/8$ ) del hipocampo. Los resultados se presentan en las Fig. 24 y 25.



**Figura 23.** Cerebro lavado y fijado. El color blanquecino y textura sólida/gomosa son indicativos de una perfusión de buena calidad.

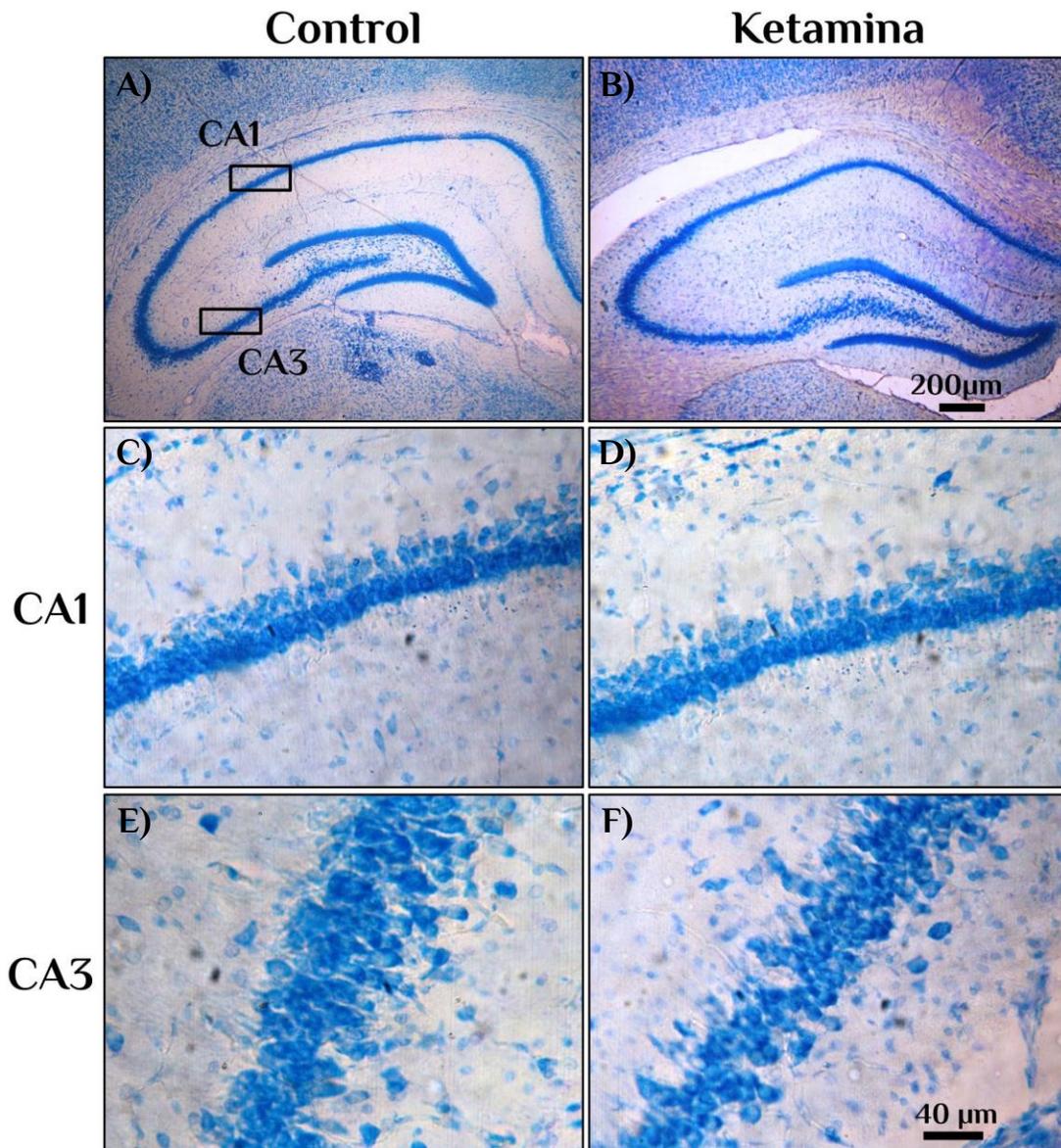
### Histología del hipocampo



**Figura 24.** Histología del hipocampo dorsolateral. **A)** Densidad neuronal (células por mm<sup>2</sup>). **B)** Grosor de la capa de células que conforman las regiones CA1 y CA3 del hipocampo.  $n = 8/8$ . \*\*\* $p < 0.001$ .

Respecto al grosor de la capa de células dispuestas en las regiones CA1 y CA3, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos CT y KT en el grosor del área CA1 ( $36.4 \pm 2.5 \mu\text{m}$  vs  $36.9 \pm 2.4 \mu\text{m}$  del control;  $p = 0.693$ ,  $t = -0.404$ ,  $n = 8/8$ ), más sí se observó una reducción promedio del 26.8% en el área CA3 en los animales tratados con ketamina respecto al control ( $45.1 \pm 3.9 \mu\text{m}$  vs  $61.6 \pm 3.5 \mu\text{m}$  del control,  $p < 0.001$ ,  $t = -8.896$ ,  $n = 8/8$ ).

Los resultados parecen indicar que el tratamiento con ketamina utilizado parece reducir el número de neuronas en la región CA3 del hipocampo. Empero, esto no se traduce en una disminución de la densidad de neuronas en tal región, sino más bien en la reducción del grosor de la capa. Las neuronas de la región CA3 parecen ser más sensibles al tratamiento con ketamina.



**Figura 25.** Tinción de Nissl del hipocampo dorsolateral. El grupo de imágenes de la izquierda representa al grupo control; el de la derecha al grupo tratado con ketamina. **A) – B)** Morfología general del hipocampo. Se señalan las áreas CA1 y CA3 del mismo. Magnificación: 40x. **C) – D)** Neuronas de la región CA1. Magnificación: 400x. **E) – F)** Neuronas de la región CA3. Obsérvese la reducción en el grosor de la capa en el grupo tratado con ketamina. Magnificación: 400x.

## **VIII. DISCUSIÓN**

Antes de considerar los cambios observados en el grupo expuesto a la ketamina, es crucial entender parte de los cambios neurobiológicos producto de la normal maduración de los circuitos cerebrales. Por ello, la primera sección se centrará en los cambios encontrados en los juveniles y adultos del grupo control. Además, en esa sección se explicará la naturaleza de las variables evaluadas en cada prueba. Posteriormente, se discutirá el efecto del tratamiento con ketamina sobre el comportamiento de los animales, considerando todos los grupos en cuestión. Finalmente, se indagará sobre las consecuencias de la exposición prenatal a la ketamina en el neurodesarrollo, la formación del hipocampo y cómo esto produce el patrón de comportamiento asociado a la esquizofrenia y a otros trastornos psicóticos.

### **8.1. Diferencias entre juveniles y adultos: patrón normal de comportamiento**

#### **8.1.1. Prueba de alternación espontánea (SAT)**

El comportamiento de alternación espontánea refleja la motivación del animal en explorar su ambiente para localizar comida, agua, pareja, refugio o cualquier otro recurso de interés. En un laberinto en T, con solo dos opciones a escoger, la probabilidad de que un individuo seleccione cualquiera de los brazos es del 50%. La selección del brazo es realizada tomando en cuenta que ninguno de los brazos ha sido previamente explorado. Cuando el ambiente es pre explorado, el animal crea una representación espacial del entorno que ha visitado, disminuyendo la probabilidad de volver a visitar el mismo brazo en el ensayo subsiguiente.

La alternación espontánea en el laberinto en T tiene ciertas particularidades respecto a otras pruebas de memoria espacial. Un laberinto constituye un ambiente realista, considerando la ecología de los roedores. Además, la alternación en el laberinto en T suele ser mayor que en otros laberintos, como el laberinto radial y el laberinto en Y, este último con una alternancia del 65% o menos (Deacon & Rawlins, 2006). Adicionalmente, la SAT es sensible a un número

cuantioso de alteraciones en la memoria espacial, como por ejemplo lesiones en el hipocampo, tratamientos farmacológicos, y alteraciones genéticas (Deacon & Rawlins, 2006).

La alternación espontánea está ligada a la capacidad de memoria espacial del animal en cuestión, la cual es función de la edad del mismo. Las ratas normales alternan por encima del 50% desde el DPN 30. En los DPN 15, 16, 20 y 25 su alternación es totalmente azarosa, con igual probabilidad de escoger cualquiera de los brazos (Egger *et al.*, 1973). Esto es consecuencia de la falta de maduración de los circuitos cerebrales durante las primeras semanas de vida de los roedores. Igualmente, se espera que la alternación espontánea se incremente a medida que el animal pasa del estadio puberal al adulto.

En una rata adulta normal, la alternación espontánea suele ser del 75% (Deacon & Rawlins, 2006). La adición de una partición central, como en el laberinto utilizado en el presente estudio (Fig. 9), puede aumentar la tasa de alternación hasta en un 85-90% (Deacon *et al.*, 2003). El grupo CTA presentó un nivel de alternación del 79.2%, mayor en comparación con el 51.7% del grupo CTJ. La alternación del grupo adulto no alcanza el 85-90% reportado por Deacon *et al.* (2003). Empero, la prueba sí permite discernir entre la capacidad de memoria espacial de los juveniles (DPN 28 al momento de la prueba) y los adultos (DPN 70). Los resultados pueden diferir por las condiciones de cría, alimentación, estrés ambiental del área de pruebas y manipulación de los animales durante cada ensayo en el laberinto. Como se comenta luego, el estrés puede disminuir la actividad exploratoria ligada a la alternación. Una desventaja de la SAT en el laberinto en T es el aumento moderado de la ansiedad en los animales experimentales por su manipulación durante todo el desarrollo de la prueba.

Los niveles de ansiedad pueden influenciar el desempeño de las ratas en el laberinto. La defecación y urinación, al introducir al animal en un entorno no familiar, son índices de estrés. La exposición del animal a un ambiente abierto, nuevo y distinto de la jaula hogar, como puede ser un campo abierto, eleva los niveles en el plasma de corticosterona, un indicativo

neuroendocrino de estrés, lo que disminuye la alternación espontánea. La inyección repetida de corticosterona, 10 mg/kg diariamente por ocho semanas, disminuye el comportamiento de alternación espontánea sin producir daño alguno a nivel del hipocampo (Bardgett *et al.*, 1996), resaltando el efecto de la ansiedad sobre este comportamiento. La correlación de Spearman negativa obtenida ( $r_s = -0.48$ ) entre el número de piezas fecales y la alternación espontánea despunta el efecto de la ansiedad y estrés sobre este comportamiento. Aun así, no se encontraron diferencias en el nivel de defecación entre adultos y juveniles. Las diferencias en el desempeño en el laberinto en T son debidas entonces a la mayor maduración del sistema nervioso central de las ratas adultas.

Diversas regiones del cerebro juegan un papel importante en la alternación espontánea: hipocampo, neocórtex, septo, núcleo magnocelular del cerebro basal anterior, diencéfalo, corteza prefrontal, ganglios basales, rafe, sistema vestibular y cerebelo. Asimismo, diversos neurotransmisores intervienen en este comportamiento, tales como la acetilcolina, dopamina, GABA, glutamato, serotonina, catecolaminas, así como algunos neuropéptidos, canales iónicos y óxido nítrico (Lalonde, 2002).

### **8.1.2. Prueba de campo abierto (OFT)**

La OFT fue propuesta originalmente como una medida del comportamiento emocional en ratas (Hall, 1934). Esta prueba permite determinar sistemáticamente la actividad exploratoria en un ambiente novedoso, la actividad locomotora general, y proveer al observador un panorama general del comportamiento relacionado con la ansiedad en roedores. Adicionalmente, suele utilizarse para evaluar memoria espacial y habituación cuando el animal es expuesto a la arena de pruebas durante sesiones largas o durante varios días consecutivos (Lever *et al.*, 2006).

La exploración se define como un proceso de investigación activa que lleva al animal a recolectar información de su ambiente (Birke & Archer, 1983). La actividad locomotora es una

de las medidas conductuales más básicas en las pruebas animales de comportamiento en neurociencia. Está muy vinculada a la “tendencia” del animal a explorar su entorno, y constituye una medida experimental muy útil para detectar los efectos de drogas y tratamientos sobre el sistema nervioso central, y cómo estos efectos se traducen en los cambios conductuales observados en los animales. En referencia a los trastornos psiquiátricos, está extensamente reportado el efecto de fármacos, lesiones, condiciones de cría, entre otros factores, sobre la actividad exploratoria en la OFT. No obstante, la información pertinente a la ontogenia del comportamiento en esta prueba está poco documentada (Lynn & Brown, 2009).

En la OFT y en el laberinto en cruz elevado (*elevated plus maze*, EPM), las medidas usualmente evaluadas comprenden la actividad locomotora y los comportamientos relacionados con la ansiedad y preservación (p.e., tigmotaxis, defecación, evitar los brazos abiertos/expuestos) (Prut & Belzung, 2003; Walf & Frye, 2007). Se asume que el centro del campo abierto es un lugar aversivo para los roedores, ya que representa un espacio donde el riesgo de depredación es alto, considerando el entorno natural de estos animales (Prut & Belzung, 2003). Tanto la actividad locomotora como el porcentaje de entradas a la región central del campo abierto se incrementan con la edad del animal: la actividad exploratoria aumenta desde la adolescencia temprana a la adolescencia tardía. Aunque la actividad locomotora no parece diferir con la edad en el EPM, los animales en el periodo de adolescencia tardía pasan más tiempo en los brazos abiertos que sus contrapartes más jóvenes (Lynn & Brown, 2009).

El incremento en la actividad exploratoria podría explicarse por el aumento de las capacidades físicas del animal a medida que se desarrolla. Sin embargo, el aumento del peso y de las capacidades físicas no pueden explicar por sí solos el incremento de la actividad exploratoria durante la adolescencia (Lynn & Brown, 2009). El patrón de exploración disímil puede ser consecuencia de los cambios en el sistema endocrino durante la adolescencia involucrados en el miedo, ansiedad, desinhibición, atracción a lo novedoso y toma de riesgos (Lynn & Brown, 2009). Existe evidencia de que los cambios en los niveles de hormonas

esteroideas juegan un papel importante en el desarrollo del cerebro y del comportamiento durante la adolescencia (Sisk & Zehr, 2005).

Las conclusiones de Lynn & Brown (2009) concuerdan con los resultados obtenidos para los grupos CTJ y CTA, representativos de animales en la adolescencia temprana y adultez, respectivamente. Las ratas adultas muestran una conducta de desinhibición, con el consecuente aumento de la actividad exploratoria. Esto se traduce en un aumento de la actividad locomotora y de las decisiones de “riesgo” para el animal, como puede ser la exposición al centro del campo abierto.

Respecto al aseo (*grooming*), esta variable constituye un comportamiento importante y evolutivamente antiguo observado en muchos taxas animales (Spruijt *et al.*, 1992). Más allá de su función higiénica, el aseo tiene otros propósitos no relacionados, como la estimulación de la piel, termorregulación, comunicación química, interacción social, disminución de la agitación y reducción del estrés. El comportamiento de aseo puede ser desencadenado por varios factores, como por ejemplo la exposición a un ambiente novedoso o a una situación estresante (Spruijt *et al.*, 1992; Smolinsky *et al.*, 2009).

Un campo abierto puede ser tanto un entorno nuevo (no explorado, no conocido) como adverso (de peligro potencial para el animal. Por ende, la introducción del animal en un entorno con estas características puede incrementar su comportamiento de aseo. Este incremento es más marcado en animales con mayor predisposición al estrés y ansiedad (Smolinsky *et al.*, 2009). Además, el aseo puede verse alterado y/o aumentado en modelos animales de depresión (Kompagne *et al.*, 2008). Sin embargo, el vínculo del comportamiento de aseo con la depresión es menos directo, apuntando la mayoría de los estudios a su relación con el estrés y ansiedad (Smolinsky *et al.*, 2009).

La administración de compuestos ansiogénicos puede incrementar tanto el tiempo invertido en aseo como el porcentaje de transiciones incorrectas. Las drogas ansiolíticas, como

el diazepam, tienen el efecto contrario (Barros *et al.*, 1994; Audet *et al.*, 2006). Las transiciones incorrectas son un indicativo de cómo el estrés puede afectar la ejecución continua del aseo. Cuando el aseo es realizado de forma “relajada” se suele completar sin errores ni interrupciones el patrón de aseo cefalocaudal. Las transiciones incorrectas son consecuencia (parcialmente) del estrés, miedo y ansiedad (Smolinsky *et al.*, 2009).

Las condiciones que llevan a la sobreexcitación o agitación del animal, como la novedad y agentes estresores, parecen activar tanto el comportamiento de aseo como el sistema hipotálamo-pituitario-adrenal (Spruijt *et al.*, 1992), lo que conlleva a la liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH). Esta hormona ejerce su efecto en la corteza suprarrenal, donde se secretan los glucocorticoides (cortisol y corticosterona) involucrados en la respuesta al estrés. Además, la administración intracraneal de la ACTH incrementa el tiempo invertido en el aseo, así como el número de transiciones de aseo incorrectas e interrumpidas (Dunn *et al.*, 1979). Conjuntamente, en este incremento del aseo producto de la acción de la ACTH intervienen además los receptores opioides, la dopamina, serotonina, acetilcolina y GABA (Spruijt *et al.*, 1992).

En el caso de los grupos experimentales, no se encontraron diferencias en el porcentaje de transiciones incorrectas entre los grupos CTJ y CTA, más sí los adultos invierten un menor tiempo en la actividad de aseo que los juveniles. La actividad exploratoria surge como una respuesta a lo novedoso. El estrés y los agentes ansiogénicos pueden disminuir dicha actividad. Paralelamente, pueden aumentar el tiempo de aseo en el animal, como una respuesta para reducir el estrés y la agitación. La inhibición en la actividad exploratoria en las ratas más jóvenes puede responder a sus instintos de preservación. Un aumento de la desinhibición producida durante la madurez en la adolescencia hasta alcanzada la adultez se traduce en un aumento de la actividad exploratoria, relacionado con una disminución del estrés causado por la exposición a un ambiente novedoso y la consecuente toma de comportamientos de riesgos (exposición al centro del campo abierto como motivo de la exploración del entorno).

Paralelamente, la disminución del estrés aminora el tiempo usado en el aseo, tal como se observa en el grupo adulto control.

Tanto en los juveniles como en los adultos no se observan discrepancias en el patrón cefalocaudal del aseo. Este patrón, en roedores, está evolutivamente conservado y comprende una serie de movimientos complejos en un orden preciso. Diversas regiones del cerebro juegan papeles sustanciales en el seguimiento de este patrón: neocórtex (modulación general), cuerpo estriado (modulación de la secuencia cefalocaudal), amígdala (modulación contextual: respuesta al estrés), hipotálamo (regulación endocrina), tronco cerebral (modulación del patrón básico de aseo), y cerebelo (coordinación motora) (Kalueff *et al.*, 2016). El aumento o disminución de las transiciones incorrectas puede llevar a un comportamiento de aseo del tipo “flexible” o “rígido”, respectivamente. El aseo rígido, repetitivo y con un patrón constante se puede relacionar con el comportamiento estereotípico de algunos trastornos psicóticos y trastornos obsesivos-compulsivos. La flexibilidad del patrón de aseo y el tiempo utilizado en dicha actividad se han asociado a diversos trastornos neuropsiquiátricos (Kalueff *et al.*, 2016). Aun así, las diferencias entre los grupos juvenil y adulto responden al estrés producto de la exposición al campo abierto, sin que se evidencie un sesgo en la estereotipia en alguno de los grupos (igual porcentaje de transiciones incorrectas).

En otro orden de ideas, al comportamiento que se observa cuando un mamífero de cuatro patas se levanta con sus extremidades traseras momentáneamente se le conoce como *rear* (alzar, erigir, levantar). Este levantamiento es una respuesta a la novedad, y constituye parte de la actividad exploratoria del animal. El levantamiento sobre las patas traseras en un campo abierto tiene ciertas ventajas en comparación con permanecer en el suelo. La postura erigida le permite al animal obtener información visual, olfatoria y auditiva del entorno. Además, el levantamiento sobre un soporte sólido otorga información somatosensitiva adicional (Lever *et al.*, 2006).

Dos tipos de levantamientos pueden distinguirse: con soporte (escalamiento), y sin soporte (actividad vertical). Las denominaciones de escalamiento y actividad vertical son utilizadas solo para diferenciar los dos tipos de levantamientos. Estas variables pueden tener significados distintos dependiendo del contexto y del objetivo del investigador.

El levantamiento puede ser desencadenado por la percepción de peligro; la actitud exploratoria estaría ligada a escapar de la situación que el animal enfrenta (Bland & Oddie, 2001). El escalamiento pudiera estar más vinculado a la actividad de escape, mientras que la actividad vertical al reconocimiento del entorno. De esta forma, el comportamiento exploratorio puede reinterpretarse parcialmente como una conducta de escape y de búsqueda de una salida (Blanchard *et al.*, 1991).

La percepción del peligro que obtiene el animal de su medio determina la frecuencia de los levantamientos en el campo abierto. Gray & McNaughton (2000) explican que esta frecuencia responde a una función de U inversa o de campana. La frecuencia de levantamientos es alta cuando los niveles de ansiedad del animal son o muy altos o muy bajos. La baja percepción del peligro conlleva a levantamientos dirigidos a la exploración general del entorno, y la alta percepción a la exploración dirigida al escape. La actividad locomotora (otra medida de la actividad exploratoria) parece correlacionarse con la frecuencia de levantamientos en el campo abierto (Thiel *et al.*, 1999; Bland & Oddie, 2001).

Es de importancia mencionar el efecto de la habituación sobre la frecuencia de los levantamientos. Mientras mayor sea el tiempo de exposición del animal en su entorno (horas, días), la frecuencia de este comportamiento disminuye (Lever *et al.*, 2003). Al ser esta variable una medida de la actividad exploratoria, puede pensarse que debería disminuir a medida que el ambiente se hace más familiar, lo cual está relacionado con los procesos de aprendizaje y memoria (Lever *et al.*, 2006). De esta forma, tanto el escalamiento como la actividad vertical pudiesen estar afectados en animales con déficits en la memoria espacial: menor desaceleración de la frecuencia de los levantamientos con el transcurso del tiempo. No

obstante, la disminución de los levantamientos asociada a la habituación suele observarse en horas e incluso días de continua exposición al campo abierto, además de estar influenciada por las condiciones de estrés del animal y del área de pruebas en sí (Lever *et al.*, 2006). Por ello, no debe limitarse el estudio del *rearing behavior* al aprendizaje y memoria espacial solamente; el alcance y las limitaciones de esta variable conductual dependen de la metodología y de las condiciones de ensayo empleadas.

Los resultados obtenidos en el grupo control concuerdan en parte con la ya expuesto, al igual que con los resultados del resto de las variables relacionadas con la actividad exploratoria. En las ratas del grupo CTJ se observó menor escalamiento que en las del grupo CTA. Puede decirse entonces que las ratas adultas tienen una tendencia natural a explorar su entorno de forma más activa. La ansiedad y la inhibición de las ratas al inicio de la adolescencia contribuyen a la disminución del interés por la actividad exploratoria, interés que va aumentando a medida que el animal madura y llega a la adultez. Aunque se aprecia mayor actividad vertical en el grupo CTJ respecto al CTA (6.7 vs 3.8 observaciones en los 10 min de duración de la prueba), no puede llegarse a una conclusión concreta sobre este hecho, tanto por la falta de diferencias significativas ( $p = 0.141$ ) como por el poco tiempo de duración de la prueba (10 min).

Por último, al estar influenciado el *rearing behavior* con la capacidad de memoria espacial y la ansiedad del animal, no es de extrañar que el hipocampo y la amígdala jueguen un papel importante en este comportamiento (Lever *et al.*, 2006).

### **8.1.3. Prueba de interacción social (SIT)**

La SIT fue propuesta originalmente por File & Hyde (1978) como una medida de los niveles de ansiedad en roedores. Esta prueba implicaba el aislamiento previo de los animales por 5 días, de forma que aumentasen su interés en la interacción social. Esta se daba entre ratas no conocidas (sin ningún contacto previo), lo que también incrementaba el interés del

animal por relacionarse con su contraparte durante la prueba. Reportan un aumento de la interacción social amistosa mientras menos estresantes fueran las condiciones de la prueba (poca iluminación, entorno familiar). Además, el número de eventos agresivos crece considerablemente (hasta 4 y 6 veces más) cuando se ha habituado al animal a la arena de pruebas. La condición menos estresante (baja luminosidad, entorno familiar) propicia más el comportamiento agresivo que las condiciones más ansiogénicas.

Los resultados expuestos dan a resaltar que tanto el comportamiento amistoso como el agresivo parecen depender negativamente de la ansiedad de los animales. ¿Cómo puede explicarse el aumento de la agresividad con el establecimiento de condiciones menos ansiogénicas en la prueba? Primero, la familiarización con el entorno puede aumentar el comportamiento territorial de los animales, comportamiento afianzado al encontrarse con un conespecífico desconocido. Segundo, parte de la metodología de File & Hyde implica el aislamiento previo de la rata para incrementar la interacción social. El aislamiento por varios días consecutivos puede aumentar el comportamiento agresivo en ratas (Niesink & van Ree, 1982), al mismo tiempo que incrementa el comportamiento amistoso.

La metodología empleada en el presente estudio no incluye el aislamiento previo de los animales, más sí implica que estos sean conespecíficos sin previo contacto. Los grupos CTJ y CTA no se diferencian ni en el nivel del comportamiento amistoso ni del agresivo. Más aún, el número promedio de eventos de interacción agresivos es casi nulo (0.5 vs 1.1 para los grupos CTJ y CTA, respectivamente). El no aislamiento previo a la prueba pudiera, tal vez, justificar la poca agresividad de las ratas durante la misma. En razón de ello, se ha reportado que la remoción secuencial de individuos, en cohortes de ratas alojadas en un mismo grupo, actúa como un potente agente estresor para el resto de las ratas de la cohorte (Kask *et al.*, 2001).

Hasta los momentos son pocos los reportes enfocados en la ontogenia del comportamiento amistoso en ratas. Panksepp (1980) estudian el comportamiento de juego en ratas desde el DPN 18 al 62. Notan un pico en el tiempo dedicado a la actividad de juego

entre los DPN 32-40 que luego disminuye de forma gradual hasta el DPN 62. Este pico se mantiene tanto en los animales sometidos al procedimiento de aislamiento previo a la prueba, como en los animales mantenidos siempre en grupo antes de la realización de la misma. Empero, su estudio está delimitado al comportamiento asociado al juego, sin tomar en cuenta el resto de los ítems que componen el comportamiento amistoso. Se podría concluir que si bien las ratas de los grupos CTJ y CTA no difieren en el nivel de comportamiento amistoso expresado, la naturaleza de las interacciones pudiese ser distinta (mayor actividad asociada al juego en los animales juveniles, por ejemplo).

#### **8.1.4. Prueba de nado forzado (FST)**

Como se ha comentado, la FST modificada disminuye el tiempo de inmovilización respecto a la versión clásica de la prueba. En la versión modificada la altura de la columna de agua es de 30 cm, en comparación con los 16 cm de la prueba clásica. Esta modificación disminuye el tiempo de inmovilización en el animal; estos ya no pueden estabilizarse en el fondo del cilindro con la cola. La utilidad práctica de la modificación radica más bien en la disección del comportamiento en tres categorías: nado, escalado e inmovilización. Estudios farmacológicos muestran que el comportamiento de nado está vinculado al sistema serotoninérgico, mientras que el de escalado con el noradrenérgico. Las drogas que actúan como inhibidores de los transportadores de serotonina (SERT, *serotonin transporter*) incrementan el nado, sin afectar el escalado. Asimismo, las drogas que actúan como inhibidores de los transportadores de noradrenalina (NET, *norepinephrine transporter*) aumentan el escalado sin afectar el nado (Detke & Lucki, 1996; Cryan *et al.*, 2005). Esto permite elucidar los mecanismos de acción de los agentes antidepresivos, y además otorga información indirecta sobre cómo un determinado tratamiento puede afectar las vías de neurotransmisión por serotonina y noradrenalina.

Los animales del grupo CTJ muestran menor inmovilidad que los del grupo CTA, sin embargo no se observan diferencias en el nado y en el escalado. ¿A qué puede atribuirse

entonces la menor inmovilización de los juveniles? Aunque ambas variables aportan a la reducción de la inmovilización en los animales, pueden operar en un mismo sentido o en sentido contrario. Por ejemplo, un animal puede presentar un alto nado y bajo escalado, otro niveles intermedios de ambas variables, y un tercer animal un escalado alto y un nado bajo. En los tres casos podría cuantificarse el mismo grado de inmovilización, a pesar de que difieren en las otras dos variables. A nivel estadístico, las variables de nado y escalado pueden presentar una gran dispersión (varianza) en relación al valor promedio, lo que disminuye la sensibilidad de las pruebas de inferencia estadística para detectar diferencias significativas.

Los resultados presentan ciertas similitudes con los obtenidos por Ulloa *et al.* (2012). Las ratas prepubertas (DPN 24) presentan menor inmovilización que las pubertas (DPN 40). A pesar de que no hallan diferencias entre las ratas prepubertas y pubertas con las adultas (3-5 meses de edad), existe la tendencia de una mayor inmovilización en las ratas adultas respecto a las prepubertas. Hallan además una menor expresión de SERTs en el septo lateral y rafe dorsal en las ratas pubertas, y una mayor expresión en las prepubertas. Esto pareciera ser contradictorio, ya que los antidepresivos que actúan al nivel del sistema serotoninérgico inhiben los SERTs, aumentando así los niveles de serotonina en la hendidura sináptica. Una posible explicación a este hecho es proporcionada por la hipótesis de Blakely's (Steiner *et al.*, 2008). Tal hipótesis señala que la regulación de las proteínas transportadoras de la membrana presináptica depende principalmente de la concentración de serotonina en la hendidura sináptica. De esta forma, la mayor expresión de SERTs en los individuos prepubertos puede reinterpretarse como una mayor concentración de serotonina en éstos, lo que podría explicar la menor inmovilización observada en la FST.

Las ratas del grupo CTJ presentaron menor inmovilidad que las del grupo CTA, sin embargo la edad de los animales juveniles al momento de la FST (DPN 33) difiere de la edad que Ulloa *et al.* consideran para el estadio puberal (DPN 40). Otro dato interesante del citado estudio es el incremento de la actividad locomotora en la OFT desde el estadio prepuberal al adulto joven: más del doble de ambulación de los adultos respecto a los animales

prepuberales. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio. Asimismo, queda descartado el efecto de la actividad locomotora sobre la actividad en la FST: la locomoción observada en la OFT no necesariamente tiene que coincidir con los niveles de inmovilización en la FST.

## **8.2. Disminución del peso de las crías**

El tratamiento con ketamina causó la disminución del peso de las crías al poco tiempo del nacimiento, en el DPN 3. En contraste, se ha reportado que la administración sub-crónica de PCP (5 mg/kg) en ratas durante los días embrionarios 6 a 18 causa la reducción del peso de las crías al nacer, en conjunto con varios déficits neurobiológicos (Lu *et al.*, 2011). Asimismo, el consumo de ketamina en mujeres embarazadas se ha asociado a una disminución del peso de los hijos al momento del nacimiento, con el posterior desarrollo de hipotonía y disfunción cerebral moderada (Su *et al.*, 2010).

El peso en las crías sometidas al tratamiento prenatal con ketamina fue un 22.5% menor que el peso de las crías del grupo control, en el DPN 21. Una dosis aguda de ketamina podría no originar las mismas consecuencias, sobre el desarrollo del feto, que la administración sub-crónica del compuesto. La administración crónica comprende un mayor tiempo de exposición a la droga durante el desarrollo, y consecuentemente los efectos del tratamiento podrían ser más marcados. Esto explicaría por qué la dosis anestésica, aplicada una única vez, no afecta el peso de las crías al momento del nacimiento.

Zhao *et al.* (2014) sí reportan una reducción del peso de las crías en el estadio puberal (DPN 28) de un 26.7%. La reducción del peso podría ser causa de alteraciones en la fisiología de los animales, mediadas por el efecto de la ketamina en el neurodesarrollo y en el sistema nervioso central. La hiperlocomoción y agitación, así como elevados niveles de noradrenalina, pudiesen aumentar la demanda metabólica del animal y producir la reducción del peso observada en las crías.

### **8.3. Efecto del tratamiento con ketamina sobre el comportamiento**

#### **8.3.1. Neurotransmisión**

Esta primera subsección no se centrará en explicar los cambios en el comportamiento de los animales sometidos a la ketamina, sino más bien en dar a entender cómo pueden estar afectadas las vías de neurotransmisión en estos animales. Aunque no se hayan medido directamente los niveles de neurotransmisores en el cerebro, las variables conductuales pueden ofrecer información indirecta sobre qué podría estar siendo afectado.

La actividad hiperdopaminérgica subcortical se ha asociado fuertemente con la esquizofrenia, tomando como base el mecanismo de acción de las drogas antipsicóticas (actúan principalmente como antagonistas de receptores de dopamina). La hiperlocomoción es producto también de la actividad hipoglutamatérgica cortical. Por ello, tanto el glutamato como la dopamina juegan roles importantes en la patología del trastorno. La hiperactividad locomotora se ha asociado a ciertos componentes de los síntomas positivos de la esquizofrenia, como la agitación psicótica (van den Buuse, 2010). La exposición al estrés puede aumentar la actividad dopaminérgica subcortical, produciendo la hiperlocomoción asociada a los síntomas positivos en los modelos animales de esquizofrenia (Lipska & Weinberger, 2000; Geyer & Moghaddam, 2002). La administración de agonistas dopaminérgicos (anfetaminas, cocaína) o de antagonistas de receptores NMDA (ketamina, PCP, MK-801) produce el mismo patrón de hiperlocomoción en ratas (Cohen *et al.*, 1962; Krystal *et al.*, 1994, van den Buuse, 2010). Tanto el estrés como la administración de estas sustancias exacerban los síntomas en los pacientes esquizofrénicos.

Es notable la correlación positiva entre la actividad locomotora y el escalado en los grupos KTJ, CTA y KTA. Igualmente, la actividad locomotora se corresponde positivamente con el escalamiento en todos los grupos, y negativamente con la actividad vertical solo en el grupo CTA. Como ya se mencionó, el comportamiento de escalado y de nado en la FST son

indicativos indirectos de la actividad noradrenérgica y serotoninérgica. En los animales del grupo KTJ se observó tanto un incremento de la actividad locomotora como del comportamiento de escalado respecto al grupo CTJ. Este aumento de la actividad locomotora puede asociarse a la hiperfunción dopaminérgica subcortical observada en la esquizofrenia. Asimismo, el aumento de la actividad de escalado en los individuos juveniles sometidos al tratamiento con ketamina parece sugerir una posible hiperactividad noradrenérgica, asociada además (por la correlación planteada entre la actividad locomotora y el escalado) con el aumento de la locomoción motivado de la alteración de la neurotransmisión por dopamina. La correlación también es significativa en los grupos CTA y KTA, con la sola diferencia de que el grupo KTJ es el que muestra el mayor nivel de escalado en la FST. Entonces, ¿el incremento de la neurotransmisión dopaminérgica puede ir de la mano con un posible aumento de la neurotransmisión noradrenérgica?

La neurotransmisión noradrenérgica se ve igualmente afectada en la esquizofrenia. Los neurolepticos utilizados para el tratamiento de la esquizofrenia bloquean los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos, al igual que los receptores  $D_2$  dopaminérgicos. Además, se ha reportado un incremento de estos receptores en pacientes esquizofrénicos, en conjunto con los niveles de noradrenalina y dopamina en el cerebro. Conjuntamente, agonistas dopaminérgicos indirectos (p.e., D-anfetamina, metilfenidato) producen cuadros psicóticos más fuertes que agonistas dopaminérgicos directos (p.e., apomorfina y bromocriptina). Estos agonistas indirectos tienen un mayor efecto sobre los niveles de noradrenalina en el cerebro que sobre los niveles de dopamina (van Kammen & Kelley, 1991). En base a esto, se ha planteado el uso de fármacos que actúen sobre el sistema noradrenérgico como alternativa al tratamiento de los trastornos psicóticos. Estudios preclínicos muestran que la administración de inhibidores de los NETs (p.e. reboxetina) en conjunto con antagonistas  $\alpha_2$  adrenérgicos (p.e. mirtazapina, RX-821002), aumentan los niveles de dopamina en la corteza prefrontal por la excitación producida por las aferencias noradrenérgicas del locus cerúleo, sin incrementar la actividad dopaminérgica mesolímbica (Masana *et al.*, 2011; Hensler *et al.*, 2013).

La actividad serotoninérgica pudiese igualmente estar afectada en los animales sometidos al tratamiento con ketamina. En estos animales se observó una disminución del comportamiento de nado en el estado juvenil que, a diferencia del escalado, no se estabiliza cuándo estos llegan al estadio adulto. Esto pudiese señalar una disminución de la neurotransmisión serotoninérgica producto del tratamiento prenatal agudo con ketamina. Los estudios preclínicos en roedores muestran que los antipsicóticos de segunda generación, como la clozapina, olanzapina, risperidona, entre otros, actúan como agonistas de receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>. La activación cortical de estos receptores es necesaria para el aumento de la actividad dopaminérgica en la vía mesocortical, lo cual mejora parcialmente la cognición y memoria verbal en pacientes esquizofrénicos (Hensler *et al.*, 2013). Sin embargo, debe considerarse también que los antagonistas parciales de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> mejoran parte del cuadro clínico de la esquizofrenia. Más allá, el papel de la neurotransmisión serotoninérgica en el trastorno esquizofrénico no es del todo claro hasta los momentos, en parte debido al limitado número de estudios relacionados con las alteraciones de la neurotransmisión por serotonina en la esquizofrenia (Selvaraj *et al.*, 2014).

Por otro lado, la relación entre los levantamientos y la actividad locomotora ha sido reportada por Thiel *et al.* (1999). En ratas con alta y baja disposición a levantarse sobre sus patas traseras (*rear*) en la OFT, la actividad locomotora se correlaciona positivamente con la frecuencia de levantamientos en las ratas con alta predisposición a este comportamiento. Las ratas con mayor predisposición al levantamiento presentaron además niveles más altos de dopamina en el cuerpo estriado ventral, en conjunto con niveles más bajos de serotonina en la corteza prefrontal medial.

Por último, la actividad locomotora en la OFT se correlaciona positivamente con la agresividad en la prueba de interacción social en los grupos CTA, KTJ y CTA, siendo esta correlación más fuerte con estos dos últimos grupos. Durante la prueba de interacción social, los niveles de ACTH en el plasma de los animales se incrementan, independientemente de las condiciones de prueba. Este efecto es más acentuado mientras mayor sea el estado de estrés y

ansiedad del animal (File, 1988). La hiperlocomoción en la OFT puede igualmente ser desencadenada por el estrés a lo novedoso, o por la exposición a fármacos que incrementen la actividad dopaminérgica subcortical. En función de lo expuesto, tanto la agresividad como la actividad locomotora en los grupos expuestos a la ketamina pudiesen ser una respuesta al estrés asociado a las pruebas de campo abierto e interacción social.

### **8.3.2. Prueba de alternación espontánea (SAT)**

Las facultades cognitivas suelen encontrarse deterioradas en algunos pacientes esquizofrénicos, mientras que el tratamiento farmacológico no suele mostrar mucha eficacia en contrarrestar los síntomas cognitivos. Una disminución del porcentaje de alternación en el laberinto en T respecto al control se ha observado en ratas adultas sometidas a la administración perinatal de PCP (Mouri *et al.*, 2007), en conjunto con el incremento de la actividad locomotora y otros cambios del comportamiento normal. Está bien documentado, en distintos modelos animales, las diferentes alteraciones en las tareas cognitivas ligadas al trastorno esquizofrénico (Jones *et al.*, 2011).

Los animales del grupo KTA mostraran menor desempeño en la SAT que los del grupo CTA. Muestran a su vez el mismo nivel de alternancia que los individuos juveniles, sometidos o no al tratamiento con ketamina. Un dato que salta a la vista es el mejor desempeño de las ratas del grupo KTJ en comparación con las ratas del grupo CTJ. Al momento de la prueba (DPN 28) las ratas no deberían mostrar una alternancia significativamente superior al 50%, debido a la poca maduración de las áreas corticales y subcorticales del cerebro al inicio del período puberal. Los eventos que pudiesen alterar el normal desarrollo del cerebro tendrían un efecto en el desempeño en las pruebas de memoria espacial. El tratamiento en ratas durante los DPN 23-29 con hidroxicina (50 mg/kg), un fármaco del grupo de las difenilpiperazinas que actúa como agente ansiolítico y analgésico, mejora el desempeño de los animales en la SAT una vez que éstos han llegados a la adultez (DPN 77) (Isseroff, 1980). Ratas sometidas a la apertura temprana del párpado (en el DPN 8) mostraron un alto desempeño en la prueba de

alternación en el laberinto en Y respecto al control desde el DPN 17 al DPN 26 (Dumas, 2004). Adicionalmente, la apertura temprana del párpado suscitó la rápida remodelación de las aferencias hacia el giro dentado y región CA1 del hipocampo, lo que apunta a una mayor maduración de las sinapsis en esta región.

La mayor alternación del grupo KTJ respecto al CTJ puede, tal vez, ser producto de una maduración temprana de las áreas corticales y subcorticales del cerebro, como la corteza prefrontal, lóbulo temporal e hipocampo. Tal proceso de maduración iniciaría anticipadamente y se detendría o alteraría durante la adolescencia del animal, produciendo el deterioro cognitivo asociado a la esquizofrenia en la adultez.

El desempeño cognitivo en los humanos y otros primates responde a una función de U inversa con los niveles de dopamina en la corteza prefrontal, de forma que existe un intervalo de actividad dopaminérgica cortical óptimo para la normal ejecución de las tareas cognitivas (Williams & Castner, 2006). En los animales de los grupos CTA y KTJ la actividad locomotora en la OFT se correlaciona positivamente con el desempeño en la prueba de alternación espontánea. Podría sugerirse que el aumento de la actividad dopaminérgica observada en el grupo juvenil expuesto a la ketamina pudiese relacionarse con el incremento de su desempeño en el laberinto. Además, la correlación negativa hallada con el grupo KTA podría indicar que la misma actividad dopaminérgica en el estadio adulto es perjudicial para el normal desempeño en el laberinto en T, siendo esto parte de las causas que llevan al déficit de memoria espacial observado.

Otro punto de interés es el mayor nivel de ansiedad apreciado en los animales del grupo KTA, medida a través del número de piezas fecales. Como ya se mencionó, la ansiedad y el estrés pueden afectar el desempeño en la SAT. La menor aptitud del grupo KTA en esta prueba puede deberse a una combinación del estrés producto de la misma en sinergia con el déficit cognitivo en estos animales. La alternación espontánea parece reducirse también con la administración de antagonistas de receptores NMDA (con la subsecuente disminución de la

actividad dopaminérgica cortical), y el aumento de la liberación de adrenalina en el hipocampo. Las drogas que actúan estimulando la liberación de dopamina (p.e. D-anfetamina) o como antagonistas de receptores dopaminérgicos (p.e. apomorfina y quinpirol) disminuyen la alternación espontánea en el laberinto en T, indicando que un nivel óptimo de neurotransmisión por dopamina es necesario para el normal desempeño de los animales en la prueba de alternación (Lalonde, 2002).

Estos resultados contradicen en parte a los obtenidos por Zhao *et al.* (2014), los cuáles sí observan un déficit apreciable en la memoria y aprendizaje (evaluados en la piscina de agua de Morris) en los animales en la SPN 4. El tratamiento utilizado consta de la administración prenatal de ketamina en el día gestacional 14 a manera de anestesia por 2 h (el tiempo de anestesia en el presente estudio fue de 3 h). Como hipótesis alternativa el mayor desempeño de los animales del grupo KTJ en la SAT pudo deberse a la desinhibición de la actividad exploratoria general en estos animales, en vez de a una maduración temprana del cerebro con el consecuente aumento de las aptitudes cognitivas.

### **8.3.3. Prueba de campo abierto (OFT)**

Como ya se ha mencionado, la actividad en el campo abierto es una medida tanto de la actividad exploratoria como de la respuesta del animal ante la novedad. El grupo KTJ mostró un incremento de la actividad locomotora en la OFT, respecto al CTJ. La hiperactividad en el campo abierto es también una respuesta al estrés, traducida en un aumento de la actividad dopaminérgica subcortical. Este comportamiento se ha asociado con los síntomas positivos de la esquizofrenia en modelos animales (van den Buuse, 2010). Luego, la actividad locomotora parece estabilizarse en el estadio adulto (no hay diferencias entre el control adulto y el control expuesto a la ketamina). Una explicación puede ser que la aparición de los primeros síntomas psicóticos suele ocurrir durante el estadio prodromático del trastorno. Posteriormente (salvo en el tipo paranoide de esquizofrenia), los síntomas positivos pasan a un segundo plano, y empieza a manifestarse y desmejorar la sintomatología negativa y cognitiva.

La actividad en la región central es una medida de cómo el estado de ansiedad del animal puede afectar la actividad exploratoria. Si bien no se encontraron diferencias entre el grupo KTJ y CTJ, el valor cercano al punto crítico ( $p = 0.056$ ) puede señalar una tendencia del grupo KTJ a pasar más tiempo en el centro del campo abierto. Los individuos juveniles expuestos al tratamiento con ketamina muestran entonces una sobreexcitación en el campo abierto, traducido tanto en el incremento de la actividad locomotora como en la toma de decisiones de riesgo (exposición al centro). Estos individuos, una vez llegados a la adultez, muestran un comportamiento de “resguardo” propio de una respuesta ansiolítica ante una situación de estrés (desencadena por un ambiente novedoso), comportamiento determinado por el menor tiempo en la región central del campo abierto respecto al control adulto.

El aseo excesivo constituye una respuesta al estrés y a la novedad (Smolinsky *et al.*, 2009). El comportamiento de aseo es de utilidad también para estudiar las conductas estereotípicas en animales (Smolinsky *et al.*, 2009; Kalueff *et al.*, 2016). Una forma de desencadenar el comportamiento de aseo como producto del estrés es la atomización del cuerpo del animal con agua (simplemente mojarlo). La administración de PCP (10 mg/kg) en ratas adultas durante 15 días consecutivos puede afectar el comportamiento de aseo. Es de recordar que la administración crónica de PCP puede producir síntomas asociados a la esquizofrenia en humanos y animales (Cohen *et al.*, 1962; Krystal *et al.*, 1994, van den Buuse, 2010). Este tratamiento con PCP aumentó el tiempo usado en aseo en los animales, luego de ser rociados previamente con agua para inducir el comportamiento artificialmente (la acción de mojar a los animales tiene un efecto ansiogénico). Asimismo, reportan un mayor número de transiciones interrumpidas en el grupo expuesto a la PCP (Audet *et al.*, 2006). Estos cambios pueden relacionarse con el incremento de la ansiedad producida por un evento estresante, y a la desorganización del comportamiento de aseo como una forma de estereotipia en los animales.

Los animales adultos expuestos a la ketamina muestran un incremento del tiempo usado en aseo respecto al control, lo cual no se observa en el estadio juvenil. El número de transiciones incorrectas se ve incrementado tanto en los juveniles como en los adultos

sometidos al tratamiento. A su vez, la actividad locomotora se correlaciona positivamente con el tiempo usado en aseo en el grupo KTA. Esto pudiera ser contradictorio, ya que mientras mayor tiempo dedique el animal a la locomoción, menos tiempo debería invertir en detenerse para acicalarse. Sin embargo, una alta locomoción puede traducirse también en mayores índices de estrés que desencadenen el comportamiento de aseo. Así, el tratamiento puede llevar a la manifestación de estereotipias en los animales juveniles y adultos, mientras que el aumento del aseo como respuesta al estrés solo se presenta en este último estadio. Es de importancia aludir que hasta los momentos el papel del comportamiento de aseo en la esquizofrenia ha sido poco estudiado (Audet *et al.*, 2006; Kalueff *et al.*, 2016), y la interpretación más adecuada es que su alteración respecto al patrón normal es producto del estrés y de agentes ansiogénicos.

Respecto a los levantamientos, estos pueden asociarse fuertemente con la actividad locomotora en el campo abierto. El grupo KTA mostró los niveles de escalamiento más elevados. El grupo KTJ mostró niveles similares al CTA, niveles mayores además a los del grupo CTJ. Además, en todos los grupos se halló una correspondencia positiva entre la actividad locomotora y el escalamiento. Esta correlación es reportada igualmente por Thiel *et al.* (1999). Estos también hallan niveles de dopamina más altos en el cuerpo estriado ventral, en conjunto con niveles más bajos de serotonina en la corteza frontal medial en las ratas con alta predisposición al levantamiento. En otro estudio, la administración sub-crónica de PCP en ratas (5 mg/kg, 2 veces al día durante 7 días) reduce la interacción social, provoca déficits en la memoria espacial, incrementa la actividad locomotora y el número de levantamientos (Seillier & Giuffrida, 2009). El escalamiento y, en líneas generales, el *rearing behavior* constituyen así medidas de la hiperactividad asociada al trastorno esquizofrénico en animales.

Respecto a la actividad vertical (levantamientos sin apoyo) solo en el grupo KTA se registraron mayor número de observaciones que en los controles. Esto podría estar relacionado igualmente con un aumento de la actividad como reacción a lo novedoso (exposición al campo abierto). Esta variable se ha relacionado con la exploración y memoria espacial (Lever *et al.*,

2006), pero el poco tiempo de la prueba hace inadecuado establecer un vínculo entre la actividad vertical y la memoria.

En líneas generales, el tratamiento con ketamina produce desinhibición, hiperactividad y aumento de la actividad exploratoria en el estadio juvenil. Llegados los animales a adultos, se presenta una respuesta ansiogénica ligada al estrés de la prueba, con una hiperactividad asociada no a la actividad locomotora sino más bien al escalamiento y actividad vertical.

#### **8.3.4. Prueba de interacción social (SIT)**

El síntoma negativo del retraimiento social (traducido como la indiferencia o la falta de interés del individuo en establecer contacto social con sus congéneres) constituye parte de los síntomas de la esquizofrenia, contribuyendo significativamente al empobrecimiento del funcionamiento psicosocial (Wilson & Koenig, 2014). Diversas alteraciones durante el neurodesarrollo pueden afectar el desenvolvimiento del individuo con sus homólogos.

La lesión excitotóxica del hipocampo se ha propuesto como un modelo de esquizofrenia de relevancia en el estudio de los síntomas positivos y negativos del trastorno (Lipska & Weinberger, 2000; Jones *et al.*, 2011). La lesión del hipocampo ventral y dorsolateral en ratas en el DPN 7 produce un aumento del comportamiento agresivo, una disminución del comportamiento no agresivo y del tiempo total utilizado en la interacción social en ratas adultas (SPN 13). Además, el efecto de la lesión del hipocampo en la SPN 8 no produce efecto alguno en la interacción social (Becker *et al.*, 1999). La lesión es eficiente entonces durante estadios tempranos de la vida del animal, momento en el cual la maduración del sistema nervioso se encuentra en un período de alta susceptibilidad.

El aislamiento luego del destete y el aislamiento materno pueden producir igualmente alteraciones durante el desarrollo. Asimismo, estos modelos causan estrés en etapas tempranas del desarrollo neuronal. El aislamiento materno en ratas, en el estadio neonatal, puede producir

un aumento de los niveles de ansiedad, aumento del comportamiento agresivo y disminución de la interacción social en ratas adultas (Boccia & Pedersen, 2001).

Las alteraciones observadas en la interacción social en la esquizofrenia tienen sus raíces en el neurodesarrollo perturbado propio del trastorno, ya sea en etapas tempranas (estadios prenatal y neonatal) o tardías (prepuberal y puberal) del desarrollo ontogenético (Wilson & Koenig, 2014).

Una disminución del número total de eventos amistosos solo se observa en el grupo KTA con el resto. Los grupos KTA y KTJ muestran mayor agresividad en comparación con los controles. Aunque no se hayan encontrado diferencias significativas, la inspección gráfica muestra cierta tendencia a la mayor agresividad del grupo KTJ en comparación con el CTA (2.4 vs 1.1 eventos agresivos para los grupos KTJ y CTA, respectivamente). El retraimiento social, como síntoma negativo del trastorno, parece manifestarse solo en los individuos adultos sometidos al tratamiento con ketamina. La agresividad se expresa desde el estadio juvenil y pareciese empeorar en la adultez (casi el doble de eventos agresivos respecto al juvenil). Cabe mencionar que la agresividad no es un síntoma propio del trastorno esquizofrénico en humanos. Episodios de agresividad pueden ser consecuencia de los delirios y alucinaciones propios del trastorno (van Os & Kapur, 2009; Konopaske & Coyle, 2015). Empero no quiere decir que no se haya reportado esta variable en algunos de los modelos animales de esquizofrenia propuestos hasta el momento (Jones *et al.*, 2011; Wilson & Koenig, 2014).

Diversos sistemas de neurotransmisores parecen estar implicados en la mediación del comportamiento social. La administración de agonistas GABAérgicos incrementa la interacción social (Wilson & Koenig, 2014). Algunos de estos agonistas, como las benzodipinas, tienen un efecto ansiolítico asociado. Por ende, no es de extrañar que la amígdala, una estructura muy vinculada a la respuesta al estrés, se haya asociado con los trastornos relacionados con el normal desenvolvimiento social. La modulación serotoninérgica y GABAérgica de la amígdala puede aminorar los niveles de estrés y ansiedad en la SIT; un efecto contrario se observa con la

depleción de serotonina en esta estructura (File, 1981). Lesiones producidas en el hipocampo, corteza prefrontal y cerebelo causan también una disminución de la interacción social (Becker *et al.*, 1999; Wilson & Koenig, 2014). En la corteza prefrontal, la disminución de la actividad dopaminérgica por la inyección de 6-hidroxidopamina reduce significativamente el comportamiento social en ratas, con efectos más marcados en las ratas adolescentes que en las adultas (Fernandez-Espejo, 2003).

El papel que juega la noradrenalina en la prueba de interacción social es menos preciso que el papel que desempeñan la serotonina, la dopamina y el GABA. Lesiones con 6-hidroxidopamina en el locus cerúleo, una región con proyecciones noradrenérgicas hacia el cerebelo y el neocórtex, no tiene efecto alguno sobre la interacción social, ni en la respuesta a la administración de ACTH (File *et al.*, 1979). En contraste, altos niveles de noradrenalina se han cuantificados en el plasma de pacientes con desorden de ansiedad social. La información inconsistente sobre el efecto de los agonistas y antagonistas de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y  $\beta$ -adrenérgicos deja poco claro el papel de la noradrenalina en la interacción social, siendo probable que este neurotransmisor sea responsable de la sobreexcitación observada en los trastornos de ansiedad social, más que en el retraimiento social característico de estos (Marazziti *et al.*, 2015).

En la agresión, se ha estudiado el efecto de la modulación de los sistemas de neurotransmisión sobre este comportamiento. En líneas generales, bajos niveles de serotonina se han asociado con altos niveles de impulsividad y agresividad. El mismo efecto se observa con las manipulaciones que disminuyen la señalización mediada por receptores 5-HT, en especial vía receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Nelson & Trainor, 2007). Respecto a la noradrenalina, la contribución de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  con la agresividad difiere sustancialmente. El propranolol, un agente que bloquea los receptores  $\beta$ -adrenérgicos postsinápticos, disminuye la agresividad en animales y en humanos. Los antagonistas y agonistas de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos pueden o aumentar el comportamiento agresivo o disminuirlo (Nelson & Trainor, 2007). En ratones *knockout* para la dopamina  $\beta$ -hidroxilasa (enzima que convierte la dopamina en

noradrenalina), se ha reportado una disminución de la agresividad, déficits en la memoria social, y respuesta normal al estrés y ansiedad (Marino *et al.*, 2005). Niveles de dopamina y GABA óptimos son necesarios para la normal modulación del comportamiento agresivo (a manera de función de U inversa) (Nelson & Trainor, 2007).

Con lo ya expuesto, puede sugerirse que la agresividad apreciada en los animales expuestos al tratamiento podría responder a las alteraciones de las distintas vías de neurotransmisión. El desarrollo de la agresividad inicial podría corresponder con el aumento de la actividad dopaminérgica subcortical, con la disminución de la actividad serotoninérgica y con el pico de actividad noradrenérgica observado en tal estadio. Los síntomas asociados al retraimiento social, propios del trastorno esquizofrénico, parecen manifestarse solo en la etapa adulta. Un aspecto de interés es que, en este trastorno, el aislamiento social suele aparecer en la etapa prodrómica previa al desarrollo de los primeros síntomas psicóticos (Wilson & Koenig, 2014). En los animales experimentales, aunque la agresividad se presenta en el estadio juvenil producto del tratamiento, la disminución del interés por el contacto social solo aparece en el estadio adulto del animal. El tratamiento con ketamina parece afectar entonces la naturaleza de las interacciones en el estadio juvenil, más que el tiempo dedicado en la interacción social.

### **8.3.5. Prueba de nado forzado (FST)**

La depresión y anhedonia conciernen a los síntomas negativos y afectivos de la esquizofrenia. La administración crónica de ketamina, tanto en el estadio perinatal como en el puberal y el adulto, puede llevar al desarrollo de síntomas negativos de la esquizofrenia. El tratamiento con sub-crónico con PCP (10 mg/kg) durante 14 días en ratones produce una marcada inmovilización en la FST, un indicativo de depresión (disminución de la respuesta al estrés), incluso 24 días después de finalizado el tratamiento con PCP (Noda *et al.*, 2011).

Los efectos neurotóxicos de la ketamina en el estadio prenatal pudiesen tener consecuencias más graves que en otros estadios del desarrollo. La administración sub-crónica

de PCP (5 mg/kg) durante los días embrionarios 6 a 18, produce inmovilización en los animales en la FST, entre otros cambios conductuales relacionados con la esquizofrenia. Reportan además alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica y menor peso de las crías al nacer. La anestesia con ketamina por 2 h (60 mg/kg/h) en el día gestacional 14, puede producir igualmente un aumento de la inmovilización en la FST en ratas en la SPN4, además de otras alteraciones en el comportamiento y alteraciones a nivel celular (Zhao *et al.*, 2014).

A diferencia del estudio de Zhao *et al.* (2014), la inmovilización en la FST producto del tratamiento con ketamina solo se observa en el estadio adulto del animal, y no en el juvenil. Las diferencias pueden deberse tanto a la duración del tratamiento con ketamina, como al tipo de prueba utilizada (nado forzado clásico vs versión modificada). En la versión clásica, el comportamiento de escalado puede pasar desapercibido e incluso confundirse con el nado. Una mayor actividad de escalado es producto del aumento de la columna de agua a 30 cm. Los animales de los grupos CTJ y KTJ no muestran diferencias en cuanto a la inmovilización en la FST, más sí con el patrón de nado y escalado. El grupo KTA presenta un aumento de la inmovilización respecto al CTA, aumento atribuido a la reducción del comportamiento de nado exclusivamente. Como ya se discutió en la subsección 8.2.1, estos cambios podrían sugerir una disminución de la neurotransmisión por serotonina en las ratas sometidas al tratamiento con ketamina, y un pico de actividad noradrenérgica solo en los juveniles expuestos al tratamiento. Igualmente, la correlación entre la actividad locomotora y la actividad de escalado pudiera aludir a la sincronización del aumento de la actividad dopaminérgica subcortical con el aumento de la neurotransmisión noradrenérgica, pero esto solo constituye una suposición.

Pasando a otro plano, ¿la inmovilización del grupo KTA respecto al control es causa de una hipofunción serotoninérgica? No es fácil establecer este planteamiento. Primero, la actividad de nado es solo una medida indirecta de la neurotransmisión por serotonina. Segundo, los síntomas negativos en la esquizofrenia pueden ser modulados tanto por la acción de fármacos antagonistas de receptores 5-HT<sub>2A</sub> como por la acción de agonistas de receptores 5-HT<sub>1A</sub> (Hensler *et al.*, 2013). Se necesitan estudios posteriores para verificar cómo podría estar

afectada la neurotransmisión serotoninérgica en los animales expuestos al tratamiento prenatal con ketamina, estudios dónde sí se cuantifiquen los niveles de neurotransmisores directamente o el nivel de expresión de los distintos receptores asociados a estos.

#### 8.4. Patrón de comportamiento general

Primeramente, es conveniente resumir los cambios en el comportamiento descritos en las secciones anteriores. En la Tabla 5 se resumen las observaciones realizadas en los cuatro grupos experimentales. En la Tabla 6 se compara el fenotipo producido en los animales con su equivalencia clínica en humanos.

**Tabla 5.** Resumen de los resultados de las pruebas de comportamiento. Los signos indican el resultado en términos relativos.

Prueba	Variable	CTJ	KTJ	CTA	KTA
Alternación espontánea	Alternación	≈ 50%	> 50%	>> 50%	≈ 50%
	Defecación	+	+	+	+++
Campo abierto	Actividad locomotora	+	++	+++	+++
	Escalamiento	+	++	++	+++
	Actividad vertical	+	+	+	+++
	Actividad en la región central	+	++	+++	++
	Tiempo invertido en aseo	++	++	+	++
	% Transiciones incorrectas	+	+++	+	+++
Interacción social	Comportamiento amistoso	+++	+++	+++	+
	Agresividad	0	+	0	++
Nado forzado	Inmovilización	+	+	++	+++
	Nado	++	+	++	+
	Escalado	++	+++	++	++

El tratamiento prenatal con ketamina puede producir cambios en el comportamiento de los animales, similares a los apreciados en pacientes esquizofrénicos. Además, los cambios

muestran una relación con la edad del animal. Los síntomas no tienen una naturaleza estática, sino que cambian y evolucionan con la ontogenia del individuo. Un resultado interesante del presente estudio son las alteraciones disímiles del comportamiento entre juveniles y adultos. Si el comportamiento normal en los estadios puberal y adulto difiere sustancialmente ¿por qué no debería hacerlo también el comportamiento asociado al fenotipo esquizofrénico?

**Tabla 6.** Síntomas clínicos de la esquizofrenia y su correspondencia con los cambios en el comportamiento de los animales sometidos al tratamiento prenatal con ketamina

Síntomas clínicos	Fenotipo animal
Positivos	Hiperlocomoción (juveniles) como respuesta al estrés (novedad)
	Estereotipia (aumento del porcentaje de transiciones de aseo incorrectas)
	Agitación (mayor escalamiento)
Negativos	Disminución de la interacción social
	Depresión
Cognitivos	Déficit de memoria espacial (disminución de la alternación espontánea)
Otros síntomas	Agresividad
	Ansiedad

La prueba de PERMANOVA indica que todos los grupos pueden separarse en base al conjunto total de variables que los describen. Es decir, puede asociarse un fenotipo definido a cada grupo en cuestión. Las variables evaluadas de forma global pueden discernir entre juveniles y adultos, con o sin manifestación de comportamientos del tipo esquizofrénico. En contraste, el análisis gráfico por el NMDS muestra que el grupo KTJ no se separa completamente del resto. Se pueden realizar algunas conjeturas del análisis realizado:

**a)** Respecto al control, los juveniles y adultos se separan completamente en el espacio de coordenadas. La separación se da principalmente en la coordenada 2: un conjunto de variables

define la delimitación de los estadios juvenil y adulto, mientras que algunas características (p.e. el comportamiento social) parecen mantenerse. Ciertas particularidades se conservan poco alteradas en los animales del grupo control, consecuencia de la poca separación de los grupos CTJ y CTA en el coordenada 1.

**b)** El grupo KTA se separa de los controles juvenil y adulto, con una leve superposición con estos grupos. La separación se da principalmente en la coordenada 1. Aparte de, el centroide del grupo KTA muestra una posición intermedia en la coordenada 2 entre los centroides de los grupos CTJ y CTA. Los individuos del grupo KTA parecen diferenciarse por características propias asociadas al fenotipo esquizofrénico (coordenada 1) y mantienen algunas características intermedias entre el estadio juvenil y el adulto (coordenada 2). Por ejemplo, podrían tener un nivel de actividad exploratoria mayor a los del grupo CTJ, pero menor al del grupo CTA. Esto pudiera apuntar a una maduración incompleta del fenotipo asociado al estadio adulto en los animales del grupo KTA, siendo causa además de los diferentes déficits de comportamiento descritos. En humanos, esto puede traducirse en una maduración incompleta de la personalidad adulta en el paciente.

**c)** El grupo KTJ se superpone marcadamente con todos los grupos. Esto parece contradecir al análisis de la prueba de PERMANOVA. Se harán algunas figuraciones del porqué de los resultados obtenidos. Primero, la superposición observada entre los grupos KTA y KTJ con los controles puede responder a la alta variabilidad propia de las pruebas de comportamiento en animales. No es de extrañar que la manifestación del comportamiento, un fenómeno neurobiológico complejo y altamente susceptible a un número cuantioso de variables, presente una mayor varianza que parámetros fisiológicos del organismo o que medidas morfológicas, por colocar un ejemplo. Segundo, los síntomas pueden presentarse de forma desincronizada en el estadio juvenil del animal. Inclusive, podría pensarse que en algunos animales pudieron manifestarse solo en etapas posteriores. Por último, la superposición apreciada podría señalar que el grupo KTJ constituye una combinación de los tres grupos restantes: mantiene características normales propias del estadio juvenil (CTJ), características

propias de un desarrollo temprano y acelerado que llevan a un fenotipo similar al del individuo adulto (CTA), y características relacionadas con el trastorno esquizofrénico en sí (KTA).

**d)** El área que abarcan los polígonos de los grupos KTJ y KTA es ligeramente mayor a los polígonos de los controles. La variabilidad en la manifestación de los síntomas puede contribuir a “extender” el patrón de comportamiento asociado al fenotipo esquizofrénico, con el consecuente aumento del tamaño de los polígonos.

**e)** La superposición observada y el grado de separación no tan marcado, entre los grupos sometidos al tratamiento y el control, hace hincapié en la sutileza de los cambios del comportamiento observados para discernir entre los grupos: es necesaria la recopilación de toda la información posible para dar con un posible patrón conductual asociado a la esquizofrenia y otros trastornos psicóticos.

En base a lo expuesto, puede asegurarse que el tratamiento prenatal con ketamina puede generar un fenotipo del tipo esquizofrénico en los animales, una vez llegados estos al estadio adulto. En el estadio juvenil, las alteraciones del comportamiento pudiesen estar menos direccionadas a la convergencia de un fenotipo específico, y consecuentemente el patrón conductual generado en este estadio se solaparía o incluso confundiría con el patrón de otros trastornos neuropsiquiátricos. En relación a esta idea, los síntomas psicóticos en la niñez se han usado como un fenotipo subclínico de la esquizofrenia, y como dianas en la intervención preventiva destinada a aminorar la sintomatología del trastorno. No obstante, no son del todo específicos para el diagnóstico de la esquizofrenia en la adultez, y constituirían más bien un indicativo de los problemas futuros del individuo en lo que respecta a su salud mental (Fisher *et al.*, 2013). A pesar de esto, los síntomas prodrómicos siguen siendo una útil herramienta para el diagnóstico temprano del trastorno: el 22% de los pacientes con un alto riesgo de desarrollar esquizofrenia desarrollan síntomas psicóticos marcados en el primer año posterior al diagnóstico, y un 36% en los tres años subsiguientes al mismo (Fusar-Poli *et al.*, 2012). Entonces, un análisis completo de la conducta del individuo es necesario para aumentar la

precisión del criterio utilizado para el diagnóstico de la esquizofrenia y de otros trastornos psicóticos relacionados.

## **8.5. Efecto del tratamiento con ketamina en la formación del hipocampo**

### **8.5.1. Mecanismo de la neurotoxicidad de la ketamina**

Si bien los efectos de la ketamina sobre el neurodesarrollo se exponen ampliamente en la sección 5.6, se presenta una breve descripción del mecanismo neurotóxico de la ketamina durante el desarrollo. La mayoría de los estudios clínicos enfocados en los efectos a nivel celular y molecular de la administración prenatal de ketamina se orientan en su uso como agente anestésico, y no como droga recreacional. Sin embargo, las dosis utilizadas en ambos casos son similares. La administración de antagonistas de receptores NMDA, tipo ketamina, resulta en un incremento en la expresión de estos receptores a manera de efecto compensatorio, lo que lleva a una sobre estimulación del sistema glutamatérgico por los niveles de glutamato endógenos. Esto produce un exceso de influjo de  $\text{Ca}^{+2}$  al interior de las neuronas, lo que lleva a la producción de radicales libres, especialmente superóxidos, perjudiciales para la integridad celular (Shi *et al.*, 2010).

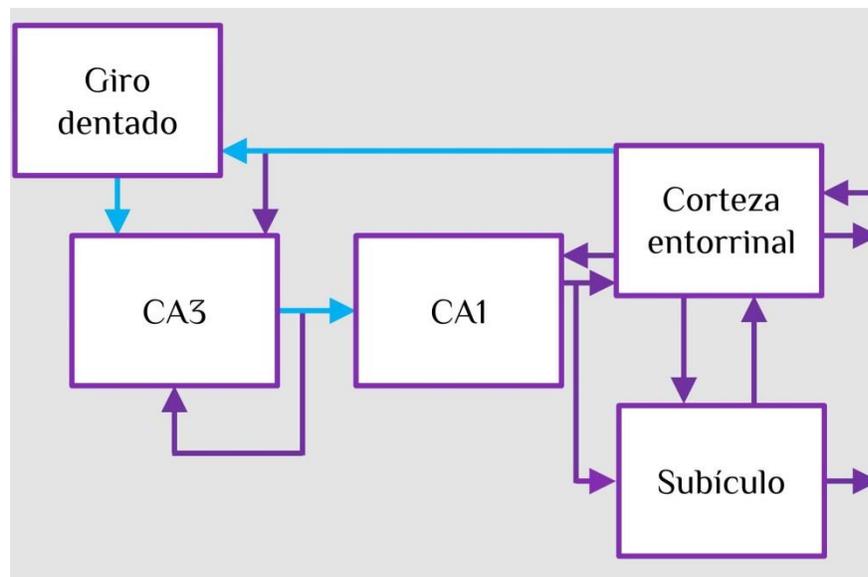
La disrupción del neurodesarrollo por la ketamina lleva a la sobreexpresión de algunos genes de las subunidades de los receptores NMDA, incluyendo el gen *Grin1* (NR1), *Grin2a* (NR2A) y *Grin2c* (NR2C). De esta forma la ketamina causa la sobreexpresión compensatoria de los receptores NMDA, lo que lleva a la sobre estimulación del sistema glutamatérgico, con la consiguiente apoptosis de las neuronas en desarrollo (Shi *et al.*, 2010).

### **8.5.2. Hipocampo: estructura y función**

El hipocampo es una estructura ubicada en la región ventromedial del lóbulo temporal que ocupa menos del 1% del volumen total del cerebro. Limita con la parte anterior de la

amígdala, está cubierto a nivel medio por el giro parahipocampal, y se extiende posteriormente al núcleo pulvinar del tálamo. Perpendicular el eje anterior-posterior, el hipocampo puede dividirse en cuatro subregiones: los sectores CA1-4 (*cornu ammonis* sectores 1-4) y el giro dentado (Heckers & Konradi, 2010).

El hipocampo juega un papel importante en el procesamiento de la información. La información sensorial es retransmitida desde las regiones corticales sensoriales primarias hacia las regiones corticales multimodales de la corteza prefrontal, parietal, lateral y temporal. Estas áreas corticales proyectan a la corteza entorrinal, una región del giro parahipocampal. La corteza entorrinal envía la información multimodal sensorial al hipocampo por dos vías de entrada (Fig. 26): la ruta directa (proyección directa a los sectores CA1 y CA3), y la ruta indirecta (giro dentado → CA3 → CA1) (Witter *et al.*, 2000). Luego de procesar la información sensorial, el hipocampo envía la información de vuelta a la corteza sensorial a través del subículo.



**Figura 26.** Conectividad dentro del hipocampo. La conectividad está caracterizada por la vía directa excitatoria desde la corteza entorrinal hasta el giro dentado y de allí a las regiones CA3 y CA1. Esta vía es llamada ruta trisináptica (flechas azules). Adicionalmente, la corteza entorrinal proyecta a las regiones CA3 y CA1 directa e independientemente. La región CA3 tiene una rica red colateral recurrente que conecta fuertemente las neuronas piramidales de la región CA3 unas con otras, y se cree que participan en las funciones asociadas a la memoria en el hipocampo. Tomada de Tamminga *et al.* (2010).

Tanto las rutas directa e indirecta convergen en neuronas piramidales del sector CA1. Estas neuronas integran la nueva información sensorial (que llega desde la ruta directa) con la información sensorial previamente experimentada (recuperada desde las regiones corticales por la vía indirecta). Si las dos señales coinciden, la región CA1 manda una señal de “correspondencia” (*match signal*) a la corteza cerebral, a las estructuras límbicas y al tronco cerebral. La detección de la novedad está seguida por la evaluación de la relevancia de la nueva información sensorial, a través de un circuito neuronal que incluye el hipocampo, el área tegmental ventral, y el núcleo *accumbens* (Lisman & Grace, 2005).

A nivel celular, en el hipocampo humano existen aproximadamente 10 millones de neuronas. La gran mayoría son neuronas largas, con forma de pirámide y principalmente glutamatérgicas (llamadas neuronas piramidales, por su forma), y el otro 10% lo constituyen interneuronas GABAérgicas más pequeñas, no piramidales (Olbrich & Braak, 1985). Las sinapsis excitatorias en el hipocampo son producto de la actividad de las neuronas piramidales.

### **8.5.3. Alteración de la funcionalidad del hipocampo**

El papel del hipocampo en la esquizofrenia se hace notar con el modelo de la lesión del hipocampo ventral en neonatos, el cual ha podido producir muchos de los síntomas asociados al trastorno: aumento de la actividad locomotora como respuesta al estrés, a la administración de anfetamina y de antagonistas de receptores NMDA; comportamiento estereotipado producido por la morfina; discapacidad sensomotora en la PPI; retraimiento social y agresividad; y déficits en la memoria espacial (Jones *et al.*, 2011).

El tratamiento con ketamina no produjo un cambio en la densidad neuronal en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo. No obstante, la región CA3 vio disminuida el grosor de la capa de células piramidales. Esto sugiere que esta región pudiese ser más susceptible al tratamiento con ketamina que la región CA1. Además, a nivel morfo celular los cambios se

traducen en una disminución del número de neuronas en la capa que no reflejan una disminución de la densidad celular en la misma.

En pacientes esquizofrénicos, se ha reportado una reducción de la densidad celular y número total de neuronas en las regiones CA1/CA2, CA3 y CA4 del hipocampo (Falkail & Bogerts, 1986). Asimismo, reportan una disminución del volumen total del hipocampo. El tratamiento prenatal en ratas con ketamina utilizado por Zhao *et al.* (2014), correspondiente a la administración de ketamina como anestesia por 2 h, produce una disminución de la densidad celular en la región CA3 del hipocampo, más no en la región CA1, disminución vislumbrada tanto en el DPN 0 como en el DPN 30. El mismo tratamiento lleva a una reducción de la densidad celular en las láminas II-III de la corteza prefrontal (Zhao *et al.*, 2016). Esto puede apuntar que las alteraciones en el hipocampo (producto de la intervención farmacológica con antagonistas de receptores NMDA) se producen durante etapas tempranas del neurodesarrollo, para manifestarse posteriormente en los síntomas asociados a la esquizofrenia.

Es lógico pensar que una disminución del número total de neuronas, sin un aumento aparente de la densidad, puede llevar a una reducción del volumen del hipocampo. Se ha reportado una disminución de este volumen en pacientes esquizofrénicos, en comparación con sujetos sanos. Esta reducción es un hecho robusto, apoyado por estudios de neuroimagen y confirmado por varios meta-análisis (Steen *et al.*, 2006).

Algunos estudios sugieren que la reducción de neuronas en el hipocampo no es tan marcada ni constituye un factor fundamental para la manifestación de los síntomas de la esquizofrenia, en comparación con otras enfermedades como el Alzheimer y la epilepsia (Heckers & Konradi, 2010). Las alteraciones del hipocampo pueden responder tanto a la disminución del número total de neuronas piramidales como a la pérdida de la conectividad sináptica entre neuronas, y a cambios en la expresión de receptores de membrana (y de sus consecuencias sobre los patrones de excitación e inhibición en el hipocampo).

Las alteraciones del hipocampo en la esquizofrenia no llamaron la atención de los investigadores hasta llegados los años 1990. Algunas de las hipótesis planteadas sobre la relación del hipocampo con la esquizofrenia comprenden (Heckers & Konradi, 2010):

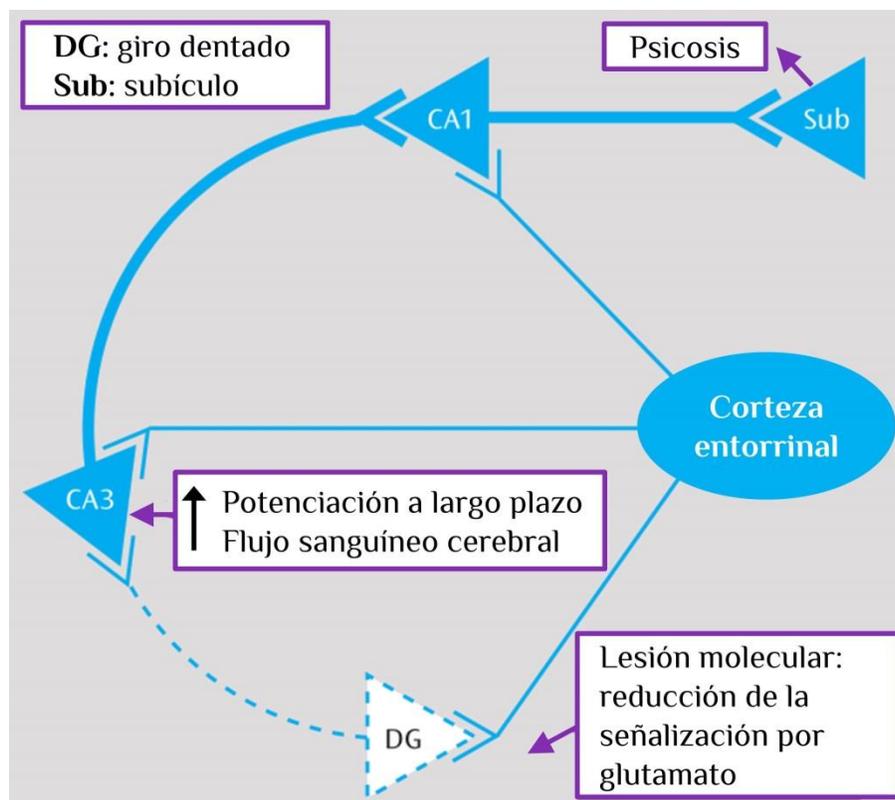
- a)** Las alteraciones del hipocampo son la causa principal de la psicosis.
- b)** Las alteraciones del hipocampo llevan al desarrollo de los déficits cognitivos en la esquizofrenia.
- c)** La desconexión del hipocampo de las asociaciones multimodales corticales lleva al desarrollo de la esquizofrenia.
- d)** La disfunción de la neurotransmisión glutamatérgica (principalmente vía receptores NMDA) en el hipocampo lleva al desarrollo de los síntomas psicóticos de la esquizofrenia.
- e)** Una insuficiente inhibición por las interneuronas GABAérgicas a las neuronas del hipocampo lleva al desarrollo de la esquizofrenia.

En relación a estas dos últimas hipótesis, Tamminga *et al.* (2010) proponen una posible explicación. Pero primero, se definirán dos procesos de suma importancia para el correcto funcionamiento de las funciones cognitivas, procesos concernientes al hipocampo (Leutgeb & Leutgeb, 2007):

- a)** Terminación de patrones (PC, *patter completion*): habilidad para recuperar un recuerdo a partir de una pista sensorial parcial o degradada.
- b)** Separación de patrones (PS, *patter separation*): habilidad de diferenciar un recuerdo o experiencia de otros recuerdos previamente almacenados.

La hipótesis propuesta por Tamminga *et al.* comprende una reducción de la excitación glutamatérgica de la región CA3 por las proyecciones que parten del giro dentado, generando los siguientes dos inconvenientes (Fig. 27): 1) un cambio en los procesos de plasticidad homeostática en la región CA3, acompañado de un incremento de la actividad en esta región por la falta de estimulación proveniente de las aferencias glutamatérgicas del giro dentado.

Esto lleva al incremento de las funciones relacionadas con la PC en la región CA3. 2) la pérdida de las funciones nemotécnicas en el giro dentado, funciones relacionadas con la PS, un cambio que puede llevar al aumento de la prevalencia de falsos recuerdos, lo que reduce la discriminación entre las experiencias presentes y pasadas en la memoria. Como resultado, se incrementa la evocación de recuerdos (incremento de la PC) previamente almacenados, producto de la sobreactividad de la región CA3. Seguidamente, estos recuerdos son interpretados de forma aberrada por un proceso de PS alterado. En consecuencia, se producen “errores” cognitivos que llevan a la interpretación ilusoria y psicótica de la realidad, resultando además en las alteraciones en la memoria declarativa propias de los síntomas cognitivos de la esquizofrenia. Se propone que una hipofunción glutamatérgica en el lóbulo temporal medial puede explicar la disminución de la actividad excitatoria del giro dentado.



**Figura 27.** Simplificación del circuito del hipocampo en la esquizofrenia. La reducción de la transmisión glutamatérgica en el giro dentado es la causa de la reducción de la función de separación de patrones en la esquizofrenia. Además, genera un incremento de la potenciación a largo plazo en la región CA3 con un aumento de la función de terminación de patrones, con la subsecuente producción de pensamientos psicóticos y problemas cognitivos asociados. Tomada de Tamminga *et al.* (2010).

El aumento de la actividad de la región CA3 puede explicarse por el proceso de potenciación a largo plazo. La excitación de los receptores NMDA de las neuronas de la región CA3 lleva al incremento de los niveles de  $CA^{+2}$  intracelular en las mismas, produciendo los fenómenos de señalización celular que llevan al fortalecimiento de la sinapsis. Estos eventos incluyen el aumento de los niveles de moléculas postsinápticas como la proteincinasa II dependiente de calcio/calmodulina, cinasas MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), y de otras proteínas asociadas como la PDS-95 y la SAP-102 (Citri & Malenka, 2008). En la membrana postsináptica, los eventos de señalización aumentan a su vez la densidad de receptores AMPA y aumentan la proporción de la relación NR2B/NR2A de las subunidades de los receptores NMDA (Hayashi *et al.*, 2009). El mantenimiento de la potenciación a largo plazo viene acompañado además del incremento del número de nuevas espinas dendríticas, y de la longitud de las mismas (Peng *et al.*, 2009). El modelo propuesto por Tamminga *et al.* predice también alteraciones en el giro dentado, como una disminución postsináptica de la subunidad NR1 del receptor NMDA, aumento de la receptación de glutamato por los astrocitos, disminución de la probabilidad de liberación de glutamato presináptica, y reducción de la densidad de las células granulares del giro dentado.

¿Cómo puede producirse este efecto de potenciación a largo plazo en la región CA3, si precisamente disminuye la actividad excitatoria glutamatérgica proveniente del giro dentado? Tamminga *et al.*, señalan que esta disminución de la actividad genera justamente un efecto compensatorio sobre las neuronas piramidales de la región CA3: el umbral de excitación de las neuronas en esta región disminuye, con la consecuente generación de potenciales evocados ante estímulos poco significativos. Esta reducción del umbral fomenta además la excitación vía receptores NMDA, incrementándose así los procesos de señalización que llevan al fortalecimiento de las sinapsis (potenciación a largo plazo). Como las neuronas de la región CA3 se comunican unas con otras en un circuito colateral recurrente (véase Fig 26), una posible hipótesis del efecto de la reducción del número total de neuronas en la región CA3 en la esquizofrenia pudiera comprender: la reducción de las neuronas en la región CA3 disminuye la estimulación excitatoria en esta región a través del circuito de neuronas interconectadas en

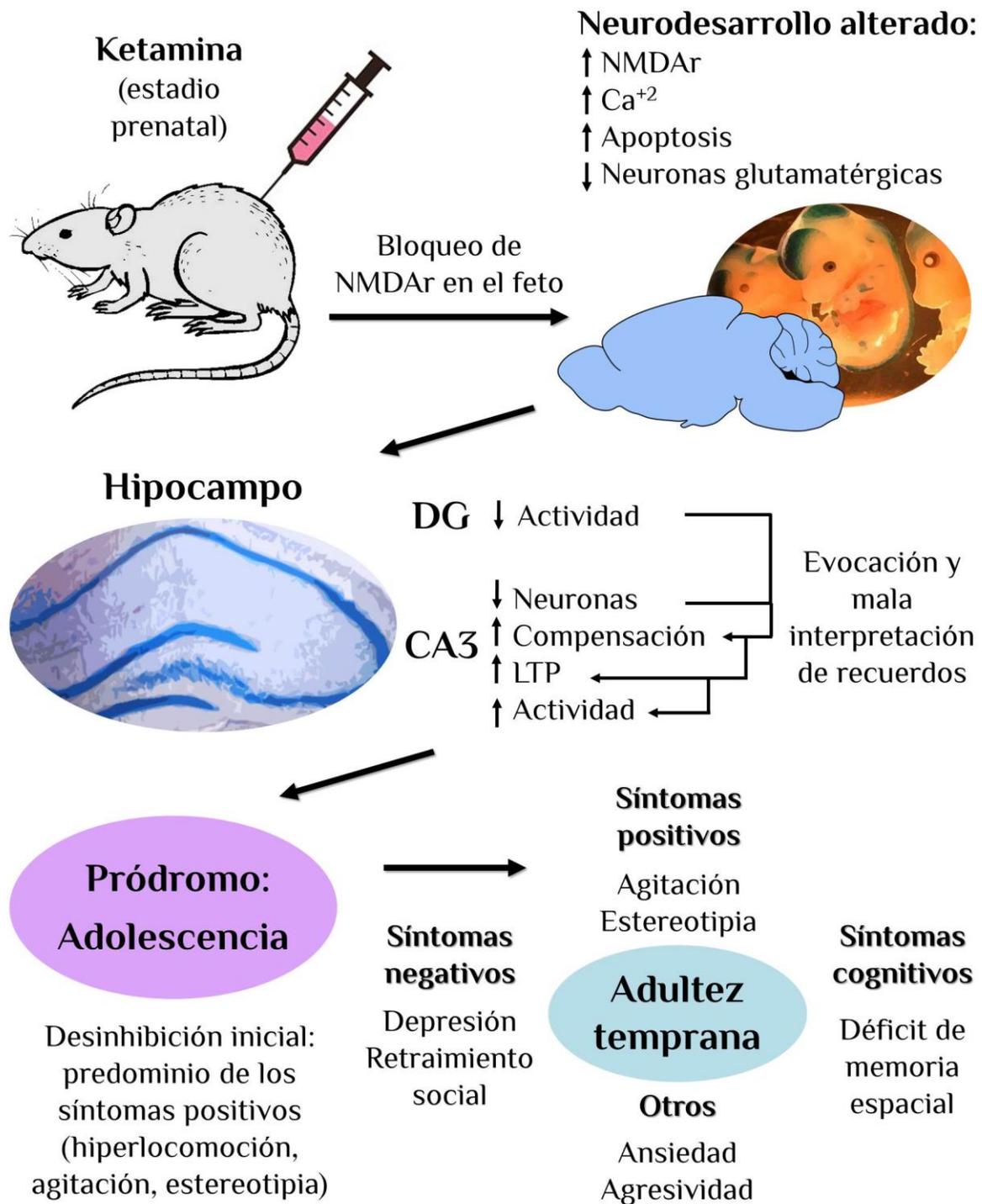
la misma, produciendo un efecto compensatorio, una reducción del umbral de estimulación y el posterior incremento de la potenciación a largo plazo. Además, esto podría estar coligado a la reducción de la actividad glutamatérgica del giro dentado a la región CA3. La hipótesis de Tamminga *et al.*, puede apoyarse en los estudios de Li *et al.* (2015), donde se reporta un incremento de la actividad neuronal en la región CA3 del hipocampo, asociado al aumento de la conectividad sináptica en esta región: incremento de la expresión de la subunidad NR2B y aumento de la densidad de espinas dendríticas. No observan cambios en la región CA1.

Otra posible hipótesis pudiera ser que la reducción del número de neuronas en la región CA3 disminuya la actividad excitatoria hacia la región CA1, produciendo un déficit en la función de PC en el organismo: eso sería causa de los problemas cognitivos relacionados con la recuperación de información. La hipofunción glutamatérgica en el lóbulo temporal medial disminuiría la actividad excitatoria del giro dentado, con el subsecuente decremento de la función de PS. Esta última hipótesis puede apoyarse en el estudio de Zhao *et al.* (2014), quienes reportan reducción del número de espinas dendríticas, de la longitud de las espinas y de las arborizaciones en la región CA3. Asimismo, señalan en el hipocampo un incremento de la expresión de la subunidad NR2A, una reducción de la expresión de la NR2B, niveles inalterados de la expresión de la NR1 del receptor NMDA, y disminución de la neurogénesis en el giro dentado. Estos datos sugieren una pérdida de la conectividad sináptica en esta estructura, con las alteraciones del comportamiento y neurobiológicas coligadas.

En conformidad con lo expuesto, se sugiere que la administración prenatal de ketamina tiene un efecto neurotóxico sobre el sistema nervioso en desarrollo. Este efecto podría ser causa de apoptosis neuronal y de cambios en los procesos de señalización en varias regiones del cerebro. Entre esos cambios, se apreció la disminución del grosor de la región CA3 del hipocampo dorsolateral. Si bien una disminución del grosor de la capa (señal de una reducción del número total de neuronas) podría no ser suficiente motivo para el desarrollo de los síntomas cognitivos asociados a la esquizofrenia, este hecho en conjunto con los procesos de señalización que afecten la normal actividad neuronal de la región CA3 serían una parte

fundamental de las causas de los cambios en el comportamiento advertidos en los animales experimentales, cambios relacionados con los síntomas positivos, negativos y cognitivos. Aunque la naturaleza del análisis histológico no permite indagar sobre los cambios a nivel molecular en el hipocampo y su relación con la esquizofrenia, puede asegurarse que una alteración morfofocelular en la región CA3 está asociada a los cambios conductuales propios del trastorno esquizofrénico.

A manera de resumen, se pretende exponer una posible hipótesis del efecto de la administración prenatal de ketamina, y de cómo este tratamiento puede producir las alteraciones neurobiológicas propias de la esquizofrenia (Fig. 28). Así, la exposición prenatal prolongada a la ketamina causa el bloqueo de los receptores NMDA en el feto en desarrollo. Esto desencadena la sobreexpresión de estos receptores a manera de efecto compensatorio, lo cual lleva a un exceso del influjo de  $Ca^{+2}$  con el subsecuente daño excitotóxico y posterior apoptosis neuronal. De esta forma, disminuye la población de neuronas glutamatérgicas, siendo esto un posible origen de la hipofunción glutamatérgica reportada en la esquizofrenia. Entre las regiones afectadas se encuentra el hipocampo. Una disminución de la población de neuronas en la región CA3 señala la mayor vulnerabilidad de esta región al tratamiento prenatal con ketamina. Una posible hipofunción glutamatérgica del lóbulo temporal medial reduce la actividad excitatoria del giro dentado a la región CA3. Esto, en conjunto con el aminoramiento de la actividad excitatoria autorecurrente en la región CA3 (posible efecto de la disminución del número de neuronas en esta región) produciría un efecto compensatorio: aumento de la densidad de receptores NMDA y receptores AMPA. Este efecto compensatorio disminuiría el umbral de excitación, con el incremento de la potenciación a largo plazo en la región CA3. En el hipocampo, se vislumbraría una sobreactividad en esta región, y una hipofunción del giro dentado. Esto traería un aumento de la evocación de recuerdos, recuerdos mal asociados a la realidad, produciendo los síntomas positivos y cognitivos asociados a la esquizofrenia. Estos síntomas se manifestarían como un estado de desinhibición en la adolescencia, para luego generar el conjunto de síntomas positivos, negativos y cognitivos propios del trastorno esquizofrénico en la adultez.



**Figura 28.** Hipótesis del efecto de la ketamina durante el estadio prenatal. El bloqueo de los receptores NMDA conlleva al incremento de la densidad de estos receptores a manera de efecto compensatorio, produciendo apoptosis neuronal en varias regiones del cerebro (entre ellas el hipocampo) y las alteraciones del comportamiento a futuro. NMDAr: receptores NMDA, DG: giro dentado, CA3: *cornu ammonis* 3, LTP: *long term potentiation* (potenciación a largo plazo).

## 8.6. Consideraciones finales

Como se comentó al inicio del presente trabajo, no se pretende proponer un modelo nuevo de esquizofrenia basado en la administración prenatal de ketamina. Se pretende más bien dar un paso en la comprensión de cómo las alteraciones del neurodesarrollo pueden ser causa de diversos trastornos psiquiátricos. Más específicamente, de cómo el antagonismo de receptores NMDA, en etapas tempranas del desarrollo, puede desencadenar en la génesis de la esquizofrenia y de otros trastornos psicóticos

Además del enlace de la ketamina con la esquizofrenia, un objetivo secundario radica en la seguridad de la ketamina y de compuestos relacionados como agentes anestésicos. Aunque el uso de la ketamina en anestesia durante el embarazo prácticamente se ha discontinuado, sigue utilizándose ocasionalmente en procedimientos menores en cirugía pediátrica, y en algunos casos de complicaciones durante el embarazo cuando no se cuenta con agentes anestésicos más seguros, como podría ser en el caso de países en vía de desarrollo (Craven, 2007). Más aún, la ketamina es utilizada como droga recreacional en personas adultas, adolescentes y (por qué no) en mujeres embarazadas. El consumo de otras drogas de mayor popularidad, como anfetaminas y cocaína, puede ser causa del desarrollo de síntomas psicóticos en personas sanas, con un potencial efecto neurotóxico durante el desarrollo. Por ende, el estudio de las consecuencias del abuso de drogas y agentes psicotrópicos durante el embarazo no compete solamente a la ketamina.

Un resultado a destacar es el patrón diferencial del comportamiento en función de la edad del animal. Si bien muchas veces importa solamente el fenotipo final que un modelo es capaz de producir, el estudio de la evolución de los síntomas puede esclarecer parte de las incógnitas de la neurobiología del trastorno, y llevar al desarrollo de estrategias preventivas focalizadas en estadios previos al desarrollo de la enfermedad. Por ello, evaluar la esquizofrenia desde el estadio juvenil a la adultez constituye un marco sólido de referencia para entender el progreso del trastorno con el tiempo.

La hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia ha servido de base al desarrollo de los actuales fármacos antipsicóticos. El número de pacientes con trastornos psiquiátricos internados en las clínicas y hospitales ha disminuido apreciablemente gracias a la introducción de los antipsicóticos. Sin embargo, un porcentaje considerable de pacientes no presenta mejoría con los fármacos disponibles. Esto ha llevado a que algunos estudios concentren sus esfuerzos en la modulación del sistema glutamatérgico para contrarrestar los síntomas de la esquizofrenia. Se plantea el uso de coagonistas del receptor NMDA (D-serina), inhibidores de los transportadores de glicina (otro coagonista), modulación de los receptores AMPA, y agonistas de receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR<sub>2/3</sub>). Los fármacos basados en la modulación del sistema glutamatérgico se encuentran todavía en estudios preclínicos. La importancia del desarrollo de modelos animales precisos surge también como necesidad para el desarrollo de terapias y fármacos eficaces, y con menos efectos adversos.

Por último, el siguiente paso comprobado el efecto neurotóxico de la ketamina en el estadio prenatal sería probar el efecto de un tratamiento que combine la intervención farmacológica temprana con la adversidad social postnatal. Un modelo robusto en ratas podría ser la aplicación sub-crónica de MK-801 en el estadio prenatal (durante, por ejemplo, los días embrionarios 14 a 21) combinada con el aislamiento materno durante 7 o 14 días continuos. Este tratamiento mixto podría alterar toda la fase temprana del neurodesarrollo y podría, tal vez, constituir un modelo robusto de esquizofrenia, combinación que hasta los momentos no ha sido probada.

## IX. CONCLUSIONES

- El tratamiento prenatal con ketamina, al término de la segunda semana de gestación en ratas, produce alteraciones neurobiológicas en la progenie, posiblemente por su efecto neurotóxico durante el desarrollo.
- El tratamiento produce un déficit en el crecimiento de las crías, no al poco tiempo del nacimiento (DPN 3), sino en etapas posteriores próximas al estadio puberal (DPN 21).
- Los cambios en el comportamiento pueden asociarse a un fenotipo del tipo esquizofrénico, y difieren en los juveniles y adultos sometidos al tratamiento. Así, los síntomas en los animales evolucionan con el tiempo.
- Los juveniles sometidos al tratamiento muestran una desinhibición prematura, propia del estadio adulto. Estos, al llegar a la adultez, presentan algunos de los síntomas propios del trastorno esquizofrénico: retraimiento social, déficits en la memoria espacial, ansiedad, agresividad, agitación, depresión y comportamientos estereotipados.
- El tratamiento con ketamina altera el desarrollo cerebral. A nivel histológico, se evidenció una reducción del grosor de la capa celular que forman la región CA3 del hipocampo, consecuencia del posible efecto neurotóxico de la ketamina durante el desarrollo.

## X. RECOMENDACIONES

- Una determinación más exacta del momento de la concepción de las crías es necesaria para aumentar la precisión a la hora de administrar el tratamiento con ketamina. Alguna prueba fisiológica realizada a diario, luego de iniciado el proceso de apareamiento, constituirá una medida más fidedigna del inicio del embarazo.
- La prueba de campo abierto puede ser influenciada por las dimensiones de la arena de pruebas. En caso de ambientes con niveles moderados de estrés, ruido, y/o alta iluminación, o cuando se observe un alto grado de tigmotaxis incluso en el grupo control, es conveniente disminuir las dimensiones del campo abierto. Una reducción razonable podría ser de 70 cm a 60-50 cm de cada lado de la arena de pruebas.
- La prueba de alternación espontánea es susceptible a la ansiedad provocada por la manipulación constante del animal. Además, algunos animales (en especial los más jóvenes) pueden cansarse luego de realizados unos 5-7 ensayos, lo que requiere un día de sesión adicional para finalizar con los ensayos faltantes. El laberinto en Y pudiera constituir una alternativa al laberinto en T cuando se observen niveles de ansiedad en el animal de significancia metodológica. La prueba de alternancia espontánea en el laberinto en Y no requiere la manipulación constante del animal, salvo para introducirlo y retirarlo del laberinto.
- El contraste entre el núcleo y los cuerpos de Nissl con el resto de los componentes citoplasmáticos depende de la concentración del colorante y el pH de la solución. Para obtener un mejor contraste (empleando una concentración de azul de metileno del 0.1%) se recomienda disminuir el pH de la solución por debajo de 4.2 (entre 3.5 y 4.0 sería adecuado).

## XI. REFERENCIAS

- Abekawa, T., K. Ito, S. Nakagawa & T. Koyama. 2007. Prenatal exposure to an NMDA receptor antagonist, MK-801 reduces density of parvalbumin-immunoreactive GABAergic neurons in the medial prefrontal cortex and enhances phencyclidine-induced hyperlocomotion but not behavioral sensitization to methamphetamine in postpubertal rats. *Psychopharmacology*, 192:303-316.
- Anderson, M. J. 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol.*, 26:32-46.
- Audet, M. C., S. Goulet & F. Y. Dore. 2006. Repeated subchronic exposure to phencyclidine elicits excessive atypical grooming in rats. *Behav. Brain Res.*, 167:103-110.
- Balu, D. T., A. C. Basu, J. P. Corradi, A. M. Cacace & J. T. Coyle. 2012. The NMDA receptor co-agonists, D-serine and glycine, regulate neuronal dendritic architecture in the somatosensory cortex. *Neurobiol. Dis.*, 45:671-682.
- Bardgett, M. E., G. T. Taylor, J. G. Csernansky, J. Q. Newcomer & B. Nock. 1996. Chronic corticosterone treatment impairs spontaneous alternation behavior in rats. *Behav. Neural Biol.*, 61:186-190.
- Barros, H. M., S. L. Tannhauser, M. A. Tannhauser & M. Tannhauser. 1994. The effects of GABAergic drugs on grooming behaviour in the open field. *Pharmacol. Toxicol.*, 74:339-344.
- Bayer, S. A., J. Altman, R. J. Russo & X. Zhang. 1993. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology*, 14:83-144.
- Becker, A., G. Grecksch, H. G. Bernstein, V. Höllt & B. Bogerts. 1999. Social behaviour in rats lesioned with ibotenic acid in the hippocampus: quantitative and qualitative analysis. *Psychopharmacology*, 144:333-338.
- Benjamini, Y. & Y. Hochberg. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. Roy. Stat. Soc. B. Met.*, 57:289-300.

- Birke, L. & J. Archer. 1983. Some issues and problems in the study of animal exploration. In: *Exploration in animals and humans* (Birke L., & J. Archer, Eds.), pp. 1-21. Van Nostrand Reinhold, Co. Ltd. London, England.
- Blanchard, D. C., R. J. Blanchard & R. J. Rodgers. 1991. Risk assessment and animal models of anxiety. In: *Animal models in psychopharmacology* (Oliver, B., J. Mos & J. L. Slangen, Eds.), pp. 117-134. Birkhäuser Basel. Munich, Germany.
- Bland, B. H. & S. D. Oddie. 2001. Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. *Behav. Brain Res.*, 127:119-136.
- Blizard, D. A. 1971. Situational determinants of open-field behaviour in *mus musculus*. *Brit. J. Psychol.*, 62:245-252.
- Blokland, A., S. ten Oever, D. van Gorp, M. van Draanen, T. Schmidt, E. Nguyen *et al.* 2012. The use of a test battery assessing affective behavior in rats: order effects. *Behav. Brain Res.*, 228:16-21.
- Boccia, M. L. & C. A. Pedersen. 2001. Brief versus long maternal separations in infancy: contrasting relationships with adult maternal behavior and lactation levels of aggression and anxiety. *Psychoneuroendocrino.*, 26:657-672.
- Brambrick, A. M., A. S. Evers, M. S. Avidan, N. B. Farber, D. J. Smith, L. D. Martin *et al.* 2012. Ketamine-induced neuroapoptosis in the fetal and neonatal rhesus macaque brain. *Anesthesiology*, 116:372-384.
- Brook, R. H., J. E. Ware, W. H. Rogers, E. B. Keeler, A. R. Davies & C. A. Donald. 1983. Does free care improve adult's health? Results from a randomized controlled trial. *New Engl. J. Med.*, 309:1426-1434.
- Brown, G. 2009. Tracker 4.87: Video Analysis and Modeling Tool. Open Source Physics. Davidson College, USA.
- Casarrubea, M., C. Davies, F. Faulisi, M. Pierucci, R. Colangeli, L. Partridge *et al.* 2015. Acute nicotine induces anxiety and disrupts temporal pattern organization of rat exploratory behavior in hole-board: a potential role for the lateral habenula. *Front. Cell. Neurosci.*, 9:e197.

- Cheek, T. G. & E. Baird. 2009. Anesthesia for nonobstetric surgery: maternal and fetal considerations. *Clin. Obstet. Gynecol.*, 52:535-545.
- Cheng, J. Y., D. T. Chan & V. K. Mok. 2005. An epidemiological study on alcohol/drugs related fatal traffic crash cases of deceased drivers in Hong Kong between 1996 and 2000. *Forensic. Sci. Int.*, 153:196-201.
- Citri, A. & R. C. Malenka. 2008. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacol.*, 33:18-41.
- Cohen, B. D., G. Rosenbaum, E. D. Luby & J. S. Gottlieb. 1962. Comparison of phencyclidine hydrochloride (sernyl) with other drugs: simulation of schizophrenic performance with phencyclidine hydrochloride (sernyl), lysergic acid diethylamide (LSD-25), and amobarbital (amytal) sodium; II. Symbolic and sequential thinking. *Arch. Gen. Psychiatry*, 6:395-401.
- Costall, B. & R. J. Naylor. 1995. Animal neuropharmacology and its prediction of clinical response. In: *Schizophrenia* (Hirsch, S. R. & D. R. Weinberger, Eds.), pp. 401-424. Blackwell Science. Oxford, England.
- Coyle, J. T. & G. T. Konopaske. 2012. The neurochemistry of schizophrenia. In: *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*. 8th edition (Brady, S. T., G. J. Siegel, R. W. Albers, D. L. Price & J. Benjamins, Eds.), pp. 1000-1011. Academic Press. Amsterdam, Netherlands.
- Craven, R. 2007. Ketamine. *Anaesthesia*, 62:48-53.
- Cryan, J. F., R. J. Valentino & I. Lucki. 2005. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29:547-569.
- Danbolt, N. C. 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.*, 65:1-105.
- Deacon, R. M. J., C. Penny & J. N. P. Rawlins. 2003. Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. *Behav. Brain Res.*, 139:139-155.
- Deacon, R. M. & J. N. P. Rawlins. 2006. T-maze alternation in the rodent. *Nat. Protoc.*, 1:7-12.

- Deakin, J. F., J. Lees, S. McKie, J. E. Hallak, S. R. Williams & S. M. Dursun. 2008. Glutamate and the neural basis of the subjective effects of ketamine: a pharmaco-magnetic resonance imaging study. *Arch. Gen. Psychiatry.*, 65:154-164.
- Detke, M. J. & I. Lucki. 1996. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: the effects of water depth. *Behav. Brain Res.*, 73:43-46.
- Dinno, A. 2016. dunn.test: Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums. R package version 1.3.2. <http://CRAN.R-project.org/package=dunn.test>.
- Domino, E., P. Chodoff & G. Corsen. 1965. Pharmacologic effects of CI-581, a new dissociative anaesthetic in human. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 6:279-291.
- Dracheva, S., S. R. McGurk & V. Haroutunian. 2005. mRNA expression of AMPA receptors and AMPA receptor binding proteins in the cerebral cortex of elderly schizophrenics. *J. Neurosci. Res.*, 79:868-878.
- Dumas, T. C. 2004. Early eyelid opening enhances spontaneous alternation and accelerates the development of perforant path synaptic strength in the hippocampus of juvenile rats. *Dev. psychobiol.*, 45:1-9.
- Duncan, I. D., K. F. Lunn, B. Holmgren, R. Urba-Holmgren & L. Brignolo-Holmes. 1992. The taiep rat: a myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect. *J. Neurocytol.*, 21:870-884.
- Dunn, A. J., E. J. Green & R. L. Isaacson. 1979. Intracerebral adrenocorticotrophic hormone mediates novelty-induced grooming in the rat. *Science*, 203:281-283.
- Dunn, O. J. 1964. Multiple comparisons using rank sums. *Technometrics*, 6:241-252.
- Ebert, A., I. S. Haussleiter, G. Juckel, M. Brüne & P. Roser. 2012. Impaired facial emotion recognition in a ketamine model of psychosis. *Psychiatry Res.*, 200:724-727.
- Egan, M. F., R. E. Straub, T. E. Goldberg, I. Yakub, J. H. Callicott, A. R. Hariri *et al.* 2004. Variation in GRM3 affects cognition, prefrontal glutamate, and risk for schizophrenia. *PNAS*, 101:12604-12609.
- Egger, G. J., P. J. Livesey & R. G. Dawson. 1973. Ontogenetic aspects of central cholinergic involvement in spontaneous behavior. *Dev. Psychobiol.*, 6:289-99.

- Falkai, P. & B. Bogerts. 1986. Cell loss in the hippocampus of schizophrenics. *Eur. Arch. Psychiatry Neurol. Sci.*, 236:154-161.
- Fernandez-Espejo, E. 2003. Prefrontocortical dopamine loss in rats delays long-term extinction of contextual conditioned fear, and reduces social interaction without affecting short-term social interaction memory. *Neuropsychopharmacol.*, 28:490-498.
- File, S. E. & J. R. G. Hyde. 1978. Can social interaction be used to measure anxiety? *Brit. J. Pharmacol.*, 62:19-24.
- File, S. E. 1979. Effects of ACTH4-10 in the social interaction test of anxiety. *Brain Res.*, 171:157-160.
- File, S. E., T. A. James & N. K. MacLeod. 1981. Depletion in amygdaloid 5-hydroxytryptamine concentration and changes in social and aggressive behaviour. *J. Neural Transm.*, 50:1-12.
- File, S.E. 1988. Anxiolytic and anxiogenic drugs: changes in behavior and endocrine responses. *Stress Med.*, 4:221-230.
- Fisher, H. L., A. Caspi, R. Poulton, M. H. Meier, R. Houts, H. Harrington *et al.* 2013. Specificity of childhood psychotic symptoms for predicting schizophrenia by 38 years of age: a birth cohort study. *Psychol. Med.*, 43:2077-2086.
- Franks, N. P. & W. R. Lieb. 1994. Molecular and cellular mechanism of general anesthesia. *Nature*, 367:607-614.
- Fusar-Poli, P., I. Bonoldi, A. R. Yung, S. Borgwardt, M. J. Kempton, L. Valmaggia *et al.* 2012. Predicting psychosis: meta-analysis of transition outcomes in individuals at high clinical risk. *Arch. Gen. Psychiatry*, 69:220-229.
- Gaskin, P. L., S. P. Alexander & K. Fone. 2014. Neonatal phencyclidine administration and post-weaning social isolation as a dual-hit model of 'schizophrenia-like' behaviour in the rat. *Psychopharmacology*, 231:2533-2545.
- Geisslinger, G., W. Hering, P. Thomann, R. Knoll, H. D. Kamp & K. Brune. 1993. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of ketamine enantiomers in surgical patients using a stereoselective analytical method. *Br. J. Anaesth.*, 70:666-671.

- Geyer, M. A. & B. Moghaddam. 2002. Animal models relevant to schizophrenia disorders. In: *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress* (Davis, K. L., D. Charney, J. T. Coyle & C. Nemeroff, Eds.), pp. 689-701. Lippincott, Williams and Wilkins. Philadelphia, USA.
- Gilabert-Juan, J., M. Belles, A. R. Saez, H. Carceller, S. Zamarbide-Fores, M. D. Moltó & J. Nacher. 2013. A “double hit” murine model for schizophrenia shows alterations in the structure and neurochemistry of the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Neurobiol. Dis.*, 59:126-140.
- Goldstein, M., y A. Y. Deutch. 1992. Dopaminergic mechanisms in the pathogenesis of schizophrenia. *FASEB J.*, 6:2413-2421.
- Goodman, S. 2002. Anesthesia for nonobstetric surgery in the pregnant patient. *Semin. Perinatol.*, 26:136-145.
- Gould, T. D., D. T. Dao & C. E. Kovacsics. 2009. The open field test. In: *Mood and anxiety related phenotypes in mice: Characterization using behavioral tests* (Gould, T. D., Ed.), pp. 1-20. Humana Press. New York, USA.
- Gray, J. A. & N. McNaughton. 2000. *The Neuropsychology of Anxiety*. 2nd edition. Oxford University Press. Oxford, England. 443 pp.
- Gregory, J. G., D. R. Kipke & S. William. 2012. Whole Animal Perfusion Fixation of Rodents. *J. Vis. Exp.*, 65:e3564.
- Griffiths, S. K. & J. P. Campbell. 2015. Placental structure, function and drug transfer. *CEACCP*, 15:84-89.
- Häfner, H. 2003. Gender differences in schizophrenia. *Psychoneuroendocrino*, 28:17-54.
- Hall, C. S. 1934. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J. Comp. Psychol.*, 18:385-403.
- Hansen, T. G., J. K. Pedersen, S. W. Henneberg, D. A. Pedersen, J. C. Murray, N. S. Morton & K. Christensen. 2011. Academic performance in adolescence after inguinal hernia repair in infancy: a nationwide cohort study. *Anesthesiology*, 114:1076-1085.

- Hayashi, H., P. Dikkes & S. G. Soriano. 2002. Repeated administration of ketamine may lead to neuronal degeneration in the developing rat brain. *Pediatr. Anaesth.*, 12:770-774.
- Hayashi, T. 1954. Effects of sodium glutamate on the nervous system. *Keio J. Med.*, 3:4183-4192.
- Hayashi, T., G. M. Thomas & R. L. Huganir. 2009. Dual palmitoylation of NR2 subunits regulates NMDA receptor trafficking. *Neuron*, 64:213-226.
- Heckers, S. & C. Konradi. 2010. Hippocampal pathology in schizophrenia. In: *Behavioral neurobiology of schizophrenia and its treatment* (Swerdlow, N. R., Ed.), pp. 529-553. Springer Berlin Heidelberg. Heidelberg, Germany.
- Hensler, J. G., F. Artigas, A. Bortolozzi, L. C. Daws, P. De Deurwaerdère, L. Milan *et al.* 2013. Catecholamine/serotonin interactions: systems thinking for brain function and disease. *Adv. Pharmacol.*, 68:167-197.
- Howes, O. D., A. Egerton, V. Allan, P. McGuire, P. Stokes & S. Kapur. 2009. Mechanisms underlying psychosis and antipsychotic treatment response in schizophrenia: insights from PET and SPECT imaging. *Curr. Pharm. Des.*, 15:2550-2559.
- Howes, O. D. & R. M. Murray. 2014. Schizophrenia: an integrated sociodevelopmental-cognitive model. *Lancet*, 383:1677-1687.
- Hughes, C. W. 1978. Observer influence on automated open field activity. *Physiol. Behav.*, 20:481-485.
- Ing, C., C. DiMaggio, A. Whitehouse, M. K. Hegarty, J. Brady, B. S. von Ungern-Sternberg *et al.* 2012. Long-term differences in language and cognitive function after childhood exposure to anesthesia. *Pediatrics*, 130:476-485.
- Isseroff, A. 1980. Facilitation of delayed spontaneous alternation behavior in adult rats following early hydroxyzine treatment: Differential sensitivity in late infancy. *Psychopharmacology*, 69:179-181.
- Itoh, T., J. Beesley, A. Itoh, A. S. Cohen, B. Kavanaugh, D. A. Coulter *et al.* 2002. AMPA glutamate receptor-mediated calcium signaling is transiently enhanced during development of oligodendrocytes. *J. Neurochem.*, 81:390-402.

- Jevtovic-Todorovic, V., R. E. Hartman, Y. Izumi, N. D. Benshoff, K. Dikranian, C. F. Zorumski *et al.* 2003. Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J. Neurosci.*, 23:876-882.
- Jones, C. A., D. J. G. Watson & K. C. F. Fone. 2011. Animal models of schizophrenia. *Br. J. Pharmacol.*, 164:1162-1994.
- Kalkman, C. J., L. Peelen, K. G. Moons, M. Veenhuizen, M. Bruens, G. Sinnema & T. P. Jong. 2009. Behavior and development in children and age at the time of first anesthetic exposure. *Anesthesiology*, 110:805-812.
- Kalsi, S. S., D. M. Wood & P. I. Dargan. 2011. The epidemiology and patterns of acute and chronic toxicity associated with recreational ketamine use. *Emerg. Health Threats J.*, 4:1-9.
- Kalueff, A. V., A. M. Stewart, C. Song, K. C. Berridge, A. M. Graybiel & J. C. Fentress. 2016. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. *Nat. Rev. Neurosci.*, 17:45-59.
- Kask, A., H. P. Nguyen, R. Pabst & S. von Horsten. 2001. Factors influencing behavior of group-housed male rats in the social interaction test: focus on cohort removal. *Physiol. Behav.*, 74:277-282.
- Keefe, R. S., R. M. Bilder, S. M. Davis, P. D. Harvey, B. W. Palmer, J. M. Gold *et al.* 2007. Neurocognitive effects of antipsychotic medications in patients with chronic schizophrenia in the CATIE Trial. *Arch. Gen. Psychiatry*, 64:633-647.
- Kekesi, G., Z. Petrovszki, G. Benedek G. & Horvath. 2015. Sex-specific alterations in behavioral and cognitive functions in a “three hit” animal model of schizophrenia. *Behav. Brain Res.*, 284:85-93.
- Kerchner, G. A. & R. A. Nicoll. 2008. Silent synapses and the emergence of a postsynaptic mechanism for LTP. *Nat. Rev. Neurosci.*, 9:813-825.
- Kessels, H. W. & R. Malinow. 2009. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior. *Neuron*, 61:340-350.
- Kiernan, J. A. 2008. Nuclear stains. *CSH Protoc.*, 3:1-14.

- Kim, D., S. H. Cho, J. S. Kim, S. H. Jo, S. J. Lee, K. T. Kim & S. Y. Choi. 2010. Human astrocytic bradykinin B<sub>2</sub> receptor modulates zymosan-induced cytokine expression in 1321N1 cells. *Peptides*, 31:101-107.
- Kompagne, H., G. Bardos, G. Szenasi, I. Gacsalyi, L. G. Harsing & G. Levay. 2008. Chronic mild stress generates clear depressive but ambiguous anxiety-like behaviour in rats. *Behav. Brain Res.*, 192:311-314.
- Kong, F. J., L. L. Ma, W. W. Hu, W. N. Wang, H. S. Lu & S. P. Chen. 2012. Fetal exposure to high isoflurane concentration induces postnatal memory and learning deficits in rats. *Biochem. Pharmacol.*, 84:558-563.
- Konopaske, G. T. & T. J. Coyle. Chapter 39- Schizophrenia. 2015. In: *Neurobiology of Brain Disorders* (Michael, J., P. Z. Lewis & R. T. Coyle, Eds.), pp. 639-654. Academic Press. Sunderland, USA.
- Krsiak, M. 1971. Measurement of Pharmacological Depression of Exploratory Activity in Mice: A Contribution to the Problem of Time-Economy and Sensitivity. *Psychopharmacology*, 21:118-130.
- Krystal, J. H., L. P. Karper, J. P. Seibyl, G. K. Freeman, R. Delaney, J. D. Bremner *et al.* 1994. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch. Gen. Psychiatry*, 51:199-214.
- Kuhn, C. M., J. Pauk & S. M. Schanberg. 1990. Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Dev. Psychobiol.*, 23:395-410.
- Lakhan, S. E., M. Caro & N. Hadzimidhalis. 2013. NMDA receptor activity in neuropsychiatric disorders. *Front. Psychiatry*, 4:e52.
- Lalonde, R. 2002. The neurobiological basis of spontaneous alternation. *Neurosci. Biobehav. R.*, 26:91-104.
- Laruelle, M., A. Abi-Dargham, C. H. van Dyck, R. Gil, C D. D'Souza, J. Erdos *et al.* 1996. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *PNAS*, 93:9235-9240.

- Leutgeb, S. & J. K. Leutgeb. 2007. Pattern separation, pattern completion, and new neuronal codes within a continuous CA3 map. *Learn. Memory*, 14:745-757.
- Lever, C., F. Cacucci, T. Wills, S. Burton, A. McClelland, N. Burgess & J. O'Keefe. 2003. Spatial coding in the hippocampal formation: input, information type, plasticity and behaviour. In: *The neurobiology of spatial behavior* (Jeffrey, K. J., Ed.), pp. 199-225. Oxford University Press. Oxford, England.
- Lever, C., S. Burton & J. O'Keefe. 2006. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev. Neurosciences*, 17:111-133.
- Lewis, D. A. & J. A. Lieberman. 2000. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron*, 28:325-334.
- Lewis, D. A. & P. Levitt. 2002. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment. *Annu. Rev. Neurosci.*, 25:409-432.
- Li, Q., W. M. Chan, J. A. Rudd, C. M. Wang, P. Y. H. Lam, M. S. M. Wai *et al.* 2013. Ketamine. In: *Novel Psychoactive Substances: Classification, Pharmacology and Toxicology* (Dargan, P. I. & D. M. Wood, Eds.), pp. 285-316. Academic Press. Sunderland, USA.
- Li, W., S. Ghose, K. Gleason, A. Begovic, J. Perez, J. Bartko *et al.* 2015. Synaptic proteins in schizophrenia hippocampus indicate increased neuronal activity in CA3. *Am. J. Psychiatry*, 172:373-382.
- Liao, Y., J. Tang, M. Ma, Z. Wu, M. Yang, X. Wang *et al.* 2010. Frontal white matter abnormalities following chronic ketamine use: a diffusion tensor imaging study. *Brain*, 133:2115-2122.
- Liao, Y., J. Tang, P. R. Corlett, X. Wang, M. Yang, H. Chen *et al.* 2011. Reduced dorsal prefrontal gray matter after chronic ketamine use. *Biol. Psychiatry*, 69:42-48.
- Lieberman, J. A., T. S. Stroup, J. P. McEvoy, M. S. Swartz, R. A. Rosenheck, D. O. Perkins *et al.* 2005. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N. Engl. J. Med.*, 353:1209-1223.
- Lin, C. H., H. Y. Lane & G. E. Tsai. 2012. Glutamate signaling in the pathophysiology and therapy of schizophrenia. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 100:665-677.

- Lindahl, J. S., B. R. Kjellsen, J. Tigert & R. Miskimins. 2008. In utero PCP exposure alters oligodendrocyte differentiation and myelination in developing rat frontal cortex. *Brain Res.*, 1234:137-147.
- Lipska, B. K. & D. R. Weinberger. 2000. To model a psychiatric disorder in animals: Schizophrenia As a Reality Test. *Neuropsychopharmacol.*, 23:223-239.
- Lipska, B. K. 2004. Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *Rev. Psychiatr. Neurosci.*, 29:282-286.
- Lisman, J. E. & A. A. Grace. 2005. The hippocampal VTA loop: controlling the entry of information into long term memory. *Neuron*, 46:703-713.
- Lohr, K. N., R. H. Brook, C. J. Kamberg, G. A. Goldberg, A. Leibowitz, J. Keesey *et al.* 1986. Effect of cost-sharing on use of medically effective and less effective care. *Med. Care*, 24:31-38.
- Lu, L., T. Mamiya, P. Lu, K. Toriumi, A. Mouri, M. Hiramatsu, Z. Li-Bo & T. Nabeshima. 2011. Prenatal exposure to PCP produces behavioral deficits accompanied by the overexpression of GLAST in the prefrontal cortex of postpubertal mice. *Behav. Brain Res.*, 220:32-139.
- Lucki, I. 1997. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. *Behav. Pharmacol.*, 8:523-532.
- Lynn, D. A. & G. R. Brown. 2009. The ontogeny of exploratory behavior in male and female adolescent rats (*Rattus norvegicus*). *Dev. Psychobiol.*, 51:513-520.
- Marazziti, D., M. Abelli, S. Baroni, B. Carpita, C. E. Ramacciotti & L. Dell'Osso. 2015. Neurobiological correlates of social anxiety disorder: an update. *CNS spectrums*, 20:100-111.
- Marino, M. D., B. N. Bourdelat-Parks, L. L. Cameron & D. Weinschenker. 2005. Genetic reduction of noradrenergic function alters social memory and reduces aggression in mice. *Behav. Brain Res.*, 161:197-203.
- Marsman, A., M. P. van den Heuvel, D. W. Klomp, R. S. Kahn, P. R. Luijten & H. E. H. Pol. 2013. Glutamate in schizophrenia: a focused review and meta-analysis of 1H-MRS studies. *Schizophr. Bull.*, 39:120-129.

- Masana, M., A. Bortolozzi & F. Artigas. 2011. Selective enhancement of mesocortical dopaminergic transmission by noradrenergic drugs: Therapeutic opportunities in schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, 14:53-68.
- Matute, C., M. Melone, A. Vallejo-Illarramendi & F. Conti. 2005. Increased expression of the astrocytic glutamate transporter GLT-1 in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Glia*, 49:451-455.
- Mayer, M. L., G. L. Westbrook & P. B. Guthrie. 1984. Voltage-dependent block by  $Mg^{2+}$  of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature*, 309:261-263.
- Meyer, U. & J. Feldon. 2010. Epidemiology-driven neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Prog. Neurobiology*, 90:285-326.
- Mouri, A., Y. Noda, T. Enomoto & T. Nabeshima. 2007. Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. *Neurochem. Int.*, 51:173-184.
- Mueser, K. T., M. P. Salyers & P. R. Mueser. 2001. A prospective analysis of work in schizophrenia. *Schizophr. Bull.*, 27:281-296.
- Murray, R. M., J. Lappin & M. Di Forti. 2008. Schizophrenia: from developmental deviance to dopamine dysregulation. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 18:129-134.
- Nelson, R. J. & B. C. Trainor. 2007. Neural mechanisms of aggression. *Nat. Rev. Neurosci.*, 8:536-546.
- Niesink, R. J. & J. M. van Ree. 1982. Short-term isolation increases social interactions of male rats: a parametric analysis. *Physiol. Behav.*, 29:819-825.
- Nishikawa, K. & N. L. Harrison. 2003. The actions of sevoflurane and desflurane on the gamma-aminobutyric acid receptor type A: Effects of TM2 mutations in the alpha and beta subunits. *Anesthesiology*, 99:678-684.
- Noda, Y., K. Yamada, H. Furukawa & T. Nabeshima. 1995. Enhancement of immobility in a forced swimming test by subacute or repeated treatment with phencyclidine: a new model of schizophrenia. *Brit. J. Pharmacol.*, 116:2531-2537.

- Ohnuma, T., S. Tessler, H. Arai, R. L. Faull, P. J. McKenna & P. C. Emson. 2000. Gene expression of metabotropic glutamate receptor 5 and excitatory amino acid transporter 2 in the schizophrenic hippocampus. *Mol. Brain Res.*, 85:24-31.
- Oksanen, J. F., G. Blanchet, R. Kindt, P. Legendre, P. R. Minchin, R. B. O'Hara, G. L. Simpson *et al.* 2016. vegan: Community Ecology Package. R package version 2.3-5. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Olbrich, H. G. & H. Braak. 1985. Ratio of pyramidal cells versus non pyramidal cells in sector CA1 of the human Ammon's horn. *Anat. Embryol.*, 173:105-110.
- Olney, J. W. & N. B. Farber. 1995. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 52:998-1007.
- Olney, J. W., J. Labruyere, G. Wang, D. F. Wozniak, M. T. Price & M. A. Sesma. 1991. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science*, 254:1515-1518.
- Palanisamy, A., M. G. Baxter, P. K. Keel, Z. Xie, G. Crosby & D. J. Culley. 2011. Rats exposed to isoflurane in utero during early gestation are behaviorally abnormal as adults. *Anesthesiology*, 114:521-528.
- Panksepp, J. 1981. The ontogeny of play in rats. *Dev. Psychobiol.*, 14:327-332.
- Paxinos, G. & C. Watson. 2007. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 6th edition. Academic press. Sunderland, USA. 456 pp.
- Peng, Y. R., S. He, H. Marie, S. Y. Zeng, J. Ma, Z. J. Tan *et al.* 2009. Coordinated changes in dendritic arborization and synaptic strength during neural circuit development. *Neuron*, 61:71-84.
- Powell, S. B., X. Zhou & M. A. Geyer. 2009. Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behav. Brain Res.*, 204:282-294.
- Prut, L. & C. Belzung. 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *Eur. J. Pharmacol.*, 463:3-33.
- Purves, D., G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, W. C. Hall, A. S. Lamantia, J. O. McNamara & S. M. Williams. 2004. *Neuroscience*. 3rd edition. Sinauer Associates. Sunderland, USA. 773 pp.

- R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Robbins, T. W., B. J. Everitt, H. M. Marston, J. Wilkinson, G. H. Jones & K. J. Page. 1989. Comparative effects of ibotenic acid and quisqualic acid induced lesions of the substantia innominata on attentional function in the rat: further implications for the role of the cholinergic neurons of the nucleus basalis in cognitive processes. *Behav. Brain Res.*, 35: 221-240.
- Rofael, H. Z., R. M. Turkall & M. S. Abdel-Rahman. 2003. Immunomodulation by cocaine and ketamine in postnatal rats. *Toxicology*, 188:101-114.
- Saha, S., D. Chant & J. McGrath. 2007. A systematic review of mortality in schizophrenia: is the differential mortality gap worsening over time? *Arch. Gen. Psychiatry*, 64:1123-1131.
- Sandstrom, N. J. & S. R. Hart. 2005. Isolation stress during the third post natal week alters radial arm maze performance and corticosterone levels in adulthood. *Behav. Brain Res.*, 156:289-296.
- Schneider, C. A., W. S. Rasband & K. W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, 9:671-675.
- Seillier, A. & A. Giuffrida. 2009. Evaluation of NMDA receptor models of schizophrenia: divergences in the behavioral effects of sub-chronic PCP and MK-801. *Behav. Brain Res.*, 204:410-415.
- Selvaraj, S., D. Arnone, A. Cappai, & O. Howes. 2014. Alterations in the serotonin system in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of postmortem and molecular imaging studies. *Neurosci. Biobehav. R.*, 45:233-245.
- Sesack, S. R. & V. M. Pickel. 1992. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J. Comp. Neurol.*, 320:145-60.
- Sharp, F. R. & R. L. Hendren. 2007. Psychosis: atypical limbic epilepsy versus limbic hyperexcitability with onset at puberty? *Epilepsy Behav.*, 10:515-520.
- Shi, Q., L. Guo, T. A. Patterson, S. Dial, Q. Li, N. Sadovova *et al.* 2010. Gene expression profiling in the developing rat brain exposed to ketamine. *Neuroscience*, 166:852-863.

- Siegel, M. A., R. Richardson & B. A. Campbell. 1988. Effects of home nest stimuli on the emotional response of preweanling rats to an unfamiliar environment. *Psychobiology*, 16:236-242.
- Sisk, C. L. & J. L. Zehr. 2005. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behaviour. *Front. Neuroendocrin.*, 26:163-174.
- Slade, E. & D. Salkever. 2001. Symptom effects on employment in a structural model of mental illness and treatment: analysis of patients with schizophrenia. *J. Ment. Health Policy*, 4:25-34.
- Slattery, D. A. & J. F. Cryan. 2012. Using the rat forced swim test to assess antidepressant-like activity in rodents. *Nat. Protoc.*, 7:1009-1014.
- Slikker, W. J., X. Zou, C. E. Hotchkiss, R. L. Divine, N. Sadova, N. C. Twaddle *et al.* 2007. Ketamine-induced neuronal cell death in the perinatal rhesus monkey. *Toxicol. Sci.*, 98:145-158.
- Smolinsky, A. N., C. L. Bergner, J. L. LaPorte & A. V. Kalueff. 2009. Analysis of grooming behavior and its utility in studying animal stress, anxiety, and depression. In: *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests* (Gould, T. D., Ed.), pp. 21-36. Humana Press. New York, USA.
- Spruijt, B. M., J. A. Van Hooff & W. H. Gispen. 1992. Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiol. Rev.*, 72:825-852.
- Steen, R. G., C. Mull, R. McClure, R.M. Hamer & J. A. Lieberman. 2006. Brain volume in first episode schizophrenia: systematic review and meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Br. J. Psychiatry*, 188:510-518.
- Steiner, J. A., A. M. Carneiro & R. D. Blakely. 2008. Going with the flow: trafficking-dependent and-independent regulation of serotonin transport. *Traffic*, 9:1393-1402.
- Strange, B. A., M. P. Witter, E. S. Lein & E. I. Moser. 2014. Functional organization of the hippocampal longitudinal axis. *Nat. Rev. Neurosci.*, 15:655-669.
- Stuart, B. & C. Zacker. 1999. Who bears the burden of Medicaid drug copayment policies? *Health Affair.*, 18:201-212.

- Su, P. H., Y. Z. Chang & J. Y. Chen. 2010. Infant with in utero ketamine exposure: quantitative measurement of residual dosage in hair. *Pediatr. Neonatol.*, 51:279-284.
- Sullivan, P. F. 2005. The Genetics of Schizophrenia. *PLoS Medicine*, 2:e212.
- Takeuchi, M., Y. Hata, K. Hirao, A. Toyoda, M. Irie & Y. Takai. 1997. SAPAPs. A family of PSD-95/SAP90-associated proteins localized at postsynaptic density. *J. Biol. Chem.*, 272:11943-11951.
- Tamminga, C. A., A. D. Stan & A. D. Wagner. 2010. The hippocampal formation in schizophrenia. *Am. J. Psychiat.*, 167:1178-1193.
- Théberge, J., Y. Al-Semaan, P. C. Williamson, R. S. Menon, R. W. J. Neufeld, N. Rajakumar *et al.* 2003. Glutamate and glutamine in the anterior cingulate and thalamus of medicated patients with chronic schizophrenia and healthy comparison subjects measured with 4.0-T proton MRS. *Am. J. Psychiatry.*, 160:2231-2233.
- Thiel, C. M., C. P. Müller, J. P. Huston & R. K. W. Schwarting. 1999. High versus low reactivity to a novel environment: behavioural, pharmacological and neurochemical assessments. *Neuroscience*, 93:243-251.
- Tirelli, E., G. Laviola & W. Adriani. 2003. Ontogenesis of behavioral sensitization and conditioned place preference induced by psychostimulants in laboratory rodents. *Neurosci. Biobehav. R.*, 27:163-178.
- Traynelis, S. F., L. P. Wollmuth, C. J. McBain, F. S. Menniti, K. M. Vance, K. K. Ogden *et al.* 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.*, 62:405-496.
- Ulloa, R. E., A. Díaz-Valderrama, J. Herrera-Pérez, M. León-Olea, L. & Martínez-Mota. 2014. Age differences in the impact of forced swimming test on serotonin transporter levels in lateral septum and dorsal raphe. *Behav. Brain Funct.*, 10:e1.
- Valle, F. P. 1970. Effects of strain, sex, and illumination on open-field behavior of rats. *Am. J. Psychol.*, 83:103-111.
- van den Buuse, M. 2010. Modeling the positive symptoms of schizophrenia in genetically modified mice: pharmacology and methodology aspects. *Schizophrenia Bull.*, 36:246-270.

- van Kammen, D. P. & M. Kelley. 1991. Dopamine and norepinephrine activity in schizophrenia: An integrative perspective. *Schizophr. Res.*, 4:173-191.
- van Os, J. & S. Kapur. 2009. Schizophrenia. *Lancet*, 374:635-645.
- van Sluyters, R. C. & A. Obernier. 2004. Guidelines for the care and use of mammals in neuroscience and behavioral research. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.*, 43:48-52.
- Verma, A. & B. Moghaddam. 1996. NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine. *J. Neurosci.*, 16:373-379.
- Walf, A. A. & C. A. Frye. 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.*, 2:322-328.
- White, P. F., J. Ham, W. L. Way & A. Trevor. 1980. Pharmacology of ketamine isomers in surgical patients. *Anesthesiology*, 52:231-239.
- Williams, G. V. & S. A. Castner. 2006. Under the curve: Critical issues for elucidating D<sub>1</sub> receptor function in working memory. *Neuroscience*, 39:263-276.
- Wilson, C. A. & J. I. Koenig. 2014. Social interaction and social withdrawal in rodents as readouts for investigating the negative symptoms of schizophrenia. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 24:759-773.
- Witter, M. P., F. G. Wouterlood, P. A. Naber & T. van Haefen. 2000. Anatomical organization of the parahippocampal hippocampal network. In: *The parahippocampal region: implications for neurological and psychiatric diseases* (Scharfman, H. E., M. P. Witter & R. Schwarcz, Eds.), pp. 1-24. Annals of the New York Academy of Sciences. New York, USA.
- Wolff, K. & A. R. Winstock. 2006. Ketamine: from medicine to misuse. *CNS Drugs*, 20:199-218.
- Woo, T. U., J. P. Walsh & F. M. Benes. 2004. Density of glutamic acid decarboxylase 67 messenger RNA-containing neurons that express the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR2A in the anterior cingulate cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry*, 61:649-57.

- Yanagi, M., S. Southcott, J. Lister & C. A. Tamminga. 2012. Animal Models of Schizophrenia: Emphasizing Construct Validity. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 105:411-444.
- Yang H., G. Liang, B. J. Hawkins, M. Madesh, A. Pierwola & H. Wei. 2008. Inhalational anesthetics induce cell damage by disruption of intracellular calcium homeostasis with different potencies. *Anesthesiology*, 109:243-250.
- Zhao, T., Y. Li, W. Wei, S. Savage, L. Zhou & D. Ma. 2014. Ketamine administered to pregnant rats in the second trimester causes long-lasting behavioral disorders in offspring. *Neurobiol. Dis.*, 68:145-155.
- Zhao, T., C. Li, W. Wei, H. Zhang, D. Ma, X. Song L. & Zhou. 2016. Prenatal ketamine exposure causes abnormal development of prefrontal cortex in rat. *Sci. Rep.*, 6:e26865.
- Zheng, H., Y. Dong, Z. Xu, G. Crosby, D. J. Culley, Y. Zhang & Z. Xie. 2013. Sevoflurane anesthesia in pregnant mice induces neurotoxicity in fetal and offspring mice. *Anesthesiology*, 118:516-526.
- Zimmerberg, B., S. H. Rackow & K. P. George-Friedman. 1999. Sex-dependent behavioral effects of the neurosteroid allopregnanolone (3 $\alpha$ , 5 $\alpha$ -THP) in neonatal and adult rats after post-natal stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 64:717-724.

## XII. ANEXOS

### Anexo A: algoritmos usados en R

```
###Prueba de campo abierto###

OFT <- function (nombre = NULL, lg = "cm", int = 0.625,
  temp = "seg" , sep = "/", dec = ".",
  dim = 70, cen = 0.33) {

  if (sum (as.numeric (c (class (nombre), class (lg), class (temp),
    class (sep), class (dec))) == "character")) != 5)
  {stop ("Recuerde ingresar la informacion entre comillas")}

  if (sum (as.numeric (c (class (int), class (dim),
    class (cen))) == "numeric")) != 3)
  {stop ("Los parametros int, dim, cen, deben ser de caracter numerico")}

  if (cen <= 0 | cen > 1)
  {stop ("El valor del area central, cen, debe ser mayor a cero y menor
    o igual a uno")}

  if (dim <= 0 | int <= 0)
  {stop ("Los parametros int y dim deben ser un numero positivo")}

  data <- read.csv (nombre, colClasses = "character", sep = sep, dec = dec)
  mat <- sapply (data, matrix)
  t <- as.numeric (mat[,1])
  x <- as.numeric (mat[,2])
  y <- as.numeric (mat[,3])

  #Distancia total recorrida
  for (i in 2:length (t)) {
    "dc" <- ((x[i] - x[i-1])^2 + (y[i] - y[i-1])^2)^0.5
    if (i == 2)
    {"w" <- list (dc)}
    else
    {w [length(w)+1] <- dc}
  }
  dist <- sum (sapply (w, matrix))

  #Estadia en la region central
  lcen <- sqrt((dim^2)*cen)
  mar.1 <- (dim-lcen)/2
  mar.2 <- dim - mar.1
  logic <- which (x > mar.1 & x < mar.2 & y > mar.1 & y < mar.2)
```

```

central <- length (logic)
tigmo <- (length (t)-1) - central
central.t <- central*int
tigmo.t <- tigmo*int
pcj <- central.t/tigmo.t*100

DTR <- dist #Distancia total recorrida
CEN <- central.t #Tiempo de estadia en la region central
TIG <- tigmo.t #Tigmotagsis
UNIT <- c(lg, temp) #Unidades de medida (distancia, tiempo).
res <- list (DTR, CEN, TIG, UNIT)
names (res) <- c("DTR", "CEN", "TIG", "UNIT")
return (res)
}

```

**Algoritmo 1.** Función para el cálculo de la distancia total recorrida y tiempo en la región central en la prueba de campo abierto.

### ***Variables***

De clase carácter:

- a) nombre: nombre del archivo .csv guardado en el directorio de trabajo de R.
- b) lg: unidad de longitud de la data (p.e., cm, pulgada).
- c) temp: unidad de tiempo.
- d) tab: separador de columnas ("", "/", "...).
- e) dec: separador decimal ("", ";", "." ...).

De clase numérico:

- a) int: intervalo de tiempo entre secuencias.
- b) dim: longitud de los lados del campo abierto.
- c) cen: proporción ocupada por la región central

### ***Resultado.***

Un objeto del tipo lista con los siguientes elementos:

- a) DTR: la distancia total recorrida durante el tiempo de duración de la prueba.

- b)** CEN: tiempo de estadía total en la región central.
- c)** TIG: tiempo de estadía total en la periferia del campo abierto.
- d)** UNIT: unidades de medida (tiempo y longitud).

***Consideraciones.***

El intervalo entre fotogramas debe ser estrictamente constante para el cálculo preciso del tiempo de estadía en la región central. Por omisión, se considera un campo abierto de 70 x 70 cm, con una región central equivalente al 33% del área del campo.