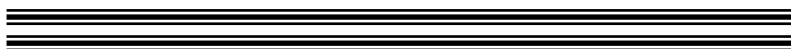




INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

EFFECTO DE LA CEREBROLISINA SOBRE LA LESIÓN NEONATAL
DEL HIPOCAMPO VENTRAL: IMPLICACIONES EN LA
ESQUIZOFRENIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
QUIMICOBIOLOGICAS

P R E S E N T A

M. en C. RUBÉN ANTONIO VÁZQUEZ ROQUE



MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 9:30 horas del día 25 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Efecto de la cerebrolisina sobre la lesión neonatal del hipocampo ventral: implicaciones en la esquizofrenia.

Presentada por el alumno:

Vázquez

Apellido paterno

Roque

Apellido materno

Rubén Antonio

Nombre(s)

Con registro:

B	0	8	1	6	3	6
---	---	---	---	---	---	---

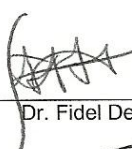
aspirante de:

Doctorado en Ciencias Quimicobiológicas

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis


Dr. Fidel De la Cruz López


Dr. Gonzalo Flores Álvarez


Dr. Eduardo Ramírez San Juan


Dr. Abraham Miranda Páez

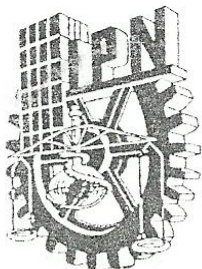

Dr. Sergio Roberto Zamudio Hernández


Dra. Lucía Quevedo Corona

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Manuel Jesús Piñón López



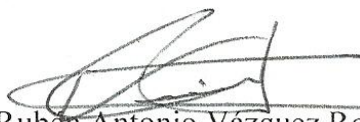


INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

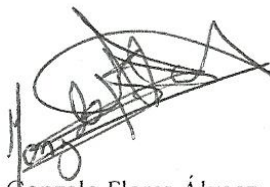
En la Ciudad de México, D. F., el día 25 del mes de noviembre del año 2011, el (la) que suscribe Rubén Antonio Vázquez Roque alumno (a) del Programa de Ciencias Quimicobiológicas con número de registro B081636, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Fidel de la Cruz López y del Dr. Gonzalo Flores Álvarez y cede los derechos del trabajo intitulado Efecto de la Cerebrolisina sobre la lesión neonatal del hipocampo ventral: implicaciones en la esquizofrenia, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección flacruz90@hotmail.com y gonzaloflores56@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Rubén Antonio Vázquez Roque

Nombre y firma


Dr. Fidel de la Cruz López
Director de Tesis


Dr. Gonzalo Flores Álvarez
Director de tesis

Chronic Administration of the Neurotrophic Agent Cerebrolysin Ameliorates the Behavioral and Morphological Changes Induced by Neonatal Ventral Hippocampus Lesion in a Rat Model of Schizophrenia

Rubén Vázquez-Roque,^{1,2} Brenda Ramos,¹ Carolina Tecuatl,¹ Ismael Juárez,¹ Anthony Adame,³ Fidel de la Cruz,² Sergio Zamudio,² Raúl Mena,⁴ Edward Rockenstein,³ Eliezer Masliah,³ and Gonzalo Flores^{1*}

¹Laboratorio de Neuropsiquiatría, Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

²Departamento de Fisiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D.F., México

³Department of Neurosciences, University of California, San Diego, La Jolla, California

⁴Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV-IPN, México D.F., México

Neonatal ventral hippocampal lesion (nVHL) in rats has been widely used as a neurodevelopmental model to mimic schizophrenia-like behaviors. Recently, we reported that nVHLs result in dendritic retraction and spine loss in prefrontal cortex (PFC) pyramidal neurons and medium spiny neurons of the nucleus accumbens (NAcc). Cerebrolysin (Cbl), a neurotrophic peptide mixture, has been reported to ameliorate the synaptic and dendritic pathology in models of aging and neurodevelopmental disorder such as Rett syndrome. This study sought to determine whether Cbl was capable of reducing behavioral and neuronal alterations in nVHL rats. The behavioral analysis included locomotor activity induced by novel environment and amphetamine, social interaction, and sensorimotor gating. The morphological evaluation included dendritic analysis by using the Golgi-Cox procedure and stereology to quantify the total cell number in PFC and NAcc. Behavioral data show a reduction in the hyperresponsiveness to novel environment- and amphetamine-induced locomotion, with an increase in the total time spent in social interactions and in prepulse inhibition in Cbl-treated nVHL rats. In addition, neuropathological analysis of the limbic regions also showed amelioration of dendritic retraction and spine loss in Cbl-treated nVHL rats. Cbl treatment also ameliorated dendritic pathology and neuronal loss in the PFC and NAcc in nVHL rats. This study demonstrates that Cbl promotes behavioral improvements and recovery of dendritic neuronal damage in postpubertal nVHL rats and suggests that Cbl may have neurotrophic effects in this neurodevelopmental model of schizophrenia. These findings support the possibility that Cbl has beneficial effects in the management of schizophrenia symptoms. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

Key words: cerebrolysin; neonatal ventral hippocampal lesion; schizophrenia; prefrontal cortex; nucleus accumbens; Golgi-Cox stain; stereology

Rats with a bilateral neonatal ventral hippocampal (nVH) lesion are a widely used heuristic neurodevelopmental animal model for studying schizophrenia and have been reported to mimic many schizophrenia-like behaviors (for review see Tseng et al., 2009). These rats exhibit behavioral changes that manifest themselves fully only after puberty (Lipska and Weinberger, 2000; Marcotte et al., 2001), with normal behaviors at a prepubertal age. Behavioral changes include locomotor hyperresponsiveness to stress (Lipska et al., 1993; Flores et al., 1996a; Silva-Gomez et al., 2003a; Alquicer et al., 2008), deficits in social interaction (Sams-Dodd et al., 1997; Flores et al., 2005b), sensorimotor gating (Le Pen and Moreau, 2002; Le Pen et al., 2003b), spatial learning and working memory problems (Chambers et al., 1996; Silva-Gómez et al., 2003a), and decreased attention (Le Pen et al., 2003a). In addition to these behavioral alterations, multiple neurochemical, molecular, and morphological changes have been reported in these

Contract grant sponsor: VIEP-BUAP; Contract grant number: FLAG/SAL11/G; Contract grant sponsor: CONACYT; Contract grant number: 138663 (to G.F.); Contract grant sponsor: NIH; Contract grant number: AG18440 (to E.M.).

*Correspondence to: Gonzalo Flores, Lab. de Neuropsiquiatría, Instituto de Fisiología, Universidad Autónoma de Puebla, 14 Sur 6301, Puebla, Mexico CP 72570. E-mail: gfflores@siu.buap.mx

Received 21 April 2011; Revised 16 June 2011; Accepted 29 June 2011

Published online 00 Month 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.22753

DEDICADO:

A dios por ser la luz que ilumina mi camino.

A la memoria de mi padre que siempre estara conmigo.

A mi madre por su amor incondicional.

A mis hermanos: Paty, Elin, Soco y Adriana por su apoyo y amor.

A mis amigos por su cariño y el tiempo que me han dedicado.

EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA DR. MAURICIO RUSSEK BERMAN, DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL EN COLABORACIÓN CON EL LABORATORIO DE NEUROPSIQUIATRÍA DEL INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA DE LA BENÉMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA Y CON EL DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA Y NEUROCIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE CALIFORNIA SAN DIEGO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. FIDEL DE LA CRUZ LÓPEZ Y DEL DR. GONZALO FLORES ÁLVAREZ.

AGRADECIMIENTOS

A los doctores Fidel de la Cruz López, Gonzalo Flores Álvarez, Sergio Roberto Zamudio Hernández por su valiosa orientación y apoyo en la realización de este trabajo.

Al Dr. Eliezer Masliah por su gran apoyo y por las enormes enseñanzas que me proporcionó durante el tiempo que me permitió estar en su laboratorio.

A mis sinodales, Dra. Lucia Quevedo Corona, Dr. Eduardo Ramírez San Juan y al Dr. Abraham Miranda Paez por su valiosa orientación y amable atención.

Al Instituto Politécnico Nacional y a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por permitirme trabajar en sus instalaciones.

Al CONACYT por su apoyo económico con el No. de registro 202107 de becario nacional.

ÍNDICE

	Página
Indice de Figuras	I
Abreviaturas	III
Resumen	IV
Abstract	VI
I. Introducción	15
1.1 Fisiopatología de la esquizofrenia	15
1.2 Sistema dopaminérgico	19
1.3 Sistema límbico y el hipocampo	20
1.4 Corteza media prefrontal	23
1.5 Núcleo accumbens	25
1.6 Amígdala	28
1.7 Modelo de lesión excitotóxica de hipocampo ventral	32
1.8 Cerebrolisina	36
II. Justificación	38
III. Hipótesis	39
IV. Objetivos	39
4.1 Objetivo general	39
4.2 Objetivos específicos	39
V. Metodología	41
5.1 Diagrama de trabajo	41
5.2 Protocolo de lesión del hipocampo ventral	43
5.3 Administración de cerebrolisina	44
5.4 Estudios conductuales	44
5.5 Protocolo de actividad locomotora	45
5.6 Protocolo de interacción social	46
5.7 Protocolo de inhibición del prepulso	48
5.8 Estudios morfológicos	50
5.8.1 Protocolo de tinción de Golgi-Cox	50
5.8.2 Protocolo de revelado de la tinción de Golgi-Cox	51
5.8.3 Análisis de neuronas contrastadas con la tinción de Golgi-Cox	51
5.8.4 Estudio histológico tinción de Nissl	52
5.9 Análisis de los resultados morfológicos	53
5.10 Análisis de estereología	54
5.11 Análisis de la concentración de tirosina hidroxilasa	56
5.12 Análisis estadístico	57
VI. Resultados	58
6.1 Actividad locomotora	58
6.2 Interacción social	61
6.3 Inhibición del prepulso	63
6.4 Morfología dendrítica	65
6.5 Análisis de la densidad neuronal por estereología	73
6.6 Análisis de la densidad de tirosina hidroxilasa	76
6.7 Verificación de la lesión	79
VII. Discusión	80
VIII. Conclusiones preliminares	86
IX. Bibliografía	87

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de las capas de la corteza prefrontal.	24
Figura 2. Diagrama de las conexiones neuronales del sistema límbico.	31
Figura 3. Comparación de las alteraciones del modelo de lesión neonatal del Hipocampo Ventral.	35
Figura 4. Esquemmatización de las dimensiones del equipo de medición de la actividad locomotora.	46
Figura 5. Esquemmatización de la vista frontal del registro de interacción social en campo abierto.	47
Figura 6. Esquemmatización del equipo “Star Reflex Meter”.	49
Figura 7. Diagrama de la plantilla de discos concéntricos para el análisis de Sholl.	54
Figura 8. Fotografía del equipo de medición de estereología.	55
Figura 9. Actividad locomotora acumulada ante ambiente novedoso	59
Figura 10. Actividad locomotora total.	60
Figura 11. Perfil temporal de la actividad locomotora.	60
Figura 12. Efecto de la anfetamina sobre la actividad locomotora total	61
Figura 13. Tiempo total de contacto durante la prueba de interacción social.	62
Figura 14. Número total de contactos durante la prueba de interacción social.	62
Figura 15. Amplitud de la respuesta de sobresalto.	64
Figura 16. Inhibición del prepulso.	64
Figura 17. Análisis morfológico de las neuronas piramidales de la corteza media prefrontal capa III.	68
Figura 18. Análisis morfológico de las neuronas piramidales de la Corteza Media prefrontal capa V.	69

Figura 19. Análisis morfológico de las neuronas piramidales de la amígdala basolateral.	70
Figura 20. Análisis morfológico de las neuronas espinosas medianas del Núcleo Accumbens.	71
Figura 21. Análisis morfológico de las neuronas espinosas medianas del Caudado Putamen.	71
Figura 22. Análisis estereológico de neuronas de la corteza media prefrontal.	74
Figura 23. Análisis estereológico de neuronas de la amígdala basolateral.	75
Figura 24. Análisis estereológico de neuronas del núcleo accumbens coraza	75
Figura 25. Análisis estereológico de neuronas del núcleo accumbens centro	76
Figura 26. Análisis estereológico de neuronas del caudado putamen.	76
Figura 27. Análisis de densidad para la cuantificación de tirosina hidroxilasa en el Nacc Shell.	78
Figura 28. Análisis de densidad para la cuantificación de tirosina hidroxilasa en el CPu.	79
Figura 29. Fotografía de un corte coronal de un cerebro de rata LNHV teñido con violeta de cresilo a nivel del hipocampo ventral.	79

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
AMPC	Monofosfato cíclico de adenosina
ATV	Area tegmental ventral
COMT	Catecol-o-metil-transferasa
Cpu	Caudado putamen
CPF	Corteza prefrontal
CPFm	Corteza media prefrontal
DAG	Diacilglicerol
DA	Dopamina
GABA	Acido gamma aminobutírico
IP3	1,4,5-trifosfato de inositol
LNHV	Lesión neonatal del hipocampo ventral
NA	Noradrenalina
NAcc	Núcleo accumbens
NMDA	N-metil-D-aspartato
MAO	Monoamino oxidasa
PCP	Fenciclidina
SNC	Sistema nervioso central
SNc	Sustancia nigra compacta
TDM	Tálamo dorsomedial

RESUMEN

El modelo de lesión neonatal del hipocampo ventral (LNHV) en ratas ha sido ampliamente utilizado para el estudio de algunas alteraciones conductuales propias de la esquizofrenia. Las alteraciones moleculares y morfológicas en la corteza media prefrontal (CPFm) y el núcleo accumbens (Nacc) en animales LNHV sugieren la reorganización en el desarrollo de estas estructuras como consecuencia de la lesión neonatal. La cerebrolisina (cbl) es una mezcla de péptidos con actividad neurotrófica y neuroprotectora, la cual induce diferenciación neuronal y mantiene la integridad funcional de las células nerviosas.

El objetivo de este estudio fue determinar si la cerebrolisina es capaz de reducir las alteraciones conductuales y neuronales provocadas por el efecto de la lesión neonatal del hipocampo ventral en ratas. El análisis conductual se efectuó mediante las pruebas de actividad locomotora ante ambiente novedoso e inducida por anfetamina, la interacción social y la prueba de inhibición por prepulso. La evaluación morfológica consta del análisis dendrítico mediante la técnica de Golgi-Cox y la estereología para cuantificar el número de células en la CPFm y en el Nacc. Los datos obtenidos de las ratas LNHV tratadas con cerebrolisina en las pruebas conductuales muestran una reducción de la hiperactividad locomotora ante ambiente novedoso e inducida por anfetamina, así como un incremento en el tiempo de interacción social y una disminución en la alteración de la inhibición por prepulso. Además, los análisis neuropatológicos de las regiones del sistema límbico muestran una reducción en el daño dendrítico y en pérdida de espinas dendríticas en las ratas LNHV tratadas con cerebrolisina. La cerebrolisina promueve una recuperación del daño en la longitud dendrítica y la densidad de espinas en las neuronas de la corteza media prefrontal y en el Nacc en las ratas LNHV.

Por otra parte, la cerebrolisina también disminuyó las alteraciones en los niveles de tirosina hidroxilasa en el núcleo accumbens coraza en las ratas con lesión neonatal del hipocampo ventral. Por lo que, estos resultados demuestran que la cerebrolisina promueve una mejoría en las alteraciones conductuales y en la recuperación neuronal ocasionados por la lesión del hipocampo ventral en ratas a edad postpúber y se sugiere que la cerebrolina puede tener efectos neurotróficos en el neurodesarrollo del modelo de esquizofrenia. Estos resultados sugieren que la cerebrolisina podría ser utilizada como una terapia alternativa en la esquizofrenia.

Abstract

Neonatal ventral hippocampal lesion (nVHL) in rats has been widely used as a neurodevelopmental model to mimic schizophrenia-like behaviors. Molecular and morphological alterations in the prefrontal cortex (PFC) and nucleus accumbens (NAcc) of nVHL-lesioned animals suggest developmental reorganization of these structures following neonatal lesions. Cerebrolysin (Cbl) is a peptide mixture with neurotrophic and neuroprotective activity that causes neuronal differentiation and maintains the functional integrity and recovery of the nerve cell.

This study sought to determine whether Cbl was capable of reducing behavioral and neuronal alterations in nVHL rats. The behavioral analysis included locomotor activity induced by novel environment and amphetamine, social interaction, and sensorimotor gating. The morphological evaluation included dendritic analysis by using the Golgi-Cox procedure and stereology to quantify the total cell number in PFC and NAcc. Behavioral data show a reduction in the hyperresponsiveness to novel environment- and amphetamine induced locomotion, with an increase in the total time spent in social interactions and in prepulse inhibition in Cbl-treated nVHL rats. In addition, neuropathological analysis of the limbic regions also showed amelioration of dendritic retraction and spine loss in Cbl treated nVHL rats. Cbl treatment also ameliorated dendritic pathology and neuronal loss in the PFC and NAcc in nVHL rats. Besides, cerebrolysin ameliorated alterations in levels of tyrosine hydroxylase in NAcc Shell in nVHL rats. This study demonstrates that Cbl promotes behavioral improvements and recovery of dendritic neuronal damage in postpubertal nVHL rats and suggests that Cbl may have neurotrophic effects in this neurodevelopmental model of schizophrenia. These findings support the possibility that Cbl has beneficial effects in the management of schizophrenia symptoms.

I. Introducción.

1.1 Fisiopatología de la esquizofrenia.

La esquizofrenia es uno de los problemas de salud mental más importantes en el mundo, debido a que afecta al 1% de la población mundial. Aproximadamente 10% de los pacientes que la padecen llegan a cometer suicidio por no recibir un tratamiento adecuado a tiempo (Andreasen, 2000). De acuerdo con los datos de la Secretaría de Salud, en México existen 1 millón de personas que padecen ésta enfermedad. La esquizofrenia es una enfermedad con una variedad de manifestaciones clínicas considerándose una patología emocional y cognitiva (Terenius, 2000).

Se han propuesto cuatro hipótesis para describir el origen de la esquizofrenia (Andreasen, 2000). La primera hipótesis considera la etiología de esta neuropatología como multifactorial, debido a que la esquizofrenia difiere de otras demencias porque no se asocia a cambios neuroanatómicos como la presencia de placas neurodegenerativas en la demencia senil de Alzheimer. Por lo que se sugiere que la fisiopatología y etiología están relacionadas con los procesos de maduración y desarrollo cerebral, dichos procesos ocurren en el humano hacia el segundo trimestre de gestación y hasta la etapa de adulto joven. La edad a la que normalmente se presentan los síntomas de la esquizofrenia es desde la pubertad y hasta los 28 años que corresponde a la etapa en la cual se alcanza la madurez cerebral. De aquí se deriva la segunda hipótesis la cual señala que la etiología de la esquizofrenia involucra el proceso del neurodesarrollo en los últimos estados del modelado cerebral y este proceso se da de manera dependiente de la actividad de los circuitos neuronales, por ejemplo por las experiencias psicológicas que afectan la plasticidad cerebral (Andreasen, 1997). Las anomalías en el sistema nervioso central (SNC) que se han identificado en la esquizofrenia con técnicas que van desde la neuropatología hasta la neuroimagen han incluido un amplio número de regiones del SNC entre las que se encuentran: la corteza frontal, la corteza temporal, el tálamo, el hipocampo, amígdala, ganglios basales y hasta el

cerebelo. Lo anterior indica que la etiología de esta enfermedad no está circunscrita a una sola región cerebral dando lugar a la tercera hipótesis que considera su origen en el desarrollo de las conexiones neuronales.

La esquizofrenia se caracteriza por presentar alteraciones en una variedad de funciones mentales, tales como la capacidad de pensar creativamente, de hacer uso correcto del lenguaje y de expresar claramente experiencias y emociones básicas. Los pacientes esquizofrénicos refieren alucinaciones y sentimientos de persecución. En general la sintomatología se divide en: síntomas positivos y síntomas negativos. Los cuatro síntomas positivos clásicos son alucinaciones, alteraciones en la percepción, anormalidades en el pensamiento inferencial e ideas delirantes. Mientras que en los síntomas negativos se encuentran el aislamiento social, la alogia, y la desorganización en el lenguaje. De tal manera que la cuarta hipótesis considera a la esquizofrenia como una alteración en el proceso mental, es decir, la incapacidad del paciente no sólo de realizar determinados procesos cognitivos sino incluso de estar consciente de los actos que se están realizando, por lo que la esquizofrenia es una patología en la cual se presentan alteraciones en los mecanismos de procesamiento de la información a nivel cerebral.

Se han propuesto otros factores que influyen en el desarrollo de esta enfermedad, tales como el entorno social, psicológico y nutricional. Los procesos inflamatorios de la madre durante la gestación pueden causar efectos tóxicos debidos a la producción de citocinas afectando el neurodesarrollo del feto, del mismo modo, las complicaciones durante el parto como sangrado, hipoxia, crecimiento anormal del feto y el nacimiento prematuro podrían desencadenar trastornos relacionados con la esquizofrenia (Cannon y cols., 2002).

La infección por retrovirus es otro factor que se ha relacionado con la esquizofrenia, en este sentido, se ha descrito recientemente la capacidad retroviral de transmitir secuencias genéticas que se integran en el genoma del huésped (De

Lisi, 2000; Yolken, 2000) y que junto a otros factores condicionan la expresión del cuadro. Se han identificado secuencias de retrovirus endógenos en tejido cerebral y líquido cefalorraquídeo de pacientes esquizofrénicos, estos hallazgos han dado lugar a la discusión sobre el papel de estos retrovirus endógenos en la fisiopatología de la esquizofrenia. Estos datos parecen ser consistentes con la idea de que en la esquizofrenia coexisten factores ambientales, de neurodesarrollo y genéticos.

En cuanto al curso clínico de la enfermedad, los varones esquizofrénicos tienen mayor número de síntomas positivos, un comienzo más temprano y un peor pronóstico de la enfermedad, mientras que las mujeres tienen una mejor competencia premórbida, más signos negativos y afectivos y cuentan con una mejor respuesta al tratamiento. Asimismo, el ambiente hormonal en el que crece y se desarrolla el cerebro pudiera ser también un factor fundamental en el momento de producir dimorfismos sexuales normales y, por lo tanto de modular alteraciones en el cerebro de pacientes esquizofrénicos (Greschwind y Galaburda, 1985).

La esquizofrenia es una de las enfermedades psiquiátricas que mayor interés científico y número de investigaciones ha generado. Se han llevado a cabo numerosos estudios para tratar de elucidar posibles anomalías estructurales y funcionales en el cerebro de los pacientes esquizofrénicos. Las alteraciones neuroanatómicas encontradas en los estudios de resonancia magnética realizados a pacientes esquizofrénicos incluyen dilatación ventricular, disminución en el volumen del lóbulo temporal medial (amígdala, hipocampo, y circunvolución parahipocámpica), anomalías en la circunvolución temporal superior, el lóbulo parietal (en particular el lóbulo parietal inferior y sus subdivisiones de la circunvolución angular y de la circunvolución supramarginal) y regiones cerebrales subcorticales incluyendo el cerebelo, los ganglios basales, el cuerpo calloso y el tálamo (Harrison y cols., 1999).

1.2 Sistema dopaminérgico.

La Dopamina (DA) es un importante neuromodulador catecolaminérgico, el cuál participa en una gran variedad de funciones como la actividad locomotora, cognición, emoción, regulación endocrina, entre otras. Los receptores dopaminérgicos se encuentran ampliamente distribuidos en diversas áreas del cerebro donde son responsables de las diversas acciones fisiológicas de la dopamina, que son mediados por al menos 5 subtipos de receptores acoplados a proteínas G (Missale y cols., 1998). El estudio de los sistemas y receptores dopaminérgicos del SNC ha generado gran interés, debido a que diversas alteraciones en la transmisión dopaminérgica se han relacionado, directa o indirectamente, con trastornos graves como la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia, así como con la adicción a drogas (Pierce y Kumaresan, 2006).

Se reconocen cinco sistemas o vías dopaminérgicas importantes en el cerebro. La primera vía, la cual se encuentra relacionada con la conducta es la *mesolímbica-mesocortical*, la cual se proyecta desde los cuerpos celulares cercanos a la sustancia nigra hasta el sistema límbico y la neocorteza. La segunda vía la *nigro estriada* consiste en neuronas que se proyectan desde la sustancia nigra hasta el núcleo caudado y putamen; está implicada en la coordinación de movimientos voluntarios. La tercera vía, la *tuberoinfundibular* es la que conecta al núcleo arcuato y las neuronas periventriculares con el hipotálamo y la hipófisis posterior; la dopamina liberada por estas neuronas inhibe fisiológicamente la secreción de prolactina. La cuarta vía dopaminérgica, la vía bulbar-periventricular, se compone de neuronas en el núcleo motor del vago, este sistema quizás este implicado en la conducta alimentaria. La quinta vía, la vía *incertohipotálamica* forma conexiones de la zona medial cercana al hipotálamo y a la amígdala. Esta última vía regula la fase anticipatoria de movimiento del comportamiento copulatorio en la ratas. (Carr y cols., 1999).

Basándose en criterios operacionales, transduccionales y estructurales se ha clasificado a la familia de los receptores dopaminérgicos en dos subgrupos: el grupo denominado D1, el cual contiene a los subtipos D₁ y D₅ (Zhou y cols., 1990) los cuales incrementan la producción de AMPc (Kebabian y Calne, 1979) y el grupo D2 que inhiben la producción del AMPc, el cual contiene a los subtipos D₂, D₃, y D₄ (Grandy y cols., 1989; 1991). Esta subdivisión también se basa en la ausencia de intrones en los genes para D₁ y D₅, y la presencia de intrones en los genes para D₂, D₃ y D₄ (Missale y cols., 1998).

La activación de los receptores D₁ conduce a la activación de proteínas G_s con la consecuente producción del segundo mensajero AMPc por estimulación de una o varias isoformas de la enzima adenilil ciclasa, localizada en la membrana celular (Kebabian y Calne, 1979). Se ha reportado también que en la corteza cerebral frontal la activación del receptor D₁ induce la producción de otros segundos mensajeros, el 1,4,5-trifosfato de inositol (IP3) y el diacilglicerol (DAG), por estimulación de una fosfolipasa C que cataliza la hidrólisis del 4,5-difosfato de fosfatidilinositol, lo cual induce un aumento de Ca²⁺ intracelular (Missale y cols., 1998). Asimismo, existen evidencias de que los receptores D₂ se encuentran acoplados a proteínas G_i, la activación del receptor conduce a la inhibición de la adenilil ciclasa y por tanto de la formación de AMPc. Los receptores D₂ pueden también modular corrientes iónicas, en particular las activadas por voltaje, inhibiendo canales de Ca²⁺ (Liu y cols., 1992) o facilitando la apertura de canales de K⁺ mediante proteínas G_o (Laitinen, 1993). Los receptores D₂ se encuentran ampliamente distribuidos en el tubérculo olfatorio y en el núcleo accumbens (Jackson y Westlind-Danielson, 1994).

Las proteínas transportadoras de la membrana celular constituyen el principal mecanismo para la terminación de la transmisión sináptica en el SNC. Una vez liberada al espacio sináptico la dopamina se une a receptores pre y postsinápticos. Aunque existen enzimas que la catabolizan como la monoamino-oxidasa (MAO) o la Catecol-o-metil-transferasa (COMT), la terminación del efecto del

neurotransmisor se debe principalmente a la recaptura del mismo por las propias terminales nerviosas que la liberaron. El transportador para dopamina pertenece a la familia de proteínas transportadoras que dependen de Na^+ y Cl^- , las cuales tienen 12 dominios transmembranales y que presentan varios sitios de fosforilación.

En estudios posmortem de pacientes esquizofrénicos, se ha encontrado que existe un aumento en la densidad de receptores D_2 en el estriado, así como un incremento de la concentración de dopamina, sin embargo se ha sugerido que este aumento en los receptores podría ser consecuencia del tratamiento con antipsicóticos. También se ha encontrado una disminución de los receptores D_1 en la corteza y un aumento de receptores D_3 , así como un polimorfismo de la COMT que la hace 4 veces más activa, lo que provoca una disminución de la concentración de dopamina en el espacio extracelular en la corteza (Laurelle y cols., 1999).

1.3 Sistema límbico y el hipocampo.

El sistema límbico tiene una enorme diversidad anatómica y funcional. Existen dos estructuras subcorticales clave, la formación hipocampal y la amígdala y cada una de ellas forma circuitos distintos con el resto del encéfalo. Los circuitos hipocámpicos son esenciales para consolidar la memoria a corto plazo en memoria a largo plazo y para la memoria espacial. Los circuitos de la amígdala intervienen básicamente en las emociones y en sus expresiones conductuales como la furia, así como en funciones viscerales y olfativas (Morgane y cols., 2005).

El hipocampo es una estructura ampliamente relacionada con varios núcleos del sistema nervioso central; entre estos se encuentran la corteza media prefrontal, núcleo accumbens, amígdala y área ventral tegmental (Grace, 2000) que en conjunto forman el sistema dopaminérgico mesolímbico, el cual está implicado en la regulación de las conductas motivadas (Vallone y cols., 2000).

Las áreas corticales límbicas incluyen: las circunvoluciones orbitales mediales del lóbulo frontal, la circunvolución del cíngulo en los lóbulos frontal y parietal, la circunvolución parahipocampal en el lóbulo y la corteza temporal. Las áreas corticales límbicas reciben conexiones de las áreas sensoriales de orden superior del lóbulo temporal, así como de la corteza de asociación prefrontal y el área parieto-témporo-occipital de asociación.

Por su parte, la formación hipocampal incluye tres divisiones citoarquitectónicamente distintas: la circunvolución dentada, el hipocampo y el subículo. Los trastornos de la memoria son una característica propia de las lesiones de la formación hipocampal. La corteza de asociación límbica proporciona la principal aportación a la formación hipocampal. La circunvolución dentada, el hipocampo y el subículo son regiones separadas que forman parte de una secuencia de conexiones intrínsecas de la formación hipocampal. El flujo de información que atraviesa la formación hipocampal es en gran parte unidireccional (Amaral, 1990).

Las eferencias hipocámpicas se originan en el subículo y el hipocampo, la circunvolución dentada sólo proyecta al hipocampo. Las proyecciones corticales procedentes del subículo terminan en la corteza entorrinal y, a partir de allí, la información se distribuye ampliamente por toda la corteza. Las proyecciones subcorticales atraviesan por todo el fórnix, el cual está formado por cuatro partes: fimbria, pilar, cuerpo y columna. La mayoría de los axones del fórnix son los de las células piramidales del subículo y el hipocampo. Estos axones recorren el fórnix postcomisural. La proyección al cuerpo mamilar forma parte del circuito de Papez, los cuerpos mamilares proyectan a través del tracto mamilotálamico y a los núcleos talámicos anteriores, los cuales a su vez proyectan a la circunvolución del cíngulo. El subículo proyecta también directamente a los núcleos talámicos anteriores. A través del fórnix precomisural, el hipocampo proyecta al núcleo septal lateral. El núcleo septal medial, que contiene neuronas GABAérgicas y

colinérgicas recibe inervaciones del núcleo septal lateral y proyecta de vuelta a la formación hipocámpica a través del fórnix (Duvernoy, 1988).

El hipocampo se puede dividir en tres regiones separadas, CA1, CA2 y CA3 basándose en el tamaño y las conexiones de las células piramidales que residen en ellas (Kandel, 2000).

Normalmente el sistema dopaminérgico mesolímbico está bajo control de la corteza, por lo que una alteración de los circuitos provoca muchos cambios en la actividad dopaminérgica después de que se ha alcanzado el estado crítico del desarrollo (Lipska y Weinberger, 1995). Debido a que el hipocampo ejerce un gran control modulador sobre la corteza prefrontal y núcleo accumbens (Grace, 2000), una disfunción de esta estructura produce alteraciones conductuales, pero el efecto es diferente en función del grado del neurodesarrollo en que la lesión ocurre (Grace, 2000).

Cuando se lesiona el hipocampo en ratas adultas, se producen alteraciones en los procesos de memoria y aprendizaje principalmente, en tanto que cuando la lesión ocurre en ratas neonatas se producen alteraciones en conductas relacionadas con el sistema dopaminérgico, estos hallazgos impiden explicar los cambios en términos de pérdida de neuronas hipocámpicas solamente (Lipska y Weinberger, 1995), por lo que el neurodesarrollo del cerebro debe ser una variable a considerar. En la rata una alteración durante el neurodesarrollo de la corteza temporo-límbica y su conectividad permanece silente con respecto a conductas relacionadas con la dopamina hasta después de un periodo considerable de desarrollo postnatal, en donde dramáticamente se afecta la reactividad de los sistemas dopaminérgicos del cerebro ante una variedad de estímulos ambientales (Weinberger y Lipska, 1995).

1.4 Corteza media prefrontal.

La corteza media prefrontal (CPFm) recibe proyecciones de todas las áreas sensoriales, además de la amígdala, corteza entorrinal y circunvolución del cíngulo (Barbas, 2000). Esta región, está relacionada con el control emocional inhibitor permitiendo el cambio de conducta en función del significado emocional de los estímulos, parece estar relacionada con la comunicación afectiva, como han mostrado los estudios en primates (MacLean, 1985).

En general se considera que la CPFm es una región relacionada tanto con la experiencia como con la expresión emocional, y es crítica para el procesamiento de emociones asociadas con situaciones sociales y personales complejas (Damasio, 1997). Se ha establecido una asociación directa entre la región prefrontal de la corteza cerebral y la emoción, la cual se ha sugerido que es debida a las conexiones eferentes glutamatérgicas que proyectan hacia el núcleo accumbens. La CPFm presenta inervaciones eferentes a estructuras viscero-motoras en el hipotálamo, así como proyecciones aferentes provenientes del tálamo mediodorsal y de la amígdala. En el área prefrontal de la corteza cerebral existe también una amplia innervación dopaminérgica proveniente del área ventral tegmental (Morgane y cols., 2005). La CPFm tiene 6 capas sucesivas de células de distintos tipos que cubre todas las circunvoluciones cerebrales (figura 2). La mayor parte de estas son células granulosas y células piramidales (Kandel, 2000; Rajarethnam y cols., 2001). Aunque las neuronas piramidales de la corteza prefrontal presentan una homogeneidad en su morfología, éstas tienen diferentes conexiones con diversas zonas del cerebro, muchas neuronas de la capa II y III envían proyecciones axonales hacia otras regiones corticales como la corteza del cíngulo, a la vez que recibe una importante inervación del tálamo dorsomedial; las neuronas de la capa V hacen lo propio enviando sus conexiones hacia las neuronas del estriado y la amígdala; finalmente las neuronas de la capa VI mandan conexiones hacia el tálamo (Lewis, 2003).

Se sabe que en los pacientes esquizofrénicos se encuentra disminuida la densidad de la población de las neuronas piramidales de la capa III, así como el volumen del soma en un 14 %. Esta alteración podría estar relacionada con la reducción del número de neuronas del tálamo dorsomedial que presenta conexiones aferentes hacia las dendritas basales de las neuronas piramidales de la capa III. Esto implica que la transmisión glutamatérgica se encuentra afectada en esta vía, por lo que estos cambios tienen una influencia sobre la deficiencia en la memoria y la fluidez del habla en los pacientes esquizofrénicos (Lewis y Glantz, 2003).

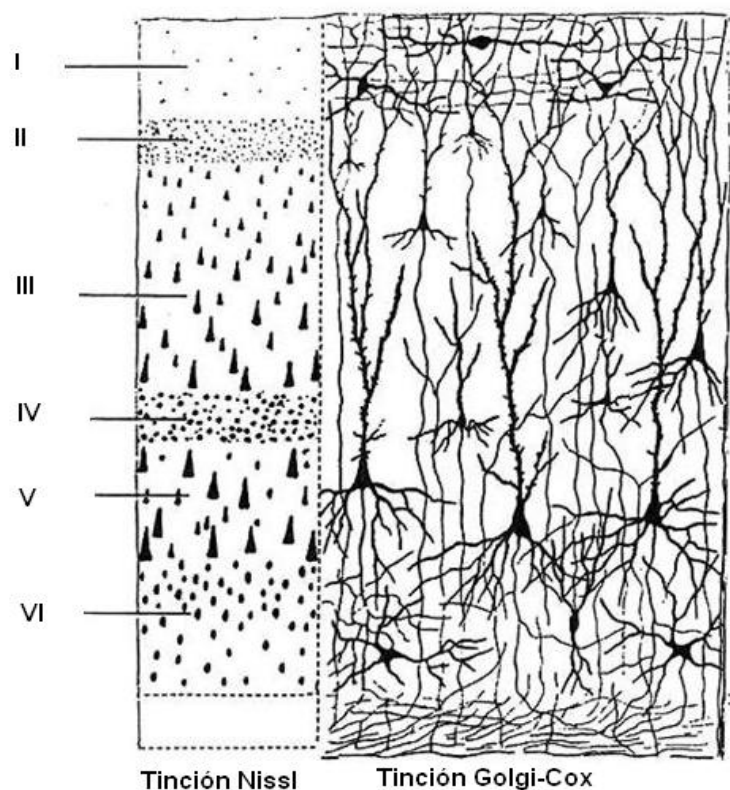


Figura 1. Capas de la corteza cerebral con tinción de Nissl y de Golgi-Cox. Capa I: molecular, capa II: granular externa, capa III: células piramidales externas, capa IV: granular internas, capa V: células piramidales internas, capa VI: polimorfa o de las células fusiformes. Esquema tomado del libro "Principios de Neurociencia" E. Kandel, 2000.

Las células piramidales de la CPF tienen un potencial de reposo bifásico con un estado muy negativo (estado bajo), que puede ser superado (aunque sin alcanzar el nivel de descarga) por la estimulación proveniente del área tegmental ventral (ATV) que induce un potencial de membrana superior (estado alto). El estado de

despolarización (estado alto) se mantiene probablemente, por la acción de la dopamina sobre los receptores D₁. El estado alto favorecería el mecanismo de potenciación a largo plazo (PLT), relacionado con mecanismos de neuroplasticidad, al mismo tiempo que se reduce el disparo de las neuronas prefrontales. La disminución de la actividad de las neuronas prefrontales se interpreta como un mecanismo de filtrado de la información irrelevante que favorece la atención en las tareas relevantes y motivadas (Lewis y O'Donnell, 2000). Algunos cambios en la función del sistema dopaminérgico en la CPF como la disminución de la densidad de receptores D₁ provocan alteraciones cognitivas como la falta de flexibilidad cognitiva y la dificultad para cambiar el foco de atención, las cuales están presentes en trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia.

1.5 Núcleo accumbens.

El núcleo accumbens (NAcc) pertenece al estriado ventral (Voorn y cols., 2005), este núcleo se ha involucrado en la integración entre motivación y acción motora conocida como interfase límbico-motora (Fernández Espejo, 2000), esto ha llevado a decir que la función neurobiológica del NAcc es transferir información motivacional relevante para que se realicen actos motores o, en otras palabras, reconocer situaciones de importancia adaptativa para que el animal desarrolle una conducta apropiada.

El NAcc posee dos territorios diferentes tanto en sus conexiones como neuroquímicamente: el núcleo y la corteza (Meredith y cols., 1995), la corteza presenta principalmente conexiones de carácter límbico como son las aferencias glutamatérgicas provenientes del hipocampo y la amígdala, así como una importante entrada dopaminérgica proveniente del área ventral tegmental (AVT), mientras que el núcleo que es una extensión del estriado dorsal, recibe aferencias glutamatérgicas de la CPF y dopaminérgicas de la sustancia nigra compacta (SNc), así también presenta conexiones gabaérgicas de salida hacia el pálido

ventral que forman parte de los circuitos motores cortico-estriado-pálido-talámicos de carácter extrapiramidal (Voorn y cols., 2005). Las tres grandes aferencias de la corteza del núcleo accumbens participan en distintos aspectos de evaluación de la situación ambiental. La CPF es clave en los procesos de atención, de evaluación cognitiva y de programación premotora, y constituye un área de alto grado de integración. La amígdala participa en la integración emocional y autónoma. El hipocampo desempeña una función de cartografía espacial de primer orden. La información electrofisiológica indica que la corteza del Nacc se activa cuando recibe información simultánea de todas las estructuras comentadas, lo que le otorgaría el papel de “situación de valor adaptativo” (Fernández Espejo, 2000).

Se sabe que existen tres grupos de neuronas en el estriado dorsal, las cuales son las neuronas espinosas medianas, las interneuronas gabaérgicas y las interneuronas colinérgicas; sin embargo, el 95 % de las neuronas del núcleo accumbens son neuronas espinosas medianas, las cuales presentan aferencias corticofrontales que se distribuyen en los extremos dendríticos mientras que las entradas hipocámpicas y amigdalinas se sitúan en los tallos proximales dendríticos. Estas neuronas presentan dos estados electrofisiológicos: alto y bajo. El estado bajo, muy hiperpolarizado (-81 mV) es interrumpido ocasionalmente por mesetas de despolarización de unos -63 mV con 3-4 espigas, (O'Donnell y Grace, 1995). El estado bajo, tiende a mantenerse debido a la apertura de los canales de potasio de rectificación hacia dentro, y la transición hacia el estado alto es abrupta, seguida de corrientes de entrada de sodio dependientes de voltaje, y corta, debido a la rápida activación de corrientes hiperpolarizantes de potasio tipo I_A (Grace, 1998). Estudios *in vivo* han demostrado que la dopamina mediante la acción de los receptores D_2 estabilizan a estas neuronas en estado bajo y aumentan el umbral para el disparo de potenciales de acción (O'Donnell y Grace, 1996). Por otra parte se ha establecido que los receptores D_1 en el accumbens son excitadores que actúan en coordinación con los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) del glutamato, pero sólo en condiciones de estado alto (Levine, 1996). Así, cuando la neurona se encuentra en estado bajo los receptores glutamatérgicos NMDA están

bloqueados por Mg^{+2} y no hay interacción D_1 -NMDA, por lo que predomina la acción dopaminérgica D_2 . Cuando la célula se sitúa en un estado alto por una despolarización mantenida, se remueve el bloqueo por Mg^{+2} y se activan los canales NMDA. De este modo, las respuestas despolarizantes de los canales NMDA se expresan y facilitan el disparo neuronal. En esta situación la dopamina actúa sobre receptores D_1 activando aún más la apertura de canales NMDA y la de canales de Ca^{+2} tipo L lo que mantiene la excitación de las neuronas (Hernández-López, 1997).

Existen dos importantes subsistemas colinérgicos ubicados en el telencéfalo, uno de estos presenta conexiones hacia varios núcleos basales así como también a la corteza y el hipocampo. El segundo subsistema se encuentra en el estriado que a diferencia de las otras neuronas colinérgicas, son interneuronas que proveen una importante inervación local. Las interneuronas colinérgicas conforman del 1% al 3% de la población neuronal del estriado, esto es, por cada 100 neuronas espinosas medianas que se encuentra en el estriado existe una interneurona colinérgica (Graveland y Difriglia, 1985).

Las interneuronas colinérgicas son típicamente multipolares, poseen somas con morfología oval o fusiforme, los cuales van de 20 μm a 40 μm de diámetro y presentan poca densidad de espinas dendríticas. Estas interneuronas son tónicamente activas, por lo que se ha sugerido que dicha característica es debida a potenciales postsinápticos provenientes de la vía tálamo-estriatal que inervan a las dendritas más proximales. Además, las interneuronas colinérgicas presentan receptores D_2 y D_5 , de tal modo que los receptores D_5 se encuentran principalmente en áreas somatodendríticas y la activación de estos receptores induce a una despolarización de la membrana celular, lo que desencadena la liberación de acetilcolina, mientras que los receptores D_2 inhiben a los canales de Ca^{2+} tipo N, con lo que disminuye la liberación de acetilcolina (Zhou y cols., 2002).

Por otro lado, las proyecciones dopaminérgicas provenientes del ATV tienen receptores nicotínicos, los cuales al ser activados aumentan la entrada de Ca^{+2} a la célula promoviendo una excitabilidad de ésta, de tal manera que si se inhibe la liberación de acetilcolina en esta zona se inhibe también la liberación de dopamina. En el estriado, los receptores nicotínicos se encuentran en las interneuronas gabaérgicas provocando una despolarización y liberación de GABA, el cual ejerce un efecto inhibitorio sobre las neuronas espinosas medianas y las interneuronas colinérgicas (Zhou y cols., 2001).

Los pacientes con esquizofrenia presentan anomalías en la transmisión colinérgica, en estudios postmortem se observó que en el cerebro de los pacientes esquizofrénicos se encuentra un número mayor de neuronas colinérgicas a nivel de la formación reticular así como una disminución en el tamaño normal de las neuronas en el locus-coeruleus en comparación con cerebros normales (Durany, 2000). El estado de hiperactividad colinérgica que se presenta en la esquizofrenia parece ser el responsable al menos en parte, de los síntomas de la enfermedad, en especial de los síntomas negativos, en tanto la hipoactividad colinérgica es considerada parte de fisiopatología de los síntomas positivos de la esquizofrenia, esto se produce por un predominio de la actividad dopaminérgica por encima de la actividad colinérgica (Tracy y Monaco, 2001).

1.6 Amígdala.

El complejo amigdalino pertenece al sistema límbico y constituye un grupo heterogéneo de núcleos en cuanto a la citoarquitectura y conexiones se refiere, el complejo amigdalino está situado en el lóbulo temporal, por lo que la región que Burdach llamó amígdala a principios del siglo XIX, hoy se sabe gracias al desarrollo de las técnicas histológicas que esa zona corresponde a lo que se conoce como amígdala basolateral (Pitkanen y cols., 1997, 2003). Estudios anatómicos sugieren que la amígdala consiste de dos estructuras separadas, por un lado está la amígdala basolateral que incluye los núcleos lateral, basolateral,

basomedial y cortical, los cuales están relacionados principalmente con la corteza cerebral mediante inervaciones glutamatérgicas (Sah y López de Armentia, 2003) y por otra parte esta la zona centromedial que mantiene conexiones gabaérgicas con el estriado (McDonald, 2003). Desde un punto de vista funcional, se considera que es una estructura clave en el procesamiento emocional (Swanson, 2003). Por otro lado, también se ha sugerido que la amígdala está relacionada con los aprendizajes emocionales y con el almacenamiento de memorias afectivas. De igual forma, la amígdala participa como un componente crítico de un sistema modulador de la memoria (Torras y cols., 2001).

Se sabe que el complejo amigdalino está implicado en la patología de la esquizofrenia. Los cambios estructurales y funcionales que tienen lugar en el complejo amigdalino han sido demostrados en numerosos estudios de neuroimagen. La mayoría de estos estudios concluyen que hay una reducción del volumen de esta estructura subcortical en pacientes esquizofrénicos comparados con individuos sanos.

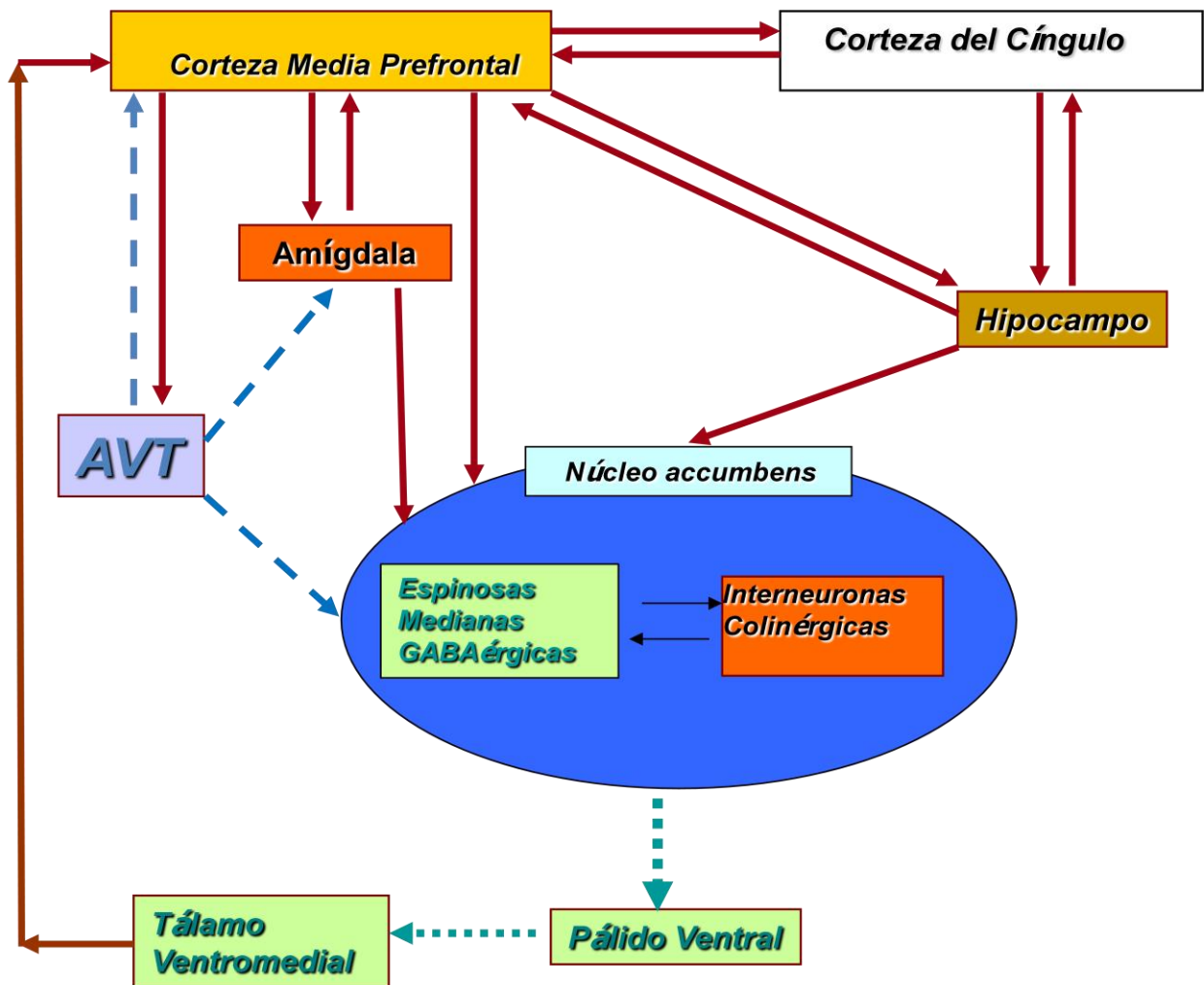
Borgets realizó en 1993, una serie de estudios neuroanatómicos en cerebros posmortem, donde encontró algunas diferencias en estructuras límbicas entre ellas incluía el complejo amigdalino. Las alteraciones citoarquitectónicas y la falta de gliosis en dichas estructuras límbicas, así como la ausencia de la normal asimetría estructural del cerebro en una proporción sustancial de pacientes, indican que estas anomalías estructurales pudieran reflejar una alteración prenatal en el desarrollo del cerebro. Otros estudios de resonancia magnética en individuos esquizofrénicos (tanto hombres como mujeres), demostraron una disminución bilateral del volumen amigdalino en varones pero no en mujeres, donde la reducción fue sólo en el hemisferio derecho (Niu y cols., 2004).

La amígdala basolateral recibe información desde el tálamo, la corteza prefrontal, la circunvolución del cíngulo, el hipocampo y la corteza de la ínsula (McDonald, 2003). Estas fibras suministran una amplia gama de información somatosensorial,

visual y visceral al complejo amigdalino. El grupo centromedial recibe información olfativa, fibras desde el hipotálamo, y desde los núcleos dorsomedial y medial del tálamo. Además de recibir información ascendente del tallo cerebral que participan en funciones viscerales (Price, 2003).

Por otro lado, las vías eferentes principales del complejo amigdalino son la estría terminal y la vía amigdalofugal. La estría terminal es un haz de fibras que tiene por objeto llevar información a distintas zonas encefálicas entre las que destacan los núcleos del hipotálamo (núcleos preópticos, ventromedial, anterior y área hipotalámica lateral) el núcleo accumbens (NAcc) y los núcleos septales, y el caudado putamen. Esta vía tiene su origen en el grupo celular corticomedial (McDonald, 2003). La vía amigdalofugal es el principal haz de fibras eferentes del complejo amigdalino. Este haz presenta la peculiaridad de que las distintas fibras tendrán un destino diferente según el núcleo o grupo nuclear de donde se hayan originado. Así pues, los axones que provienen en su mayor parte de las células del grupo basolateral (figura 1) adoptarán una dirección hacia el hipotálamo, el tálamo dorsomedial y los núcleos septales, mientras que las fibras originadas en el núcleo central, girarán en sentido caudal, para descender de manera difusa por el tronco encefálico y terminar en los núcleos viscerales (motor dorsal del vago), núcleo de rafe (magno oscuro y pálido) y otras áreas como en locus coeruleus. Asimismo, las neuronas basolaterales también proyectan hacia la corteza prefrontal, a la corteza del cíngulo y a la temporal inferior. Se ha sugerido que la función de estas fibras sería la activación de la corteza cerebral como respuesta a estímulos importantes desde el punto de vista conductual (Swanson y Petrovich, 1998).

Cabe destacar que, si bien la mayoría de las conexiones extrínsecas del complejo amigdalino son recíprocas, existen tres excepciones importantes: estriado, tálamo y ciertas áreas corticales que reciben abundantes proyecciones amigdalinas pero no las devuelven.



Glutamatérgica →

Dopaminérgica —▶

GABAérgica ...▶

Figura 2. Diagrama de las conexiones glutamatérgicas, dopaminérgicas y GABAérgicas de las regiones que conforman al sistema límbico. Tomado de O'Donell y cols. 1996 y Lipska y cols. 2000)

1.7 Modelo de lesión excitotóxica del hipocampo ventral (LNHV).

La lesión neonatal de hipocampo ventral ha sido una herramienta recientemente utilizada para producir alteraciones en el desarrollo de circuitos corticales y subcorticales en los cuales el hipocampo participa, lo que ha permitido entender una pequeña parte de las funciones del hipocampo en el adulto (Lipska y Weinberger, 2000). Asimismo, recientemente se ha postulado que las alteraciones durante el neurodesarrollo, impiden que las neuronas alcancen sus células blanco apropiadas, que se coloquen en sitios adecuados y que realicen conexiones apropiadas (Rakic, 1988; Schneider, 1981). En algunas enfermedades psiquiátricas se han observado alteraciones neuronales como, la orientación anormal, y un decremento en la densidad neuronal (Altshuler y cols., 1987; Akbarian y cols., 1993); estas alteraciones se han relacionado con circuitos aberrantes producidos durante el desarrollo.

Debido a que la lesión neonatal de hipocampo ventral se realiza en una etapa crítica del neurodesarrollo, se sabe que este daño induce a alteraciones conductuales a edad postpúber, las cuales se encuentran relacionadas con algunos síntomas expresados en la adolescencia en pacientes esquizofrénicos. Por ejemplo, los animales con lesión neonatal de hipocampo ventral a edad postpúber expresan anormalidades tales como hipersensibilidad al estrés, disminución en la interacción social, aumento en la actividad locomotora en ambiente novedoso y deficiencias en el aprendizaje y memoria (Flores y cols., 1996; Silva-Gómez y cols., 2003). Cabe señalar que estos cambios no se presentan a edad prepúber, por lo que estas alteraciones se han relacionado con cambios morfológicos en las neuronas piramidales de la corteza prefrontal y las neuronas espinosas medianas del núcleo accumbens que se expresan en las últimas etapas del desarrollo neuronal en la rata (Flores y cols., 2005a).

De igual forma se ha determinado que las ratas con lesión de hipocampo ventral a edad postpúber expresan un incremento de la actividad locomotora posterior a la administración de anfetamina, así como una disminución de la inhibición de

prepulso. Estas alteraciones han sido relacionadas con la transmisión dopaminérgica en el núcleo accumbens, debido a que las neuronas del Nacc muestran una mayor excitabilidad propiciada por la estimulación de las neuronas del área ventral tegmental (AVT) (Goto y O'Donnell, 2004).

Se sabe que este modelo animal de neurodesarrollo induce una disminución en la longitud y densidad de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la capa III de la corteza media prefrontal, así como también en la densidad de espinas dendríticas de las neuronas espinosas medianas del Nacc. Estos cambios han sido relacionados con la pérdida de la excitabilidad glutamatérgica proveniente de las neuronas del área CA1 del hipocampo ventral debido a que el crecimiento dendrítico de ambas regiones está relacionado con el grado de conectividad y la actividad aferente proveniente del hipocampo (McAllister, 2000). Así mismo se sabe que las neurotrofinas tienen una función transcendental el crecimiento dendrítico, por lo que estudios en animales con LNHV han mostrado una disminución en los niveles del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la corteza prefrontal (Molteni y cols., 2001).

Por otro lado, previamente se observó que la lesión neonatal de hipocampo ventral produce cambios relacionados con hiperactividad dopaminérgica después de la pubertad y que se atenúa mediante el uso de neurolépticos (Lipska y Weinberger, 1994; Sams-Dood y Cols., 1997).

La lesión del hipocampo ventral de rata adulta produce un incremento en el contenido de dopamina en el núcleo accumbens, así como un decremento en la actividad de este neurotransmisor en la corteza media prefrontal, esta regulación parece relacionar de manera negativa la actividad dopaminérgica entre ambas zonas cerebrales, de modo que un decremento en la actividad dopaminérgica en la corteza media prefrontal se relaciona con un incremento de ella en el núcleo accumbens. Estos datos correlacionan con el hecho de que en la esquizofrenia se presentan anormalidades estructurales en el hipocampo, así como disfunción

prefrontocortical y alteraciones en la función dopaminérgica del sistema mesolímbico (Brake y cols., 1999; Flores y cols., 2001; Lipska y cols., 2000, Schwartz y Cols. 2000).

A continuación se presentan algunas alteraciones fisiológicas y conductuales en la lesión neonatal de hipocampo ventral relacionadas con los cambios expresados por la sintomatología de los pacientes esquizofrénicos.

Tabla 1. Aspectos comparativos del modelo de lesión neonatal en hipocampo ventral con los signos y síntomas de la esquizofrenia.

	Modelo de lesión en HV	Esquizofrenia
Cambios conductuales	• Hiperlocomoción al estrés • Déficit al IPP • Déficit al IL • Déficit en pruebas de alternaciones retardadas • Reducción en contactos sociales	• Vulnerabilidad al estrés. • Déficit al IPP. • Déficit al IL. • Déficit en la memoria de trabajo. • Aislamiento social.
Respuesta farmacológica	• Hiperactividad inducida por anfetamina. • Estereotipias inducidas por apomorfina. • Reduce la catalepsia a haloperidol. • Hiperactividad inducida por MK-801 y PCP.	• Incremento de síntomas por agonistas dopaminérgicos. • Tolerancia a los neurolepticos. • Incremento de síntomas por ketamina.
Cambios moleculares en la corteza prefrontal	↓ Niveles NAA RNAm GAD67 RNAm FNDC	↓ Niveles NAA RNAm GAD67 RNAm FNDC

Abreviaturas: FNDC, factor neurotrófico derivado del cerebro; GAD67, glutamato descarboxilasa-67; IL, inhibición latente; NAA, N-acetilaspártato; PCP, fenciclidina; IPP inhibición del prepulso. (Tomada de Lipska y Weinberger, 2000)

Alteraciones conductuales del modelo LNHV

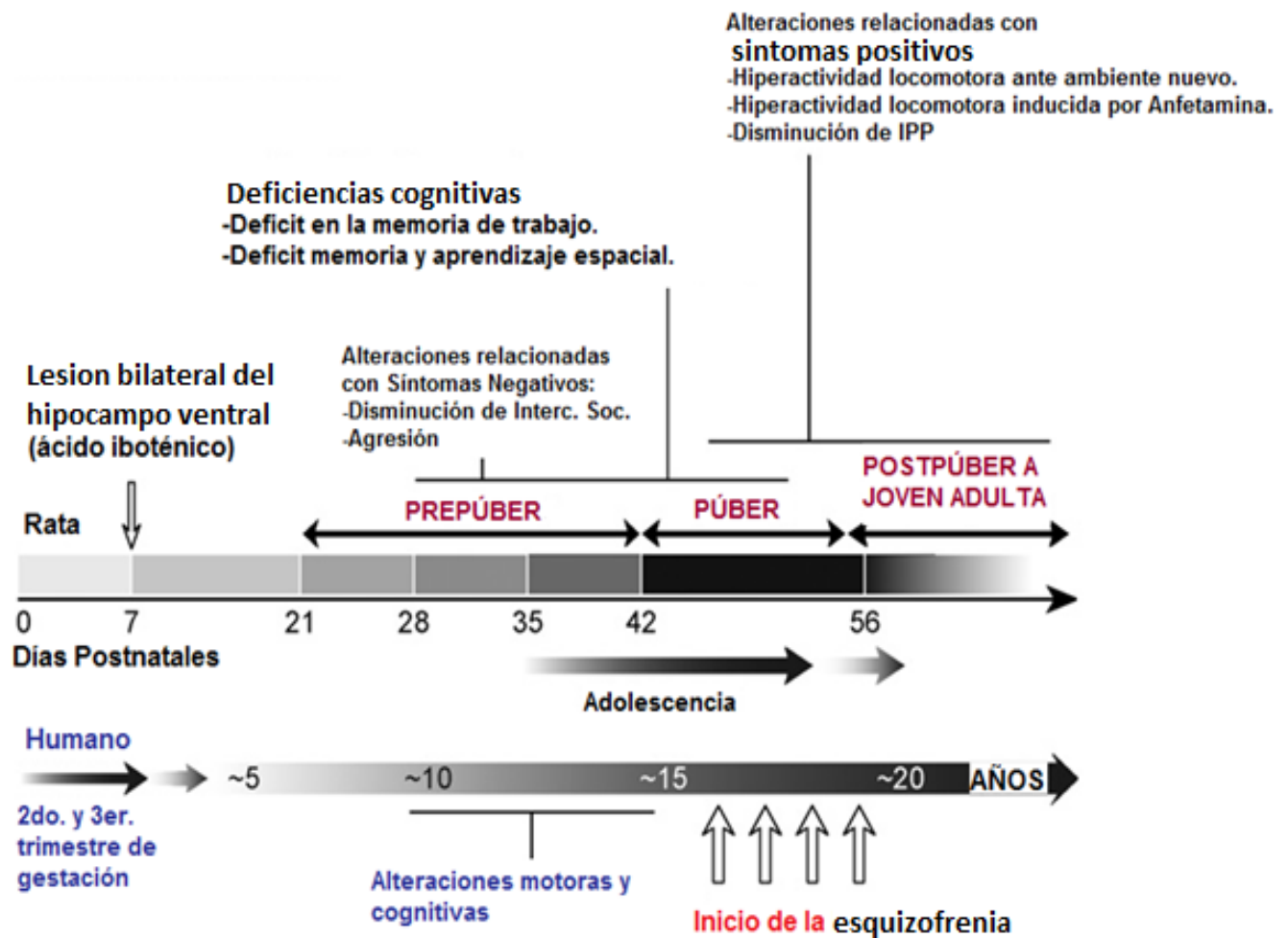


Figura 3. Comparación temporal de las alteraciones conductuales descritas en el modelo neonatal de Lesión Bilateral del hipocampo ventral con la sintomatología presentada en pacientes esquizofrénicos. Modificada de Tseng y cols., 2009.

1.8 Cerebrolisina.

La cerebrolisina es un factor con actividad neurotrófica y neuroprotectora que induce diferenciación neuronal y mantiene la integridad de las células nerviosas. La cerebrolisina es un producto a base de neuropéptidos que ejercen una actividad similar a la de los factores neurotróficos endógenos. Estudios experimentales han demostrado efectos positivos de la cerebrolisina sobre patologías neuroinflamatorias relacionadas con el amiloide β , la proteína tau, los factores neurotróficos, el estrés oxidativo, la excitotoxicidad, la neurotransmisión, el metabolismo cerebral, la neuroplasticidad, la apoptosis neuronal, la degeneración, la neurogénesis y la función cognitiva. Estos efectos de la cerebrolisina sobre los fenómenos patogénicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer indican un mecanismo de acción neurotrófico que puede implicar la activación de las vías señalizadoras intracelulares de PI3K/Akt/GSK-3 β . (Álvarez y Fuentes 2011).

La cerebrolisina facilita la actividad neurotrófica elevando los niveles del factor de crecimiento transformador β (TNF- β) y del factor neurotrófico derivado del cerebro lo que permite el mejoramiento de la capacidad cognitiva en algunas enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Masliah y cols., 1999), este nuevo medicamento potencia la actividad alfa en el cerebro y reduce la frecuencia de las ondas delta, por lo que esto sugiere que la cerebrolisina estimula los mecanismos relacionados con los procesos de atención y memoria. Se ha demostrado que la cerebrolisina disminuye la producción del precursor de la proteína amiloide responsable de la enfermedad de Alzheimer, impidiendo la formación de los depósitos de la proteína beta amiloide (Rokenstein y col. 2006).

Se ha observado que la administración de cerebrolisina a una dosis de 5 veces por semana durante un mes por vía intravenosa en pacientes con Alzheimer induce actividad neurotrófica que permite una mejoría en las funciones cognitivas de estos pacientes (Álvarez y cols., 2006)

En niños con autismo se ha utilizado una terapia con cerebrolisina en donde se observó una mejoría en los síntomas de esta enfermedad en el 89% de los niños tratados, el fármaco fue aplicado por vía intramuscular cada tercer día, en cada aplicación se les administró 0.5 g/kg de cerebrolisina, el tratamiento tuvo una duración de 1 año (Radzivil y Bashina 2006)

Aunque se sabe que la cerebrolisina tiene efectos positivos sobre la memoria, el aprendizaje y la regeneración neuronal, no se conoce el mecanismo por el cual actúa, sin embargo se ha demostrado una disminución en la lipoperoxidación los bajo condiciones de estres como la isquemia, hipoxia o la acidosis metabólica, asi como alteraciones metabólicas como en la diabetes mellitus. En estudios *in vitro* se ha demostrado que la cerebrolisina aumenta la cantidad de transportadores de glucosa (GLUT-1) en la barrera hematoencéfalica (Boado, 1995).

II. Justificación

Estudios neurobiológicos recientes en pacientes esquizofrénicos han demostrado la presencia de anormalidades en estructuras límbico-corticales, las cuáles producen la sintomatología característica de esta enfermedad.

El modelo de lesión neonatal del hipocampo ventral en ratas expresa algunas alteraciones conductuales y morfológicas relacionadas con la esquizofrenia. Por lo que ha sido un modelo animal ampliamente utilizado para el estudio de dicha patología.

Debido a los efectos neurotróficos mostrados por la cerebrolisina, resulta de gran interés evaluar el efecto de este medicamento sobre algunas alteraciones conductuales y morfológicas propias del modelo animal, con la finalidad de proponer el uso de este medicamento como una posible terapia para pacientes esquizofrénicos.

III. Hipótesis.

La administración subcrónica de la cerebrolisina puede revertir las alteraciones morfológicas conductuales ocasionadas por la lesión neonatal del hipocampo ventral.

IV. Objetivos.

4.1 Objetivo general.

Determinar el efecto de la administración de la cerebrolisina sobre las alteraciones morfológicas y conductuales ocasionadas por la lesión neonatal del hipocampo ventral.

4.2 Objetivos específicos.

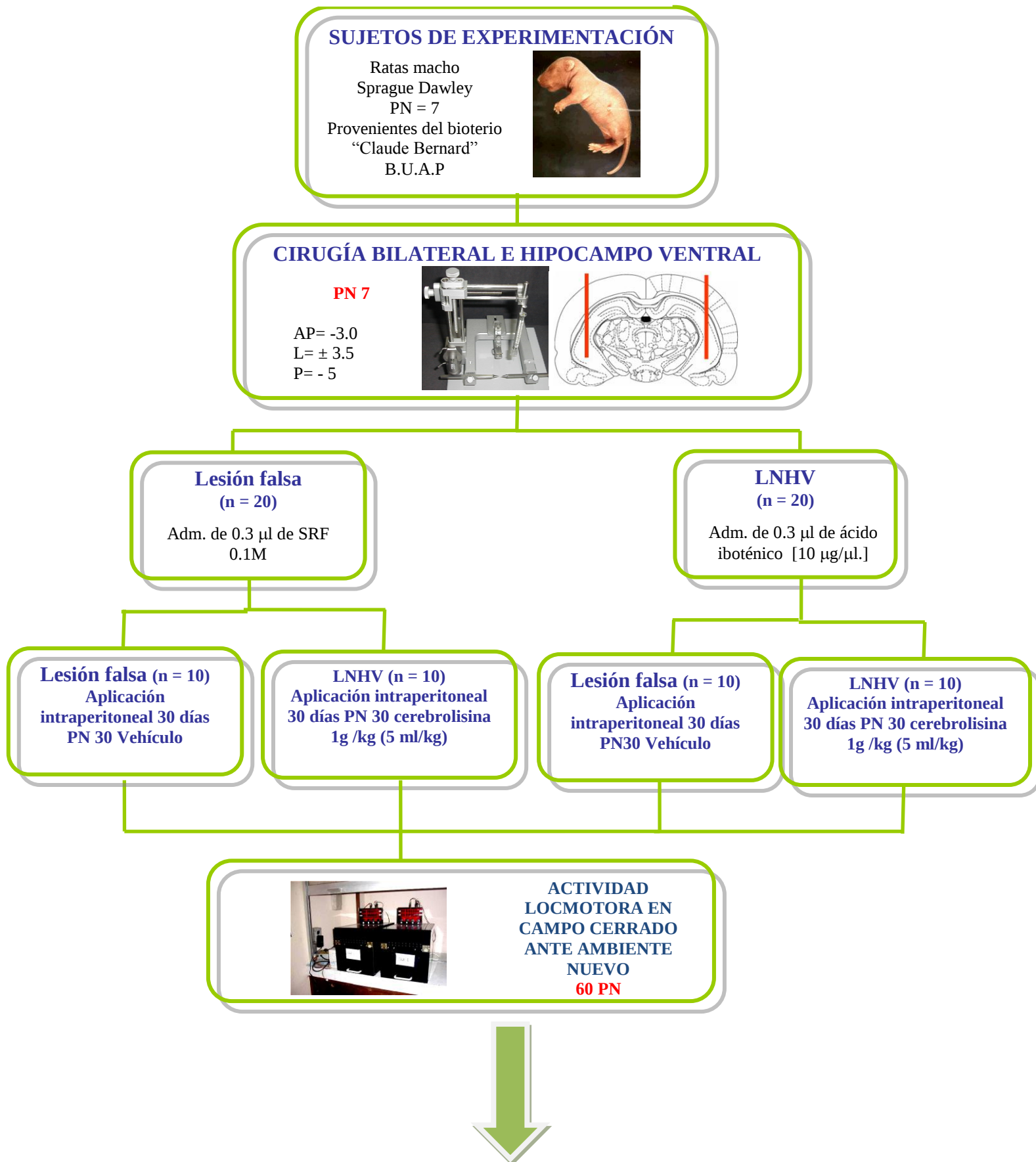
- Evaluar el efecto de la administración subcrónica de la cerebrolisina en ratas con lesión neonatal de hipocampo ventral a edad postpúber sobre:
 - a) La hipersensibilidad al estrés ante ambiente novedoso.
 - b) La capacidad de filtración de la información sensorial-motora.
 - c) La interacción social.

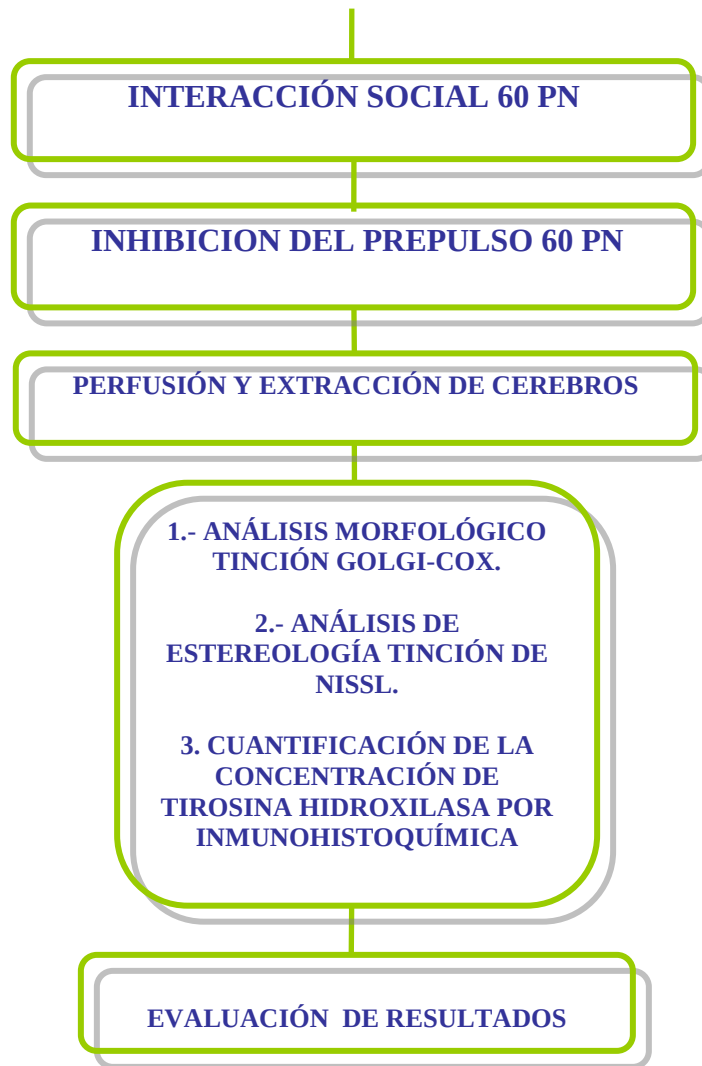
- Evaluar el efecto de la administración subcrónica de la cerebrolisina en ratas con lesión neonatal de hipocampo ventral a edad postpúber en la morfología de:
 - a. Las neuronas piramidales de la corteza media prefrontal capa III y V.
 - b. Las neuronas piramidales de la amígdala basolateral.
 - c. Las neuronas espinosas medianas del núcleo accumbens y caudado putamen.

- Evaluar el efecto de la administración subcrónica de la cerebrolisina en ratas con lesión neonatal de hipocampo ventral a edad postpúber en la densidad neuronal de: corteza media prefrontal, núcleo accumbens coraza, núcleo accumbens centro, caudado putamen y amígdala basolateral.
- Evaluar el efecto de la administración subcrónica de cerebrolisina en ratas con lesión neonatal de hipocampo ventral a edad postpúber sobre la concentración de tirosina hidroxilasa en el núcleo accumbens coraza, núcleo accumbens centro, caudado putamen.

V. Metodología.

5.1 Diagrama de trabajo.





5.2 Protocolo de lesión del hipocampo ventral.

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley provenientes del bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla de 7 días de edad y con un peso entre 15 y 18 g. Se separaron al azar en dos grupos:

- a) Falsa lesión
- b) Lesión excitotóxica neonatal de hipocampo ventral (LNHV).

Las ratas se anestesiaron por hipotermia (Lipska y Weinberger, 1993), y fueron fijadas en un aparato estereotáxico mediante un adaptador para ratas neonatas. Las coordenadas que se utilizaron para lesionar la zona del hipocampo ventral son (Paxinos y Watson 1986):

Antero-posterior – 3.0 mm respecto a Bregma.

Lateral +/- 3.5 mm respecto a Bregma.

Profundidad – 5 mm de la duramadre.

Se realizó una trepanación con diámetro de 1 mm utilizando las coordenadas correspondientes. Se utilizó una cánula de acero inoxidable de calibre 26 por la cual se administró bilateralmente al hipocampo ventral, en caso de lesión, 0.3 μ l de ácido iboténico a una concentración de 10 μ g/ μ L disuelto en una solución de fosfatos 0.1 M y ajustada a un pH de 7.4.

Para realizar la lesión simulada se aplicó el mismo protocolo con la diferencia de que sólo se administró solución amortiguada de fosfatos que se utilizó como vehículo en el caso de la lesión. En ambos casos la aplicación se realizó durante un periodo de 2 minutos; la cánula se dejó por un periodo de 3 minutos más antes de removerla, para permitir la difusión de la droga o el vehículo.

Al término de la cirugía se suturó la herida con 4 puntos (hilo 000) y se procedió a marcar con tinta china intradérmicamente a los animales de acuerdo a la lesión y posteriormente fueron puestos sobre una bolsa térmica hasta su recuperación.

Una vez finalizada la cirugía, las ratas neonatas fueron regresadas al bioterio con sus respectivas madres para la continuación de su desarrollo. Todas las ratas fueron mantenidas en condiciones de bioterio (ciclo luz y oscuridad de 12 h por 12 h y temperatura de 23 a 24 °C con una humedad del 50 al 60% así como acceso libre a alimento y agua).

5.3 Administración de cerebrolisina.

Después de llevar a cabo la cirugía para inducir la lesión del hipocampo ventral y una vez que las ratas cumplieron 30 días de edad, se formaron 4 grupos de 10 ratas a las cuales se les aplicó durante 30 días cerebrolisina a una dosis de 1g/kg, lo que equivale a 1 g/kg o bien el vehículo (agua inyectable) correspondiente, de la siguiente manera:

- Grupo 1: Ratas con lesión neonatal de hipocampo ventral + administración de cerebrolisina.
- Grupo 2: Ratas con lesión falsa + administración de vehículo.
- Grupo 3: Ratas con lesión neonatal de hipocampo ventral + administración de vehículo.
- Grupo 4: Ratas con lesión falsa + administración de cerebrolisina.

Posteriormente una vez concluido el tiempo de administración del fármaco, las ratas que conformaran a los 4 diferentes grupos fueron sometidas a las pruebas de conductuales de interacción social y de actividad locomotora.

5.4 Estudios conductuales.

Dado que la conducta forma parte del complicado proceso de adaptación del estado interno del individuo a su ambiente, la información que emerge de los estudios conductuales permite detectar los trastornos involucrados en determinados procesos neurológicos. Para verificar la hipótesis planteada en este proyecto se realizaron los estudios conductuales que a continuación se describen.

5.5 Protocolo de actividad locomotora.

Se ha elegido evaluar la actividad locomotora ante ambiente novedoso ya que en esta prueba conductual se han reportado alteraciones específicas producidas por la lesión neonatal del hipocampo ventral, por lo que se considera una variable para saber si ha sido exitosa la lesión en cada animal. A partir de los 60 días de edad y una vez concluido el tiempo de administración del fármaco, 10 ratas de cada grupo fueron sometidas a las pruebas de actividad locomotora.

Esta prueba se realizó en el laboratorio neuropsiquiatría del Instituto, en el área específica para este fin, las ratas permanecieron en el área durante 30 minutos, este tiempo permite la adaptación al laboratorio.

Las ratas fueron colocadas en cajas de acrílico de 44 cm de largo por 22 cm de ancho y 22 cm de altura, estas cajas tienen instalados 8 pares de fotodiodos en las paredes laterales, de tal forma que el movimiento de la rata interrumpe la trayectoria de un haz de luz infrarroja, imperceptible para ella, registrando dicha interrupción como un movimiento. La cuenta de los desplazamientos se realizó utilizando un contador computarizado que permite registrar el número de movimientos de los animales en doce intervalos sucesivos de diez minutos cada uno, de modo que el registro de actividad locomotora tiene la duración de dos horas (Flores y cols., 1996a).

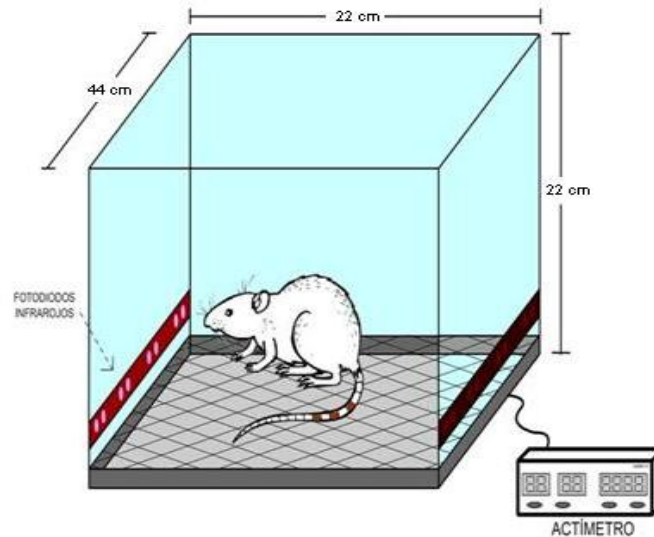


Figura 4. Esquematzación de las dimensiones del equipo de medición de la actividad motora.

5.6 Protocolo de Interacción social.

Las ratas son animales sociales que viven en grupos, el paso de la etapa prepúber a la pubertad es un periodo crítico para establecer una organización social en un grupo. El aislamiento social produce un síndrome característico previo a la aparición de síntomas de la esquizofrenia. Estas alteraciones conductuales estan implicadas en particular con cambios en el sistema mesolímbico dopaminérgico (Silva-Gomez y cols., 2003b).

En la edad postpúber (60 días de edad) las ratas fueon trasladadas al *Laboratorio de Neuropsiquiatría del Instituto de Fisiología* en un cuarto aislado de sonido, las ratas permanecieron en el área durante 30 minutos, este tiempo les permitió adaptarse a las condiciones del laboratorio. Las pruebas se llevaron a cabo con control de temperatura (21 a 24 °C) iniciando a las 08:00 hrs y finalizando a las 12:00 hrs.

El área de prueba consistió en una caja de madera de color negro (80cm x 80cm x 80cm). Una videocámara fue colocada en el techo del cuarto de experimentos para grabar las conductas de los animales. La iluminación en el cuarto fue de 30 lux con una tonalidad naranja.

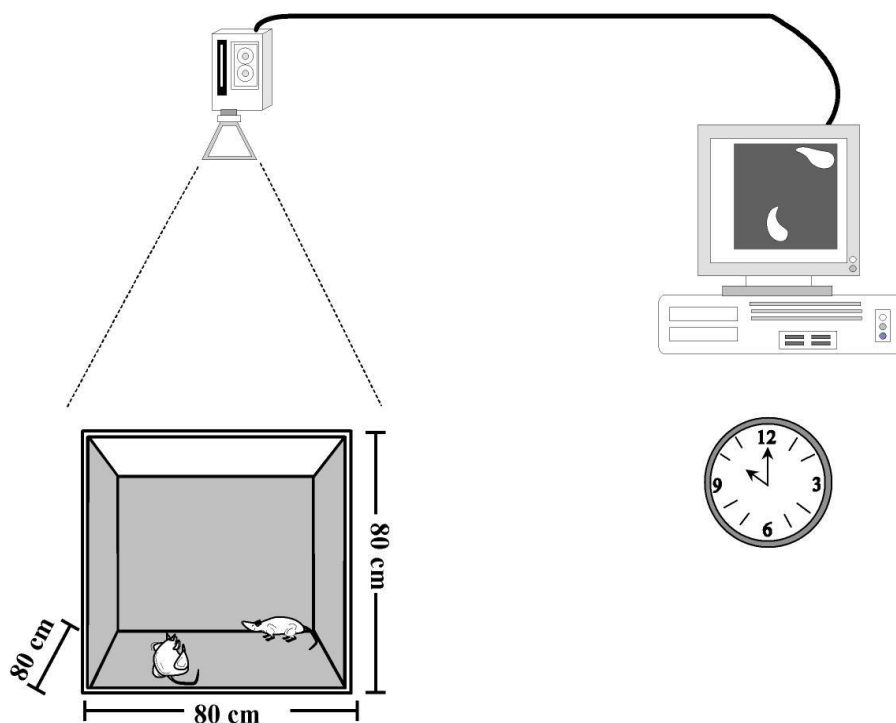


Figura 5. Esquematzación de la vista frontal del registro de interacción social en campo abierto.

Las ratas con lesión neonatal de hipocampo ventral administradas con cerebrolisina y con vehículo, así como los grupos controles fueron colocadas en parejas del mismo grupo experimental por caja, estas cajas se colocaron juntas en un estante de madera en donde el contacto olfatorio y auditivo se mantuvo. Entre cada evaluación, el área de prueba se limpió y secó. La prueba consistió en confrontar ratas que nunca tuvieron contacto por 10 min en cuatro periodos (se utilizaron a las mismas ratas en las cuatro sesiones), el tiempo de la interacción social fue cuantificado, frecuencias de contactos y tiempo acumulado de contactos, se tomaron todos los contactos no agresivos (olfateo ano-genital, acicalamiento, juego social, etc.) y agresivos (pateo, boxeo, aislamiento social, acicalamiento agresivo, mordeduras, etc.).

5.7 Inhibición por prepulso sobre la respuesta de sobresalto (PPI).

La respuesta de sobresalto en la rata es una contracción coordinada de la musculatura esquelética en respuesta a un estímulo auditivo elevado. La inhibición del prepulso representa una atenuación normal de la respuesta de sobresalto. Se produce por la presentación de un preestímulo débil (prepulso) antes del estímulo que induce la respuesta de sobresalto. Se piensa que el prepulso refleja la función del sistema de atención sensorial, donde el prepulso ejerce una influencia inhibitoria hasta que éste es procesado totalmente, por tanto, protege al organismo contra una sobrecarga de información sensorial (Buckland y cols., 1969).

La inhibición por prepulso de la respuesta de sobresalto es una herramienta conductual utilizada para el estudio de los procesos sensoriales y motores en humanos y ratas. Los pacientes esquizofrénicos muestran una deficiencia en esta prueba, debido a que dichos pacientes se sobrecargan de información, lo que impide que muestren una respuesta adecuada (Braff y Geyer, 1990).

Los modelos animales de alteraciones en el neurodesarrollo relacionados con la esquizofrenia sugieren que el daño en estructuras límbicas a edad temprana inducen deficiencias en las conexiones neuronales de áreas importantes como son: el hipocampo, la amígdala, el núcleo accumbens y la corteza media prefrontal, provocando alteraciones conductuales como es la inhibición del prepulso (Daenen y cols., 2003).

Debido a estos antecedentes, otros grupos de ratas con falsa lesión y con lesión neonatal de hipocampo ventral, administrados con cerebrolisina o con vehiculo, fueron utilizadas a edad pospúber para medir la inhibición por prepulso de la respuesta de sobresalto. Los animales fueron colocados de manera individual en un aparato para medir la respuesta de sobresalto (Start reflex meter, Columbus Instruments). Durante la prueba se mantuvo un ruido blanco de fondo de 65 dB.

Después de 5 minutos de habituación, a cada rata se le aplicaron 80 ensayos con pulsos de 0, 85, 105 y 120 dB, y con prepulso/pulso de 75/105, 75/120, 85/100 y 80/120 dB respectivamente, hasta completar 10 ensayos de cada uno. Estos ensayos se aplicaron de una forma pseudoaleatoria y con un intervalo interensayo de 30 segundos.

La duración del prepulso fue de 40 ms y la del pulso de sobresalto de 40 ms con una separación de 100 ms. La respuesta de sobresalto fue medida dentro de los primeros 100 ms después del pulso.

El % de inhibición por prepulso de cada intensidad fue calculado utilizando la siguiente fórmula: $[100 - (100 \times \text{amplitud del ensayo con prepulso} / \text{amplitud del ensayo con el pulso de sobresalto solo})]$.

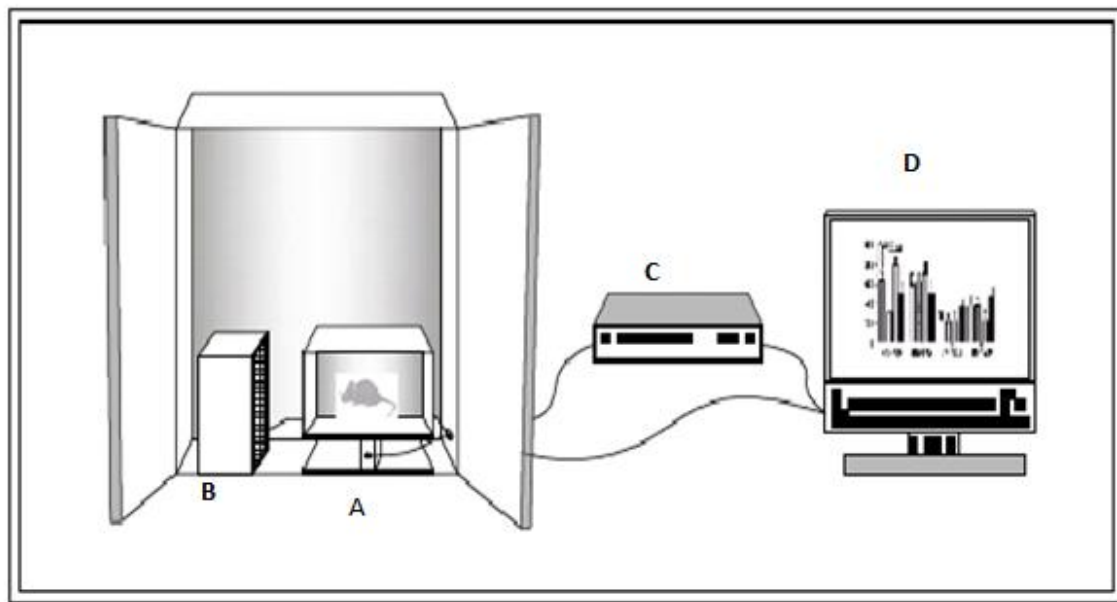


Figura 6. Esquematación del equipo Start Reflex Meter utilizado para la prueba de inhibición del prepulso. a).- Caja cerrada con sensor para la captación de la respuesta de la rata, b).- Bocina que permite la generación del estímulo acústico, c).- Amplificador de la señal detectada por el sensor, D).- Computadora para el registro y cuantificación de la respuesta.

5.8 Estudios Morfológicos.

Los cerebros destinados al estudio morfológico de Sholl fueron sometidos a la tinción de Golgi-Cox, los animales después de haber sido sometidos a las pruebas conductuales de actividad locomotora y de la interacción social a los 60 días de edad fueron sacrificados de la manera descrita a continuación.

5.8.1 Protocolo de la tinción de Golgi-Cox.

- 1.-Se anestesió a la rata, después de realizar los estudios conductuales a la edad de 60 días, usando pentobarbital sódico.
- 2.-Se perfundió al animal con solución salina al 0.9% por el ventrículo izquierdo, previa ligadura de la arteria aorta descendente y corte de la aurícula derecha, con la finalidad de eluir los eritrocitos del tejido cerebral.
- 3.- Se procedió a remover los cerebros para ponerlos en 20 ml de la solución de Golgi-Cox y almacenarlos en la oscuridad durante 21 días.
- 4.-Después de este tiempo se drenó la solución de Golgi-Cox y se reemplazó por una solución de sacarosa al 30%. Los cerebros fueron almacenados en la oscuridad por 2 días más antes de cortar, (la duración de este paso por sacarosa no es crítico para cortar el tejido pero se recomienda conservar el tejido durante dicho tiempo para evitar posibles fracturas del mismo durante el corte).
- 5.- Se montó el cerebro en la platina del vibratómo utilizando pegamento cianoacrílico y fue sumergido en la solución de sacarosa al 6% ya en la cámara del vibratomo hasta un nivel suficiente para cubrir el tejido y la navaja.
- 6.- Se procedió a realizar los cortes después de un lavado de la navaja durante 5 minutos con xileno.
- 7.-Se cortó el tejido haciendo rebanadas de 200 μm de grosor.
- 8.- Se montaron las rebanadas en laminillas gelatinizadas al 2 % presionándolos uniformemente con papel filtro húmedo con sacarosa contra el lado gelatinizado de la laminilla.

9.- Se mantuvieron las laminillas en una cámara húmeda durante el tiempo de corte de todo el cerebro.

10.- Se procedió posteriormente a revelar los cortes obtenidos.

5.8.2 Protocolo de revelado de la tinción de Golgi-Cox.

Todo el procedimiento se realizó en total oscuridad.

1.- Inicialmente se realizó un lavado en agua destilada durante un minuto.

2.- Se mantuvo sumergidas las laminillas en hidróxido de amonio durante 30 minutos.

3.- Se realizó un lavado con agua destilada durante un minuto.

4.- A continuación se sumergieron durante 30 minutos en fijador rápido de Kodak para película fotográfica. Se utilizó una dilución 1:2 con agua destilada.

5.- Se lavó con agua destilada durante un minuto.

6.- Se deshidrató con concentraciones crecientes de etanol:

1 minuto con alcohol al 70 %

1 minuto con alcohol al 95 %

5 minutos con alcohol al 100 %

5 minutos con alcohol al 100 %

15 minutos con xileno.

7.- Se montaron los cubreobjetos con resina sintética en los cortes ya revelados.

8.- Fueron conservados en oscuridad para su secado y observación posterior.

5.8.3 Análisis de neuronas contrastadas con la tinción de Golgi- Cox.

Una vez que se localizó el área de interés, en este caso el núcleo accumbens (Nacc), la corteza media prefrontal y la amígdala, procedimos a identificar las neuronas espinosas medianas, las neuronas piramidales de la capa III y V y las neuronas glutamatérgicas de la amígdala para dibujarlas mediante su observación a 40X utilizando un microscopio óptico marca Leica modelo DMSL acoplado a una cámara lúcida marca Leica. Además con la ayuda de este mismo equipo se

procedió al trazado de las espinas dendríticas utilizándose una distancia de 30 micrometros de longitud por cada dendrita neuronal, dicha observación se realizó a 100X.

5.8.4 Estudio histológico con la tinción de Nissl.

La zona del hipocampo ventral de los cerebros obtenidos de los animales sacrificados fue destinada para el estudio histopatológico mediante la tinción de Nissl de la manera descrita a continuación, esto con el fin de identificar la zona de la lesión producida por el acido iboténico.

Tinción de Nissl.

Método de violeta de cresilo de Vogt para tinción de Nissl.

(Modificada para cerebro de rata)

Histoquímica para vibratomo.

Fijación: formol al 15%.

Secciones: de tejido en fresco a un grosor de 100 – 200 μm .

Soluciones.

A. Solución matriz de violeta de cresilo “ECHO” al 2%

Violeta de cresilo	2 mg
Agua destilada	100 ml

B. Solución estabilizadora de acetato de sodio

Acetato de sodio	2 mg
Agua destilada	1000 ml
Ácido acético glacial	3 ml

Preparar con la solución A y B la solución de trabajo C

C. Solución diaria o de trabajo de violeta de cresilo “ECTH”

Solución matriz de violeta de cresilo al 2%	85 ml
Solución estabilizadora	165 ml
Volumen total	250 ml

Procedimiento:

1. Se cortó el tejido en secciones de 200 μm , las cuales se colocaron en laminillas gelatinizadas al 2%, y se dejarán secar.
2. Se colocaron en la solución diaria o de trabajo de violeta de cresilo “ECTH” 40 min (depende el tiempo, al grosor del tejido).
3. Se diferenciaron rápidamente en alcohol al 75% (30 seg.).
4. Se deshidrataron en alcohol x2 (90%) 2 min, x2 (100%) 3 min y se aclararon con xileno (30 min).
5. Se montaron usando resina sintética.

5.9 Análisis de resultados morfológicos.

La evaluación de los datos morfológicos se realizó mediante el análisis de Sholl, el cual consiste en trazar una serie de círculos concéntricos alrededor del cuerpo de la neurona y de esta manera determinar el número de dendritas que interceptan cada uno de los círculos. Para el análisis, cada caso fue representado por el valor promedio obtenido por cada círculo de radio diferente (existe 10 μm de diferencia entre cada círculo que antecede a otro), obteniéndose el número de dendritas que cruzan cada círculo de tal forma que se realizó una gráfica con el

número de intersecciones entre las dendritas identificadas y cada círculo concéntrico contra el número ordinal de cada círculo que se encuentra a 10 μm uno de otro. La densidad de espinas dendríticas se obtuvo mediante el promedio del número de espinas cuantificadas por cada 10 micras de longitud por cada dendrita analizada.

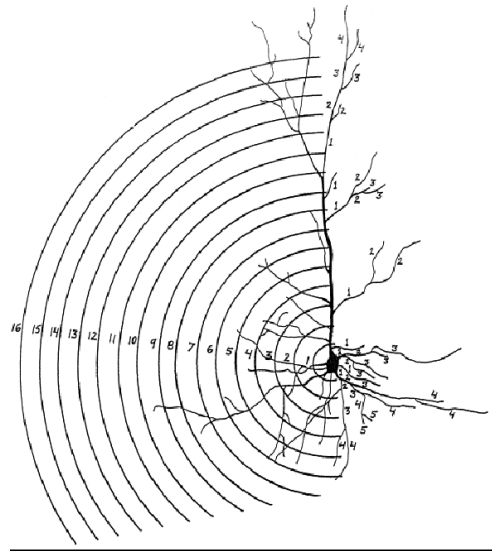


Figura 7. Diagrama de la plantilla de discos concéntricos para el análisis de Sholl. Cada disco concéntrico está calibrado para que el primer círculo corresponda a un radio de 10 μm , el segundo a 20 μm y sucesivamente todos representan 10 μm más.

5.10 Análisis de estereología.

Otro grupo de ratas (5 animales por grupo), fue anestesiada con pentobarbital sódico (75 mg/kg ip) y perfundidas con solución salina al 0.9 %, posteriormente los cerebros de cada una de las ratas fue extraído y colocado en paraformaldehído al 4% en 0.1 M de solución amortiguadora de fosfatos. Un día antes de que dichos cerebros fueran seccionados fueron sometidos a refrigeración en agua destilada, posteriormente, se obtuvieron cortes coronales de 40 μm de grosor al nivel de la corteza media prefrontal, núcleo accumbens, amígdala basolateral e hipocampo mediante un vibratomo (model 2000, Leica, Germany). Para la

realización del análisis estereológico, cada corte obtenido previamente fue montado en portaobjetos polarizados, para después ser sometidos al colorante violeta de cresilo, realizando cada uno de los pasos descritos anteriormente en el protocolo de tinción de Nissl. Una vez que las células estaban teñidas, estas fueron cuantificadas con un microscopio Olympus BH2 acoplado a una cámara digital color CDD, la cual estaba conectada a un sistema analizador de imágenes para estereología (Bioscience Stereo Investigator System). Se realizó la cuantificación de neuronas mediante este sistema en 4 secciones de cada uno de los animales, para obtener el valor promedio que nos permitiera comparar a cada uno de los grupos estudiados, dicha cuantificación se realizó en un área de $900\ \mu\text{m}^2$ y considerando una profundidad del tejido de $10\ \mu\text{m}$ para cada una de las regiones estudiadas.



Figura 8. Fotografía del equipo de medición de estereología. a).- Microscopio Óptico, b).- Cámara digital Color CCD, c).- Unidad de control, d).- Palanca, e).- PC con tarjeta de video, programa bioscience stereo investigator, monitor LCD.

5.11 Análisis de la concentración de tirosina hidroxilasa.

Para realizar la evaluación de la concentración de tirosina hidroxilasa (TH), se realizó un análisis inmunohistoquímico utilizando anticuerpo contra TH. Después de haber obtenido los cortes en el vibratomo de los 5 animales de cada grupo a nivel del Nacc y del CPu, se efectuó el siguiente protocolo:

- Día 1:
- 1.-Lavado con solución amortiguadora de fosfatos 1 X
 - 2.- Lavado con solución amortiguadora de fosfatos 1 X + 1% tween + 3% H₂O₂.
 - 3.- Incubación de 1 hora al 1% con suero normal de caballo.
 - 4.- Incubación durante toda la noche con el 1er. anticuerpo con una dilución 1:250 (MsX Tyrosine MAB318).
- Día 2:
- 5.-Lavado con solución amortiguadora de fosfatos 1 X
 - 6.- Incubación con el anticuerpo secundario (Biotinylated anti-mouse IgG) con una dilución 1:100.
 - 7.- Incubación con la solución ABC (avidin + peroxidasa de rabano + PBS 1X).
 - 8.-Incubación con el cromógeno tetrahidroclorato de diaminobencidina (DAB).
 - 9.- Montaje de las laminillas con cubreobjetos.

Para la realización del análisis de los niveles de TH se tomaron imágenes a nivel de Cpu y del Nacc con la ayuda de un microscopio Olympus BH2 acoplado a una cámara digital color CDD, de donde se obtuvieron 10 imágenes por sección en cada uno de los grupos para ser analizados por el programa Image Pro-Plus para medir los niveles de densidad óptica y obtener los promedios de los datos para cada uno de los grupos a comparar. Finalmente, estos resultados fueron analizados estadísticamente con el programa Graph Pad 4.0

5.12 Análisis estadístico.

El análisis de los resultados de las pruebas conductuales, así como de los análisis morfológicos, estereológicos e inmunohistoquímicos se realizaron mediante una ANOVA de dos vías comparándose los cuatro grupos y se tomaron como factores independientes el tratamiento con cerebrolisina y la lesión del animal. Se consideró significativa la diferencia cuando $p < 0.05$, posteriormente fue aplicada una prueba post hoc de Bonferroni. Este análisis se realizó con la ayuda del programa Graph Pad versión 4.0

VI. Resultados.

6.1 Actividad locomotora.

Diversos estudios han demostrado que el modelo de lesión neonatal del hipocampo ventral induce un incremento en la actividad locomotora ante un ambiente novedoso (Lipska y cols., 1993; Flores y cols. 1996; Brake y cols. 1999). En la figura 9 se observa que durante los primeros 50 minutos, los cuatro grupos de animales de 60 días de edad muestran un ligero incremento de la actividad locomotora, como resultado de la conducta exploratoria ante un ambiente novedoso; sin embargo, en el periodo de tiempo entre el minuto 90 al minuto 120 de la prueba, se puede apreciar una mayor actividad en el grupo de animales lesionados que recibió solamente vehículo (ANOVA dos vías $P < 0.05$), en comparación con los grupos de animales control que recibieron el tratamiento con cerebrolisina y con vehículo.

Además se realizó un análisis de datos de los movimientos totales obtenidos durante los 120 minutos de toda la prueba (ANOVA dos vías, Cbl; $F_{1, 38} = 11.6$, $P < 0.001$; interacción de la lesión con Cbl; $F_{1, 38} = 16.8$, $P < 0.001$), en donde se observa un incremento significativo en los animales LNHV que recibieron vehículo ($P < 0.01$) comparados con el grupo de animales control-vehículo (Fig. 10). Asimismo, en esta misma figura se muestra claramente el efecto de la cerebrolisina en el grupo de animales LNHV al reducir la hiperlocomoción característica de los mismos. Los resultados también nos indican que no existen diferencias entre los grupos controles tratados con vehículo o con cerebrolisina.

Existen varios reportes que demuestran que las ratas LNHV a la edad postpúber manifiestan una respuesta de hiperlocomoción mayor durante esta prueba cuando reciben una dosis de 1 mg/kg de anfetamina (Lipska y cols., 1993; Lipska y Weinberger, 1995; Flores y cols., 1996a). Es importante mencionar que los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo muestran que la actividad locomotora en las ratas LNHV que recibieron una dosis de anfetamina de

1 mg/kg fue mucho mayor a la respuesta observada en los animales LNHV en la prueba de actividad locomotora ante ambiente novedoso (ANOVA dos vías, interacción de la lesión con Cbl; $F_{1, 28} = 7.8$, $P < 0.01$). Sin embargo, fue interesante observar que la cerebrolisina disminuye dicha hiperactividad en los animales LNHV que recibieron dicho tratamiento, mientras que en los animales controles que recibieron tanto vehículo como cerebrolisina no mostraron cambios significativos (Fig. 12). Así también, se observa que la aplicación del vehículo no indujo cambio alguno durante la prueba (Fig. 11).

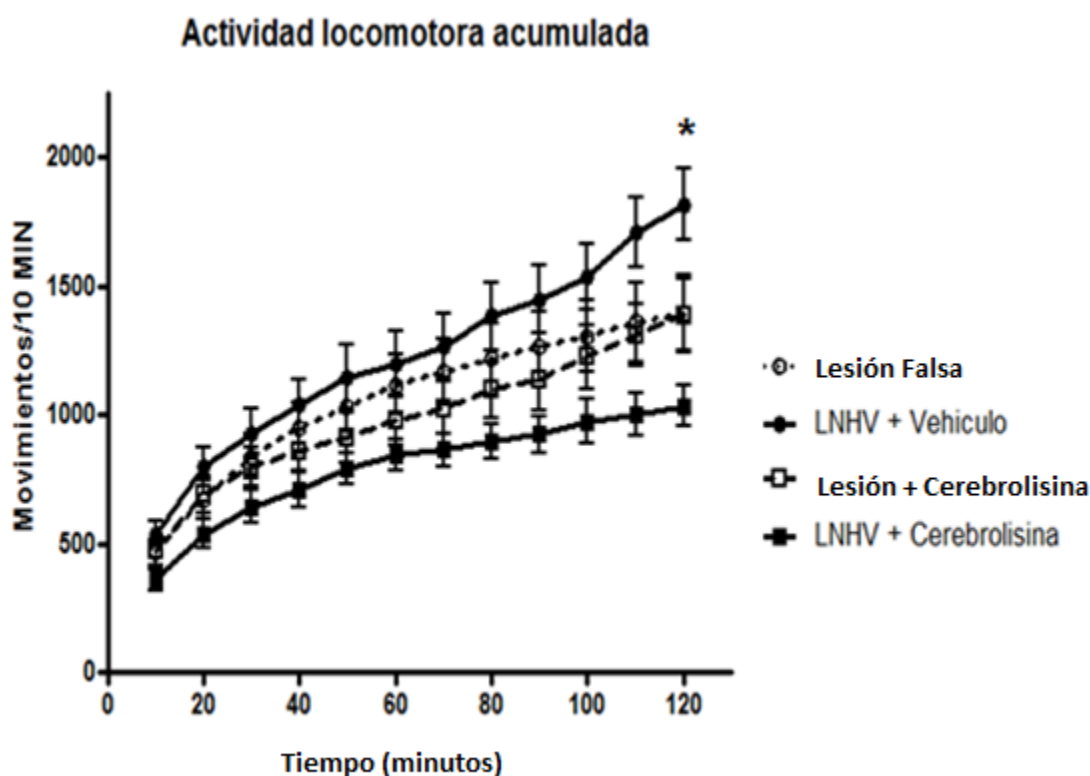


Figura 9. Actividad locomotora acumulada ante ambiente novedoso de ratas Sprague Dawley de PN60 con lesión neonatal de hipocampo ventral (LNHV) tratadas con cerebrolisina y vehículo, así como, sus respectivos controles. Los valores indican la media de los desplazamientos acumulados por intervalos de tiempo de 10 minutos $\pm$ EEM. N = 10 ratas por grupo (* $P < 0.001$ con respecto al grupo LNHV + vehículo).

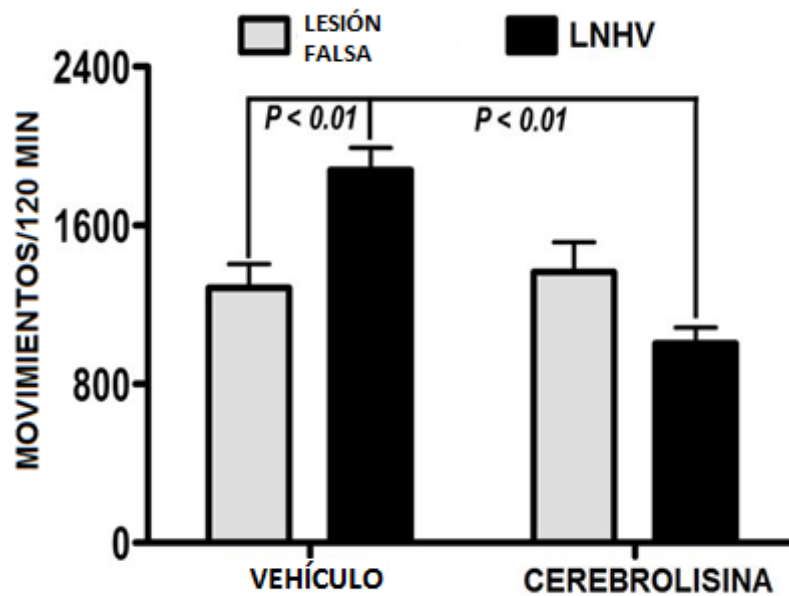


Figura 10. Actividad locomotora total de ratas Sprague Dawley de PN60 con lesión neonatal de hipocampo ventral (LNHV) tratadas con cerebrolisina y vehículo, así como, sus respectivos controles. Los valores indican la media de los desplazamientos totales durante 120 minutos $\pm$ EEM. N = 10 ratas por grupo.

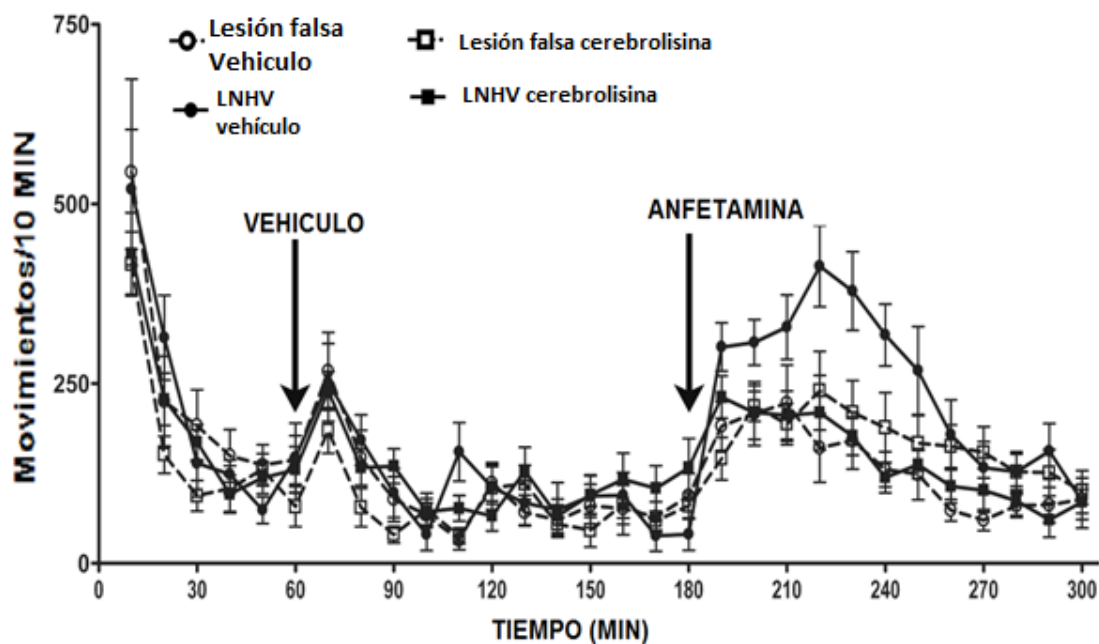


Figura 11. Perfil temporal de la Actividad locomotora de ratas Sprague Dawley de PN60 con lesión neonatal de hipocampo ventral (LNHV) tratadas con cerebrolisina y vehículo, así como, sus respectivos controles, las cuales recibieron una dosis de 1 mg/kg de anfetamina en el minuto 180 de la prueba conductual. Los valores indican la media de los desplazamientos acumulados por intervalos de tiempo de 10 minutos $\pm$ EEM. N = 10 ratas por grupo.

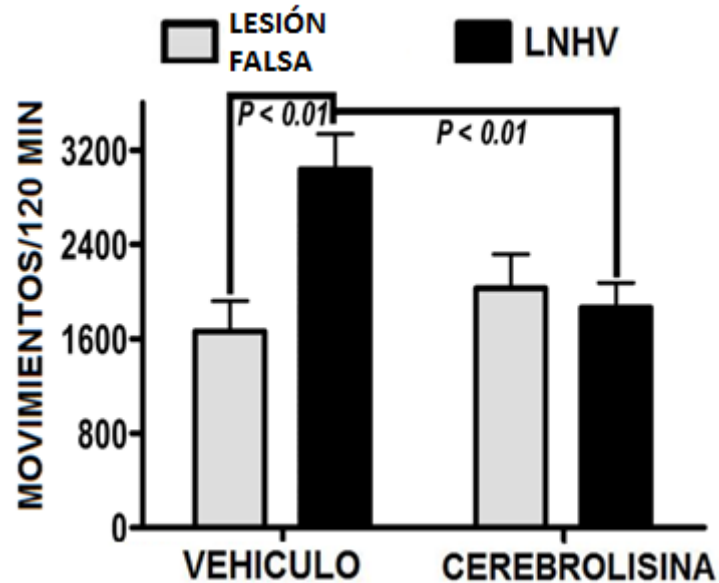


Figura 12. Actividad locomotora total de ratas Sprague Dawley de PN60 con lesión neonatal de hipocampo ventral (LNHV) tratadas con cerebrolisina y vehículo, así como, sus respectivos controles, a las cuales se les aplicó 1 mg/kg de anfetamina. Los valores indican la media de los desplazamientos totales durante 120 minutos $\pm$ EEM. N = 10 ratas por grupo.

6.2 Interacción Social.

La interacción social en las ratas LNHV es otra alteración conductual que se presenta en dichos animales como consecuencia del daño inducido en el hipocampo ventral en etapa neonatal (Sams-Dodd y cols., 1997; Becker y cols., 1999; Silva-Gómez y cols., 2003b; Flores y cols., 2005b), por lo que nuestros resultados confirman dichos estudios al observar una disminución en el tiempo total de contacto (ANOVA dos vías, lesión; $F_{1, 18} = 4.9$, $P < 0.05$) en los animales LNHV comparados con el grupo control, los cuales fueron administrados únicamente con vehículo (Fig. 13), mientras que el número total de contactos no fue un aspecto alterado en la conducta de dichos animales (Fig. 14). Sin embargo, es evidente que el tratamiento con cerebrolisina disminuye la alteración en el tiempo de interacción social que se presenta en las ratas LNHV, haciendo que estas manifiesten un incremento en el tiempo total de contactos (Fig. 13).

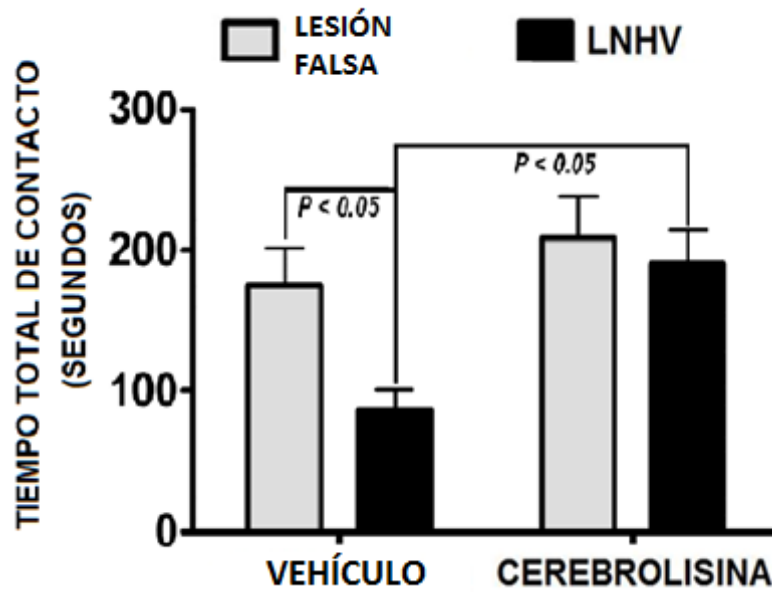


Figura 13. Tiempo total de contacto durante la prueba de interacción social en ratas Sprague Dawley de PN60 con lesión neonatal del hipocampo ventral (LNHV) tratadas con cerebrolisina y vehículo, así como, sus respectivos controles. Los valores indican la media del tiempo total de contacto $\pm$ EEM. N = 8 pares de ratas por grupo.

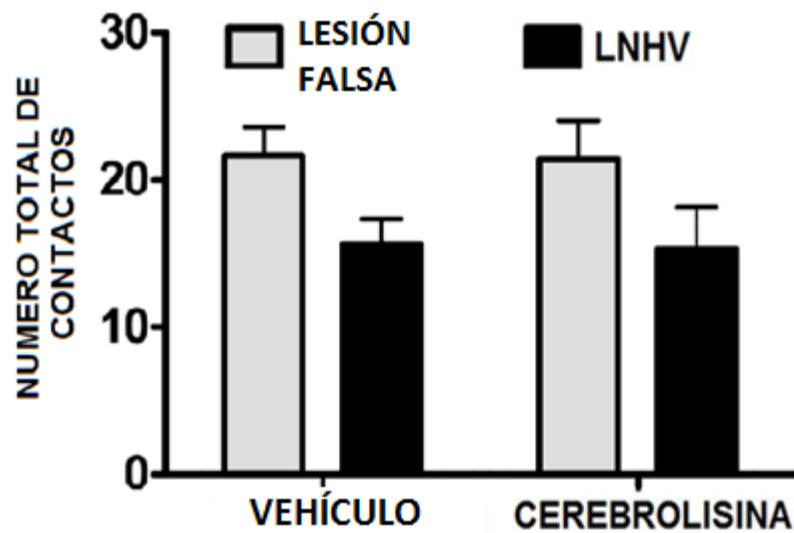


Figura. 14. Número total de contactos durante la prueba de interacción social en ratas Sprague Dawley de PN60 con lesión neonatal del hipocampo ventral (LNHV) tratadas con cerebrolisina y vehículo, así como, sus respectivos controles. Los valores indican la media del número total de contactos $\pm$ EEM. N = 8 pares de ratas por grupo.

6.3 Inhibición de la respuesta de sobresalto por el prepulso.

El análisis de la amplitud de sobresalto medida en los animales LNHV muestran que la lesión y el tratamiento con cerebrolisina no inducen cambio alguno en la respuesta ante dicha prueba (Fig. 15). Sin embargo, los efectos de la cerebrolisina se muestran en el porcentaje de inhibición de prepulso (Fig. 16). El análisis estadístico de el ANOVA de dos vías indica un efecto importante del tratamiento con cerebrolisina ($F_{(3, 112)}=12.5$; $P < 0.0001$), así como una diferencia significativa en la interacción de la lesión con el tratamiento ($F_{(9, 112)}=2.04$; $P < 0.05$). Por lo que, con estos datos podemos observar el efecto de la cerebrolisina al revertir la alteración generada por la lesión en la respuesta de la inhibición de prepulso.

La prueba post hoc aplicada a los resultados de esta prueba indica que las ratas LNHV que recibieron vehículo presentan una disminución en la inhibición del prepulso en el ensayo cuyos valores de prepulso-pulso fueron 75-105 ($P < 0.05$) (Fig. 16). Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados en este modelo (Le Pen y cols., 2003b; Lipska y cols., 1995). Además, los grupos controles que recibieron tanto cerebrolisina como vehículo no mostraron cambios significativos.

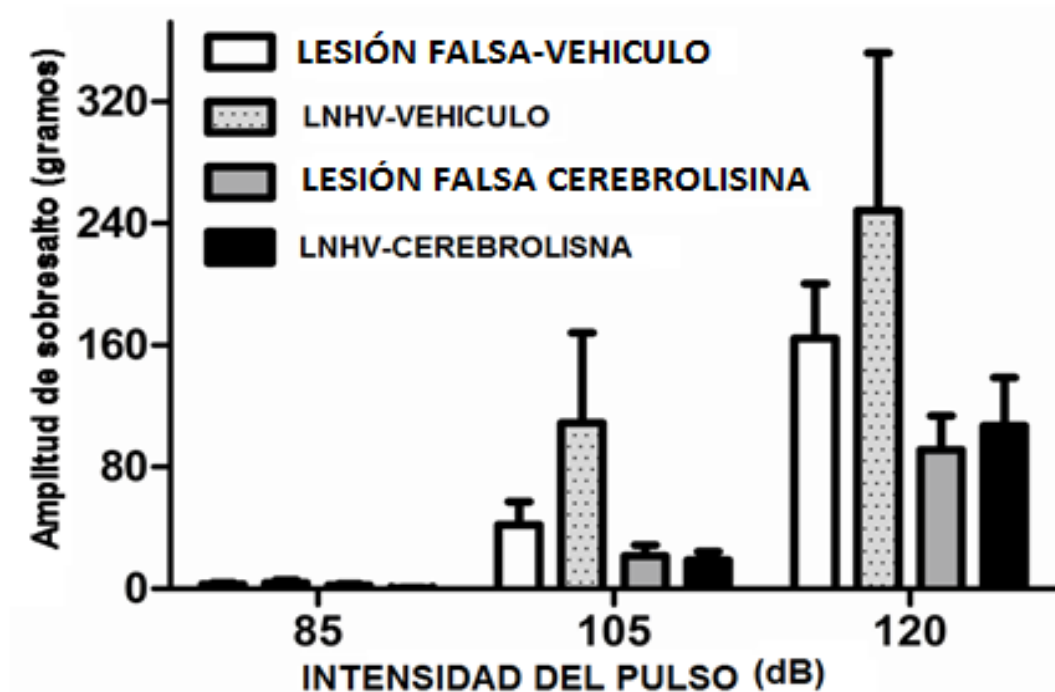


Figura 15. Amplitud de la respuesta de sobresalto en ratas Sprague Dawley de PN60 con lesión neonatal del hipocampo ventral (LNHV) tratadas con cerebrolisina y vehículo, así como, sus respectivos controles. Los valores indican la media de la respuesta de sobresalto expresada en gramos $\pm$ EEM. N = 10 ratas por grupo.

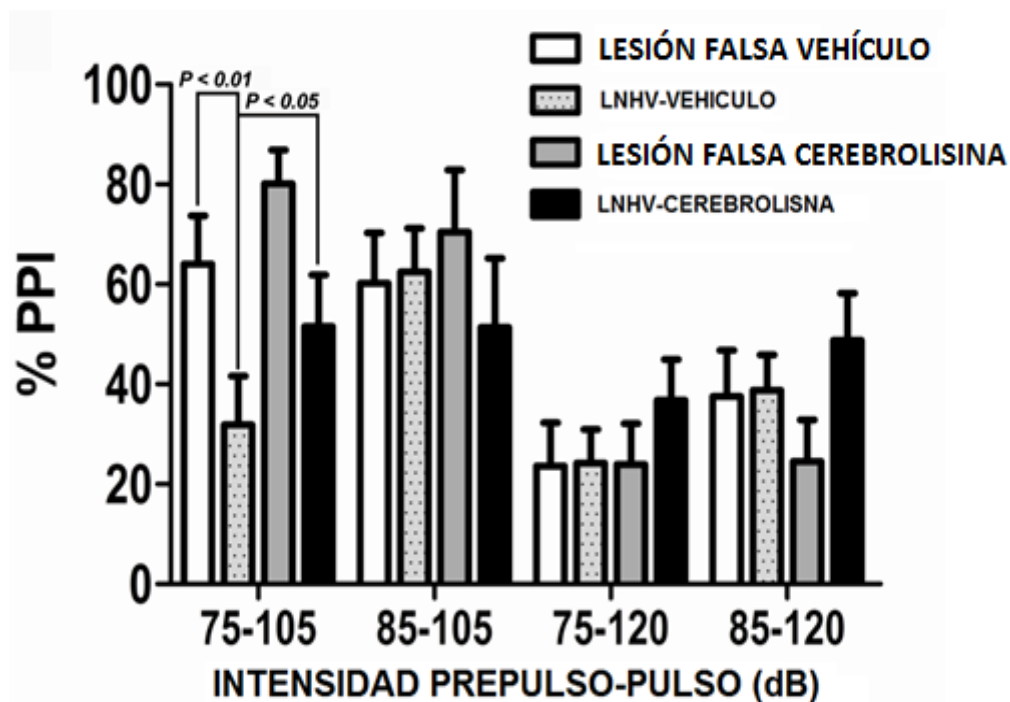


Figura 16. Inhibición de prepulso en ratas Sprague Dawley de PN60 con lesión neonatal del hipocampo ventral (LNHV) tratadas con cerebrolisina y vehículo, así como, sus respectivos controles. Los valores indican la media del % de inhibición de prepulso $\pm$ EEM. N = 10 ratas por grupo.

6.4 Morfología dendrítica.

El análisis morfológico utilizando la técnica de Golgi-Cox fue realizado en un total de 2000 neuronas provenientes de 40 animales tanto experimentales como controles. Los parámetros evaluados en este análisis comprenden: la longitud dendrítica total, el número máximo de orden y la densidad de espinas dendríticas en 10 μm . Estos parámetros fueron evaluados en 800 neuronas piramidales de la corteza media prefrontal de la capa III y V, 400 neuronas espinosas mediadas del núcleo accumbens, 400 neuronas espinosas medianas del caudado putamen y 400 neuronas piramidales de la amígdala basolateral.

Estudios previos obtenidos de nuestro grupo de trabajo de laboratorio, han demostrado que la lesión neonatal del hipocampo ventral induce una retracción dendrítica, así como, una pérdida de espinas dendríticas en las neuronas piramidales de la corteza media prefrontal (CPFm) Capa III (Flores y cols., 2005a, Alquicer y cols., 2008). Por lo que, en los resultados del análisis morfológico de las neuronas de la CPFm Capa III muestran una disminución en la longitud dendrítica en las ratas LNHV administradas con vehículo con respecto a sus controles (ANOVA dos vías, interacción de la lesión con Cbl; $F_{1, 36} = 8.6$, $P < 0.0$) (Fig. 17c), así también esta misma alteración inducida por la lesión se observa en la longitud dendrítica de las neuronas piramidales de la capa V de la CPFm (ANOVA, lesion; $F_{1, 36} = 20$, $P < 0.01$; Cbl; $F_{1, 36} = 17$, $P < 0.01$; interacción de la lesión con Cbl; $F_{1, 36} = 30$, $P < 0.01$) (Fig. 18c), en las neuronas piramidales de la amígdala basolateral (ANOVA, lesión; $F_{1, 28} = 10.1$, $P < 0.05$) (Fig. 19c) y en las neuronas espinosas medianas del núcleo accumbens (ANOVA dos vías, lesion; $F_{1, 36} = 8.3$, $P < 0.01$) (Fig. 20c). De manera interesante, el tratamiento con cerebrolisina disminuye la hipotrofia presentada en las neuronas piramidales de la CPFm, de la amígdala basolateral y en las neuronas espinosas mediadas del Nacc en las ratas LNHV. Por otro lado, las neuronas espinosas medianas del caudado putamen no muestran cambios en su longitud dendrítica inducidos por la lesión ni por la cerebrolisina (Fig. 21c). Tampoco se encontraron diferencias en la evaluación de

este parámetro morfológico en los grupos controles que recibieron cerebrolisina o vehículo (Fig. 17-21).

El análisis realizado en las espinas dendríticas de las neuronas anteriormente mencionadas se muestran de la figura 17d a la figura 21d. Los resultados obtenidos en la evaluación de este parámetro morfológico confirman estudios previos (Flores y cols., 2005a, Alquicer y cols., 2008) sobre el efecto de la lesión neonatal del hipocampo ventral en la disminución de la densidad de espinas dendríticas de las neuronas piramidales de la CPFm capa III (ANOVA dos vías, interacción de la lesión con Cbl; $F_{1, 36} = 7.6$, $P < 0.01$)(Fig. 17d). Por otro lado, no se encontraron cambios en la densidad de espinas dendríticas de las neuronas de la CPFm capa V en los animales LNHV tratados con vehículo respecto a los animales controles (Fig 18d). Además, las neuronas piramidales de la amígdala basolateral en los animales LNHV con y sin tratamiento con cerebrolisina presentan una disminución en la densidad de sus espinas dendríticas comparados con sus respectivos grupos controles (ANOVA dos vías, lesión; $F_{1, 28} = 13.3$, $P < 0.05$)(Fig. 19d). En cuanto a la densidad de espinas de las neuronas espinosas medianas del Nacc y del CPu, estas no mostraron cambios significativos entre los animales LNHV que recibieron vehículo y los animales control-vehículo (Fig. 20d y 21d). Con todo esto, es importante señalar que el principal efecto de la cerebrolisina sobre la densidad de espinas dendríticas de las neuronas estudiadas se presenta en la CPFm capa III, en donde la cerebrolisina genera una recuperación en las espinas de las neuronas de los animales LNHV.

Otro parámetro morfológico evaluado por medio del análisis de Sholl fue la longitud por número de orden dendrítico. De manera interesante, este análisis de orden dendrítico muestra que las neuronas de la CPFm Capa III presentan una reducción en la longitud de las dendritas de orden cuarto y quinto en los animales LNHV (ANOVA dos vías, Cbl: $F_{3, 288} = 2.86$, $P < 0.05$; orden dendrítico: $F_{7, 288} = 349$, $P < 0.001$)(Fig. 17e), así como en la longitud de las dendritas de orden tercero, cuarto y quinto de las neuronas piramidales de la capa V (ANOVA dos

vías, Cbl: $F_{3, 245} = 22.7$, $P < 0.001$; orden dendrítico: $F_{7, 245} = 376$, $P < 0.001$; interacción de orden dendrítico con Cbl: $F_{18, 245} = 4.66$, $P < 0.001$) (Fig. 18e). Asimismo se observa claramente en las mismas figuras que la cerebrolisina disminuye las alteraciones presentadas en dichas neuronas. Este mismo análisis aplicado a las neuronas de la amígdala basolateral, revelan que la lesión genera una disminución en la longitud de la dendritas de cuarto orden de estas neuronas (ANOVA dos vías, Cbl: $F_{3, 252} = 3.8$, $P = 0.03$; orden dendrítico: $F_{8, 252} = 200$, $P < 0.001$; interacción entre Cbl y orden dendrítico; $F_{24, 252} = 1.64$, $P = 0.03$), la cual se revierte por efecto de la cerebrolisina (Fig 19e). Este efecto se observa de manera similar en las neuronas espinosas medianas del Nacc a nivel del tercer orden dendrítico (ANOVA dos vías, Cbl: $F_{3, 210} = 4.4$, $P < 0.01$; orden dendritico: $F_{5, 210} = 357$, $P < 0.001$)(Fig. 20e). Sin embargo, las neuronas espinosas medianas del CPu no presentan cambios en la longitud de orden dendrítico (Fig. 21e).

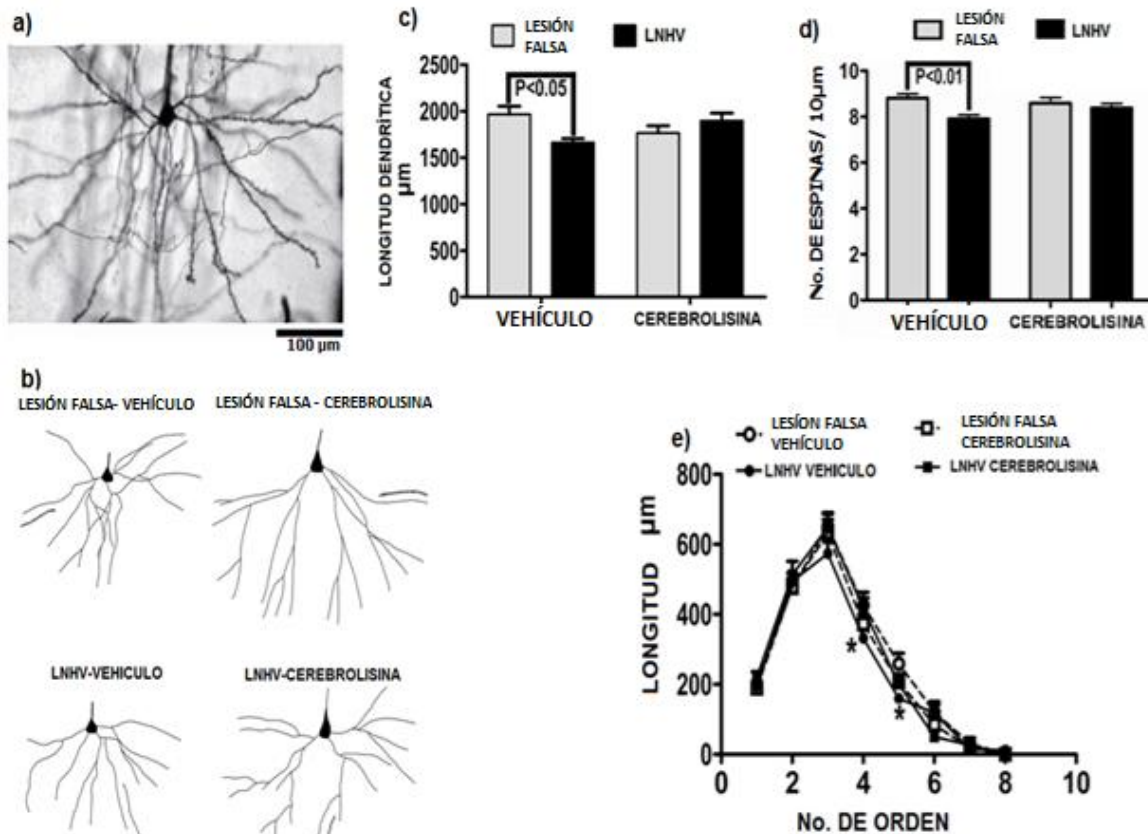


Figura 17. Análisis del efecto de la cerebrolisina (Cbl) sobre la morfología de las neuronas piramidales de la CPFm Capa III a edad posúber (PN60). N =10 animales por grupo.

a) Fotomicrografía que muestra una neurona piramidal de la CPFm Capa III procesada mediante la técnica de tinción de Golgi-Cox. b) Representación esquemática de los dibujos obtenidos de la dendritas basales de las neuronas de la CPFm capa III. c) Análisis de la longitud dendrítica total que muestra una disminución de este parámetro en las neuronas de las ratas LNHV, así como el efecto de la cerebrolisina al revertir la disminución de la longitud dendrítica provocada por la lesión neonatal del hipocampo ventral. d) Análisis de la densidad de espinas dendríticas, el cual muestra que las ratas LNHV tratadas con vehículo presentan una disminución en el número de espinas de estas neuronas. e) Análisis de la longitud de orden dendrítico, el cual muestra que las ratas LNHV tratadas con vehículo presentan una disminución en la longitud de las dendritas de orden cuarto y quinto ($p < 0.01$), la cual se ve revertida por el efecto de la cerebrolisina en las ratas LNHV.

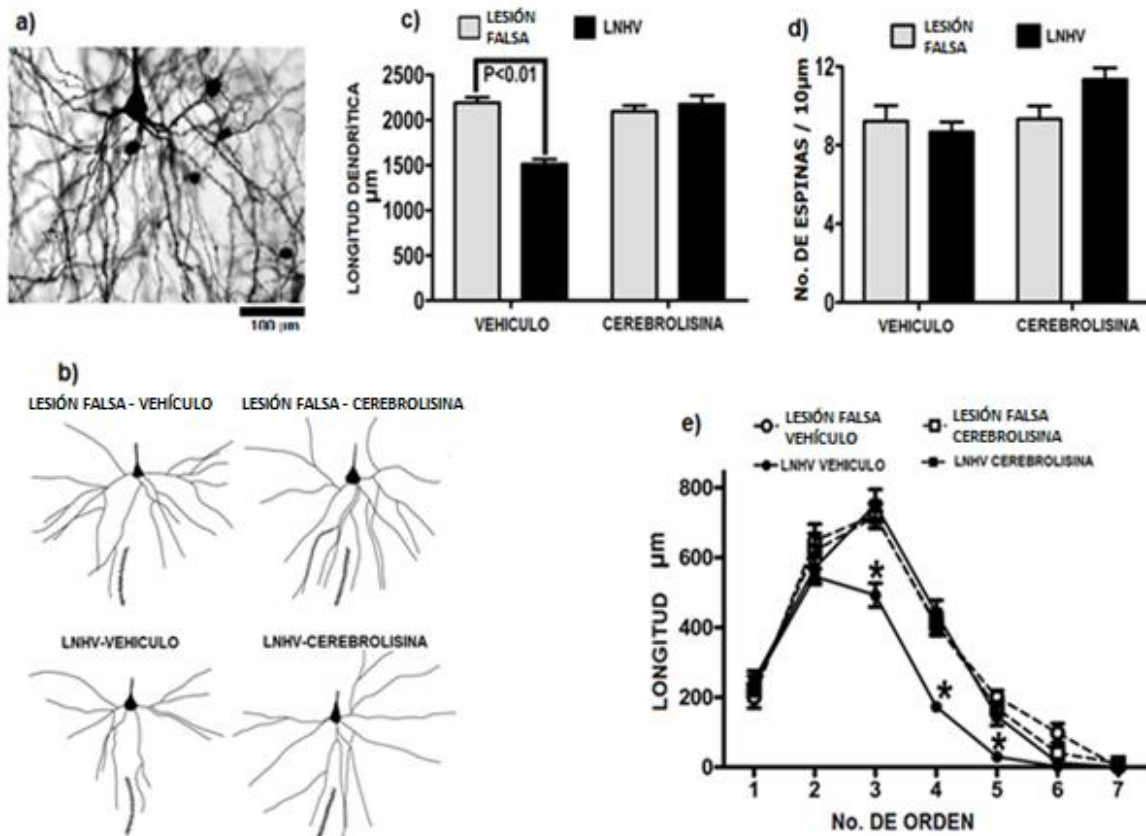


Figura 18. Análisis del efecto de la cerebrolisina (Cbl) sobre la morfología de las neuronas piramidales de la CPFm Capa V a edad posúber (PN60). N =10 animales por grupo. a) Fotomicrografía que muestra una neurona piramidal de la CPFm Capa V procesada mediante la técnica de tinción de Golgi-Cox. b) Representación esquemática de los dibujos obtenidos de la dendritas basales de las neuronas de la CPfm Capa V. c) Análisis de la longitud dendrítica total que muestra una disminución de este parámetro en las neuronas de las ratas LNHV, así como el efecto de la cerebrolisina al revertir la disminución de la longitud dendrítica provocada por la lesión neonatal del hipocampo ventral. d) Análisis de densidad de espinas dendríticas, el cual muestra que no existe diferencias en ninguno de los grupos estudiados. e) Análisis de la longitud de orden dendrítico, el cual muestra que las ratas LNHV tratadas con vehículo presentan una disminución en la longitud de las dendritas de orden tercero, cuarto y quinto ($p < 0.01$), la cual se ve revertida por el efecto de la cerebrolisina en las ratas LNHV.

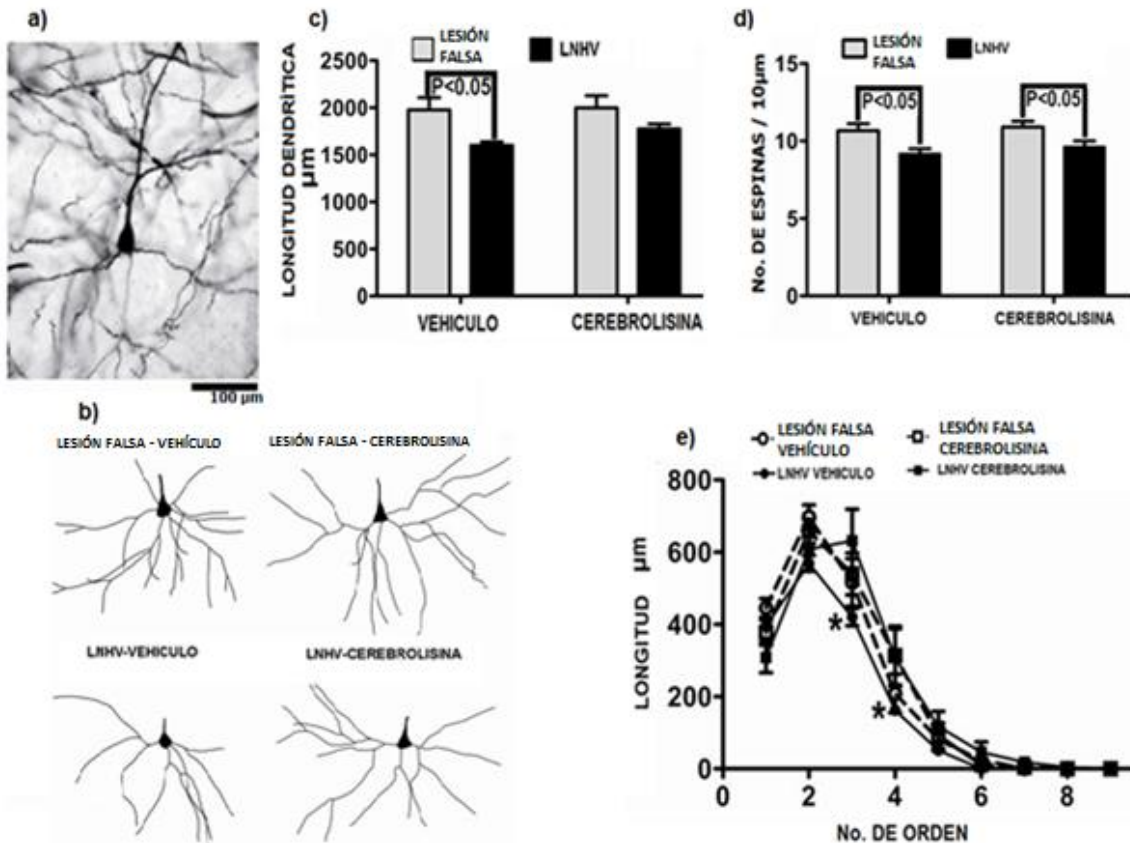


Figura 19. Análisis del efecto de la cerebrolisina (Cbl) sobre la morfología de las neuronas piramidales de la amígdala basolateral a edad pospúber (PN60). N =10 animales por grupo. a) Fotomicrografía que muestra una neurona piramidal de la amígdala basolateral procesada mediante la técnica de tinción de Golgi-Cox. b) Representación esquemática de los dibujos obtenidos de las dendritas basales de las neuronas de la Amígdala Basolateral. c) Análisis de la longitud dendrítica total que muestra una disminución de este parámetro en las neuronas de las ratas LNHV, así como el efecto de la cerebrolisina al revertir la disminución de la longitud dendrítica provocada por la lesión neonatal del hipocampo ventral. d) Densidad de espinas dendríticas. La densidad de espinas dendríticas disminuye en las ratas LNHV. El tratamiento con cerebrolisina reduce la pérdida de espinas dendríticas presentes en las ratas LNHV, sin llegar a los valores de los animales controles. e) Análisis de longitud de orden dendrítico, el cual muestra que las ratas LNHV tratadas con vehículo presentan una disminución en la longitud de las dendritas de orden tercero y cuarto ($p < 0.01$), la cual se ve revertida por el efecto de la cerebrolisina en las ratas LNHV.

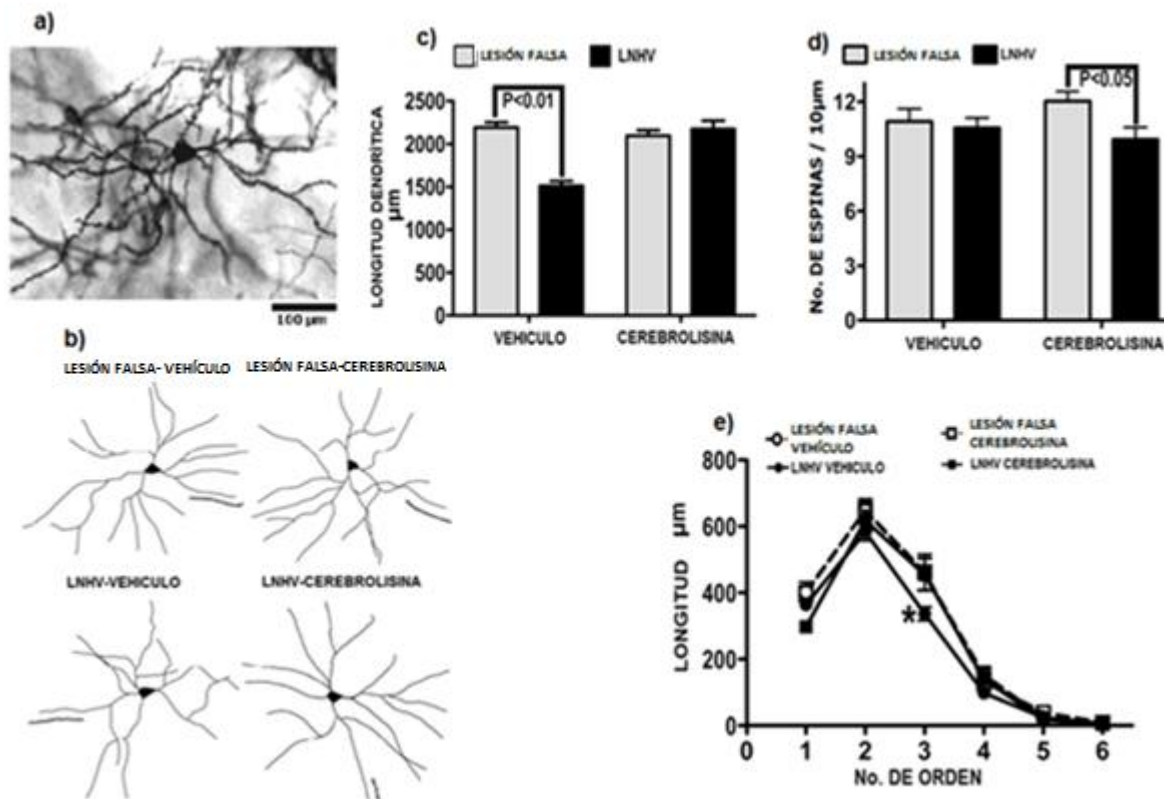


Figura 20. Análisis del efecto de la cerebrolisina (Cbl) sobre la morfología de las neuronas espinosas medianas del núcleo accumbens (Nacc) a edad postpúber (PN60). N =10 animales por grupo. a) Fotomicrografía que muestra una neurona espinosa mediana del núcleo accumbens procesada mediante la técnica de tinción de Golgi-Cox. b) Representación esquemática de los dibujos obtenidos de las dendritas de las neuronas espinosas medianas del núcleo accumbens. c) Análisis de la longitud dendrítica total que muestra una disminución de este parámetro en las neuronas de las ratas LNHV, así como el efecto de la cerebrolisina al revertir la disminución de la longitud dendrítica provocada por la lesión neonatal del hipocampo ventral. d) Densidad de espinas dendríticas. La densidad de espinas dendríticas muestra un aumento en las ratas con falsa lesión tratadas con cerebrolisina. e) Análisis de longitud de orden dendrítico, el cual muestra que las ratas LNHV tratadas con vehículo presentan una disminución en la longitud de las dendritas de tercer orden ($p < 0.01$), la cual se ve revertida por el efecto de la cerebrolisina en las ratas LNHV.

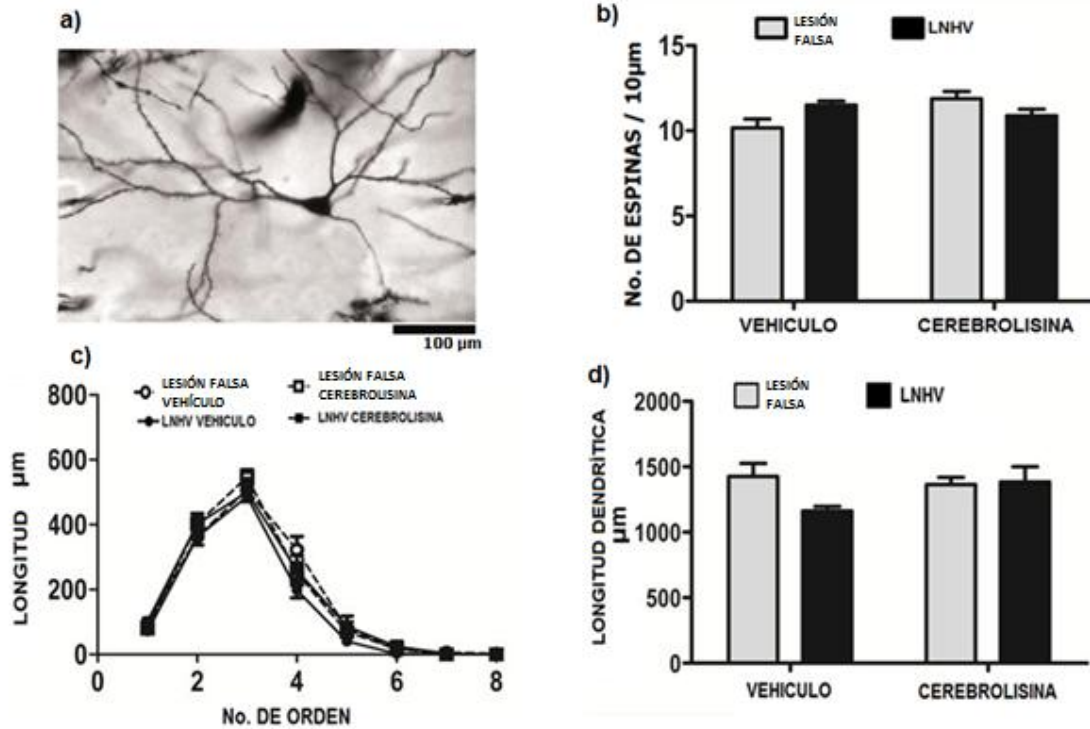


Figura 21. Análisis del efecto de la cerebrolisina (Cbl) sobre la morfología de las neuronas espinosas medianas del caudado putamen (CPu) a edad postpúber (PN60). N =10 animales por grupo. a) Fotomicrografía que muestra una neurona espinosa mediana del CPu procesada mediante la técnica de tinción de Golgi-Cox. b) Análisis de la longitud dendrítica total que muestra que no existen cambios en ninguno de los grupos experimentales. c) Densidad de espinas dendríticas, en donde no hay cambios significativos. e) Análisis de longitud de orden dendrítico en donde tampoco existen diferencias significativas.

6.5 Análisis de densidad neuronal por estereología.

La estereología es un conjunto de métodos diseñados para la realización de un riguroso análisis cuantitativo de tamaño, forma y número de células. Debido a eso, en el presente estudio se realizó un análisis cuantitativo para estimar el número de células en cinco regiones del sistema límbico, las cuales fueron: corteza media prefrontal, amígdala basolateral, núcleo accumbens coraza, núcleo accumbens centro y caudado putamen, con la finalidad de que los resultados nos permitieran relacionar cambios anatómicos presentes en el modelo de lesión neonatal del hipocampo ventral, así como el efecto de la cerebrolisina sobre estos.

El análisis estereológico de las neuronas de la corteza prefrontal y la Amígdala Basolateral impregnadas con violeta de cresilo utilizando la técnica de tinción de Nissl se muestran en las figuras 22 y 23 respectivamente. La cuantificación de neuronas realizada en la CPFm y la amígdala basolateral, muestra que existe una reducción en el número de neuronas en las ratas LNHV que recibieron únicamente vehículo tanto en la CPFm (ANOVA dos vías, interacción de la lesión con Cbl; $F_{1, 12} = 21$, $P < 0.001$) (Fig. 22), como en la amígdala basolateral (ANOVA dos vías, lesión; $F_{1, 12} = 9$, $P = 0.01$; Cbl; $F_{1, 12} = 10.6$, $P < 0.01$; interacción de la lesión con Cbl; $F_{1, 12} = 3.7$, $P = 0.07$) (Fig. 23), en comparación con las ratas controles que recibieron vehículo ($P < 0.01$). En estas mismas figuras, se puede apreciar que las ratas LNHV que recibieron el tratamiento con cerebrolisina presentan una disminución en la pérdida de neuronas en estas mismas regiones. Así mismo, se muestra en la región de núcleo accumbens (NAcc) Core, que la cerebrolisina aumentó el número de neuronas en esta área en ratas LNHV (ANOVA dos vías, interacción de la lesión con Cbl; $F_{1, 12} = 5.8$, $P < 0.05$) en comparación con el grupo de ratas LNHV-vehículo, las cuáles no manifiestan una reducción de células como se presenta en la CPFm y en la amígdala basolateral (Fig. 25). Es interesante señalar, que la respuesta encontrada en CPu fue totalmente opuesta a la que se presenta en la CPFm. la amígdala basolateral y el Nacc centro, debido a que las ratas LNHV tratadas con cerebrolisina presentan una disminución de

neuronas en esta zona en comparación con las ratas LNHV que recibieron vehículo (ANOVA dos vías, lesión; $F_{1, 12} = 18.6$, $P < 0.01$; Cbl; $F_{1, 12\ 23} = 18.7$, $P < 0.01$; interacción de la lesión con Cbl; $F_{1, 12} = 13$, $P < 0.01$) (Fig. 26). Además, la lesión no generó ningún efecto significativo en el número de neuronas en las regiones de NAcc centro y CPu (Fig. 25 y 26). Finalmente la zona del Nacc coraza no presentó cambios significativos en el número de neuronas en ninguno de los grupos estudiados (Fig. 24).

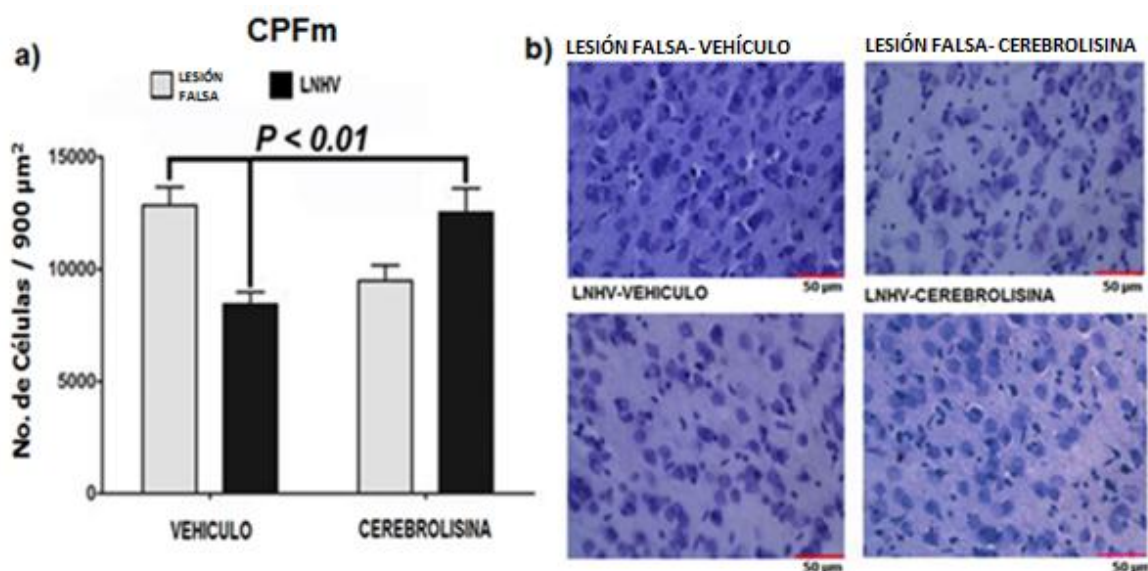


Figura 22. Análisis estereológico de neuronas de la corteza media prefrontal (CPFm). a) Representación grafica de la cuantificación de neuronas de la CPFm, ($n = 5$ animales por grupo). Se observa una disminución de neuronas en el grupo LNHV-vehículo, dicho efecto se revierte con el tratamiento con cerebrolisina en los animales LNHV que recibieron el fármaco. b) Fotomicrografías de las neuronas teñidas con violeta de cresilo mediante la tinción de Nissl en cada uno de los grupos estudiados.

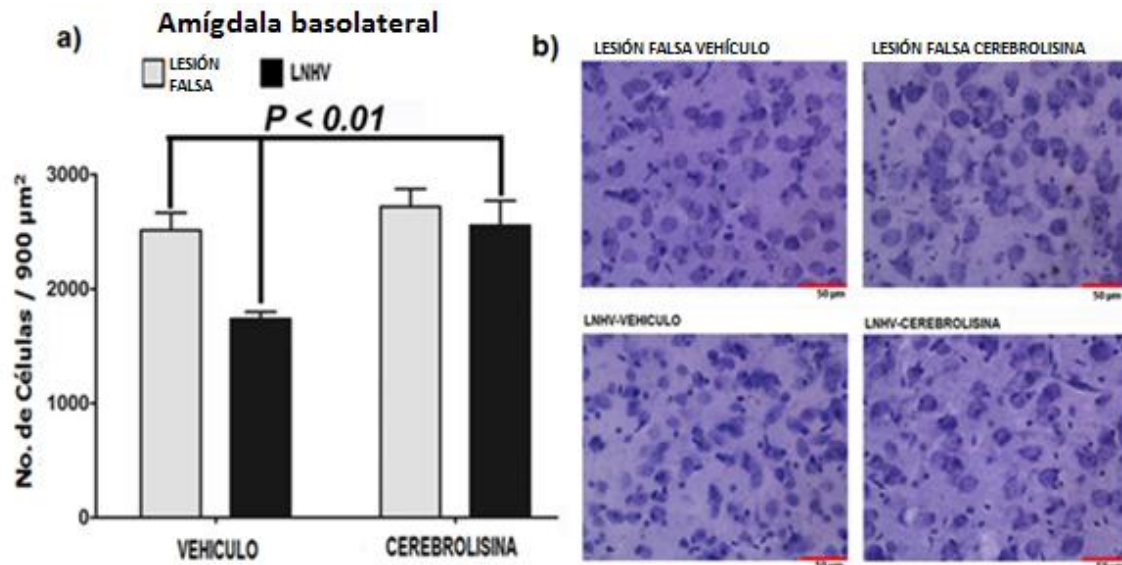


Figura 23. Análisis estereológico de neuronas de la amígdala basolateral. a) Representación grafica de la cuantificación de neuronas de la amígdala basolateral, ($n = 5$ animales por grupo). Se observa una disminución de neuronas en el grupo LNHV-vehículo, dicho efecto se revierte con el tratamiento con cerebrolisina en los animales LNHV que recibieron el fármaco. b) Fotomicrografías de las neuronas teñidas con violeta de creilo mediante la tinción de Nissl en cada uno de los grupos estudiados.

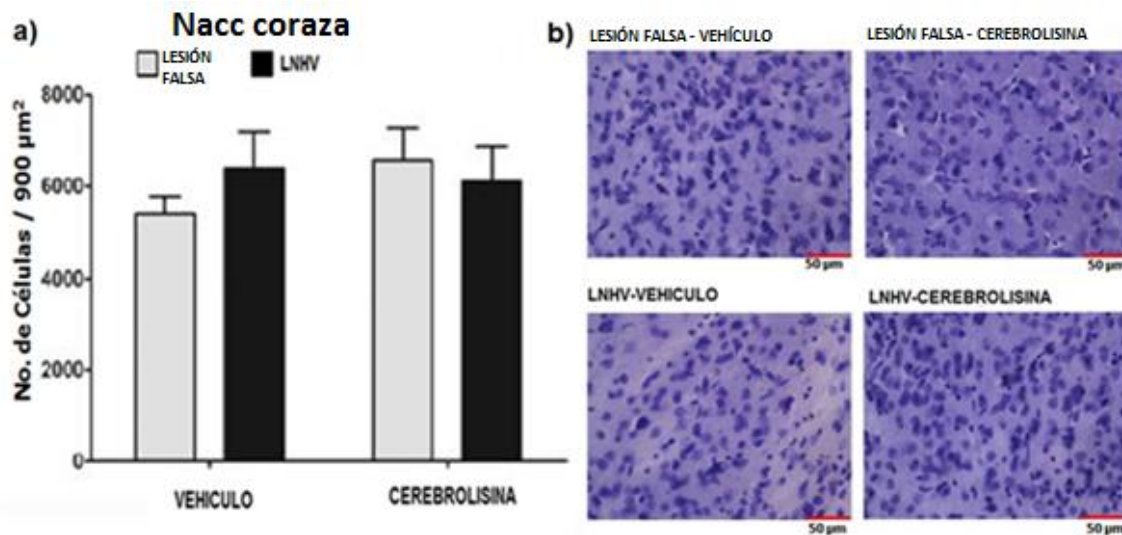


Figura 24. Análisis estereológico de neuronas del núcleo accumbens coraza. a) Representación grafica de la cuantificación de neuronas del Nacc coraza, ($n = 5$ animales por grupo). No se observan diferencias significativas en ninguno de los grupos analizados. b) Fotomicrografías de las neuronas teñidas con violeta de creilo mediante la tinción de Nissl en cada uno de los grupos estudiados.

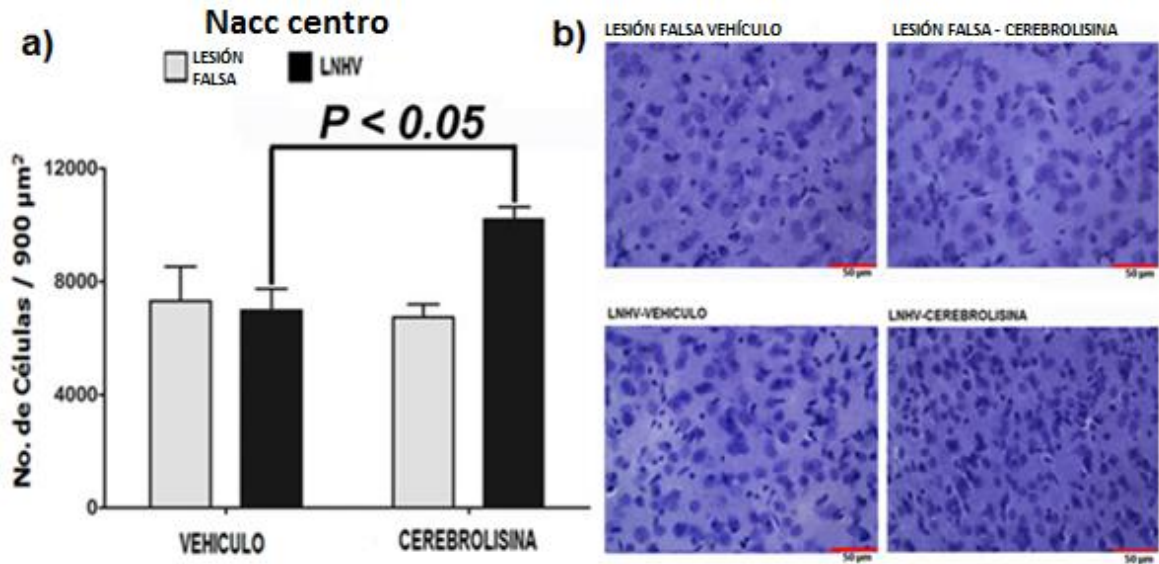


Figura 25. Análisis estereológico de neuronas del núcleo accumbens centro. a) Representación grafica de la cuantificación de neuronas del Nacc centro, ($n = 5$ animales por grupo). Se muestra que la cerebrolisina está incrementando el número de neuronas en esta área en ratas LNHV en comparación con el grupo de ratas LNHV-vehículo, las cuáles no manifiestan una reducción de células. b) Fotomicrografías de las neuronas teñidas con violeta de cresilo mediante la tinción de Nissl.

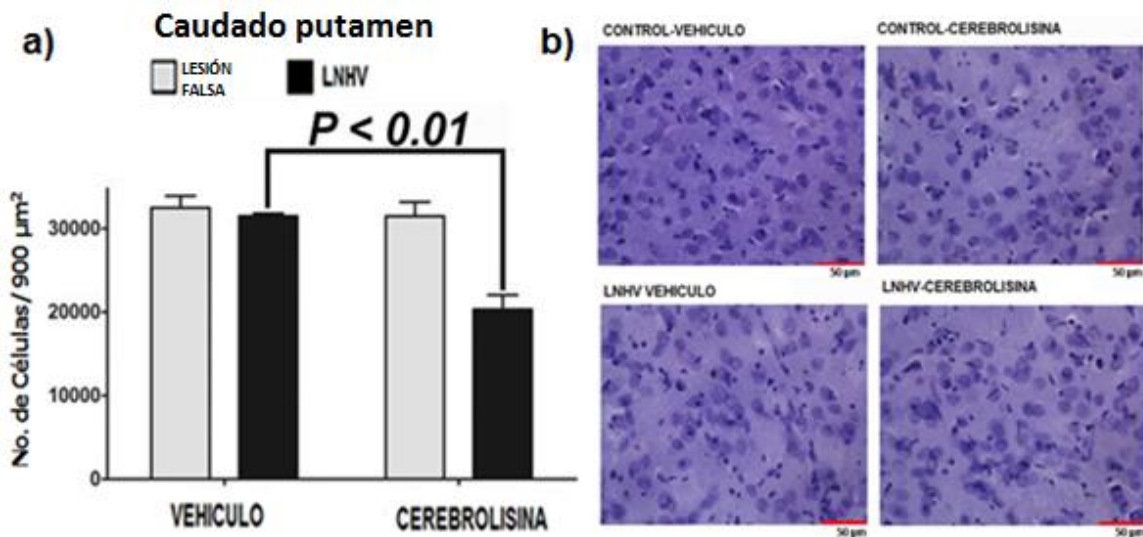


Figura 26. Análisis estereológico de neuronas del caudado putamen. a) Representación grafica de la cuantificación de neuronas del CPu, ($n = 5$ animales por grupo). Se muestra que la cerebrolisina está disminuyendo el número de neuronas en ratas LNHV en comparación con el grupo de ratas LNHV-vehículo b) Fotomicrografías de las neuronas teñidas con violeta de cresilo mediante la tinción de Nissl en cada uno de los grupos estudiados.

6.6 Análisis de la densidad de tirosina hidroxilasa.

De acuerdo con los cambios conductuales y neuroanatómicos inducidos por el efecto de la lesión neonatal del hipocampo ventral, se ha sugerido que existe un incremento en la función dopaminérgica en el Nacc (Lipska y cols., 1993; Flores y cols., 1996a; Brake y cols., 1999). Los resultados muestran que esta hiperactividad dopaminérgica se encuentra expresada en la región del NAcc Shell, sin cambios en el Nacc centro y en el CPu. Dicha alteración fue encontrada al medir la cantidad de tirosina hidroxilasa en estas regiones, la cual es una enzima indispensable para la síntesis de dopamina. Los resultados muestran que existe un incremento de tirosina hidroxilasa en las ratas LNHV-vehículo en el Nacc coraza (ANOVA, interacción de la lesión con Cbl; $F_{1, 12} = 30$, $P < 0.001$) comparadas con las ratas controles-vehículo ($P < 0.01$) (Fig. 27a). Esta alteración no se presenta en el Nacc centro y CPu en estos mismos animales (Fig. 27c y 28a). Sin embargo, es interesante señalar que la cerebrolisina disminuye esta hiperexpresión de la tirosina hidroxilasa en las ratas LNHV-cerebrolisina comparadas con las ratas LNHV-vehículo ($P < 0.05$) (Fig. 27a).

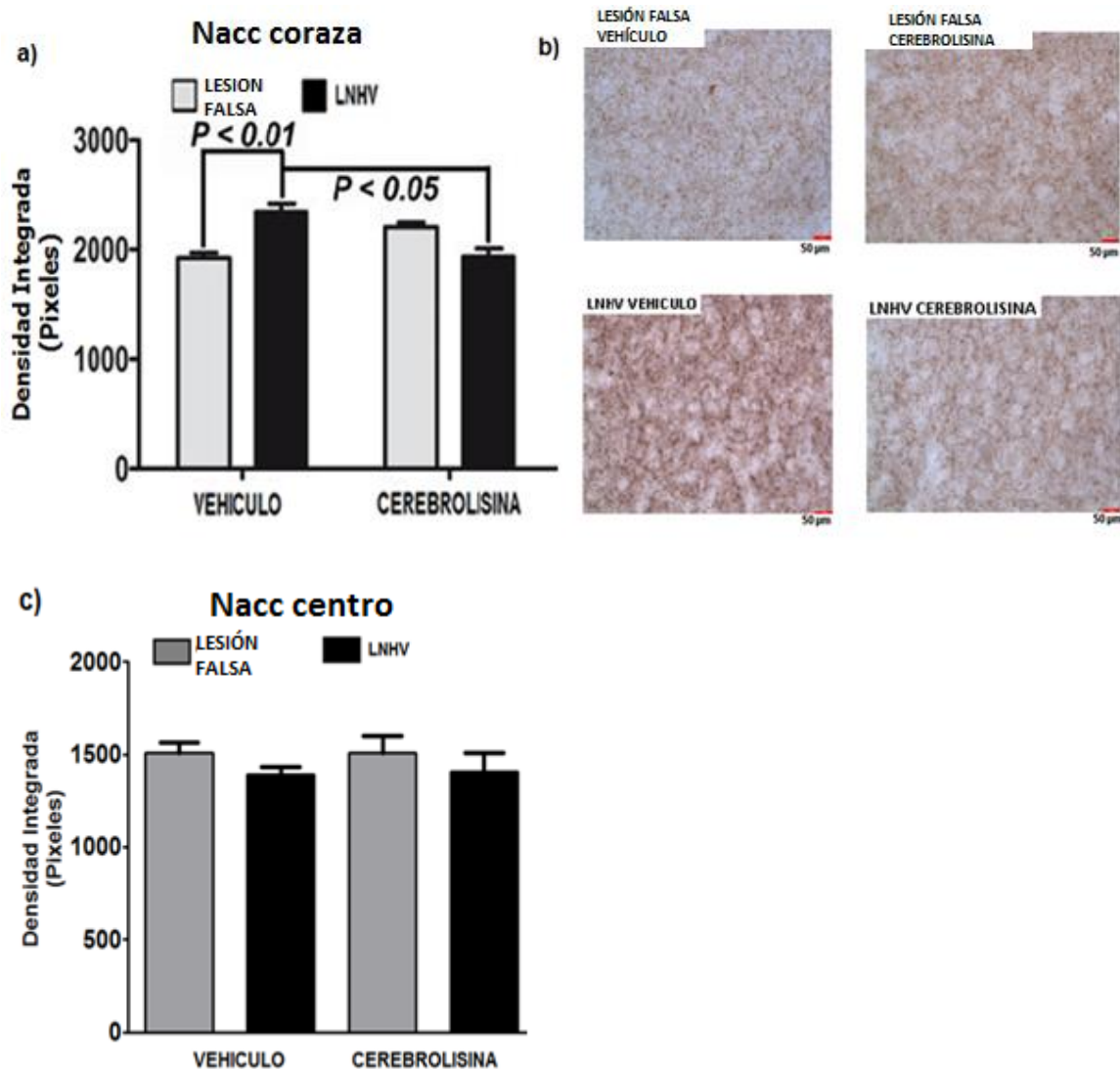


Figura 27. a) Análisis de densidad para la cuantificación de tirosina hidroxilasa en el Nacc coraza ($n = 5$ animales por grupo), se observa un incremento de la expresión de esta enzima en las ratas LNHV-vehículo, dicho efecto se ve reducido por la cerebrolisina en el grupo de animales LNHV-cerebrolisina. b) Imágenes de microscopio óptico en donde se muestra la inmunohistoquímica realizada con un anticuerpo contra la tirosina hidroxilasa en el Nacc coraza. Representación gráfica del análisis de densidad para la cuantificación de tirosina hidroxilasa en el Nacc centro ($n = 5$ animales por grupo), no se encontraron cambios significativos en ninguno de los grupos experimentales.

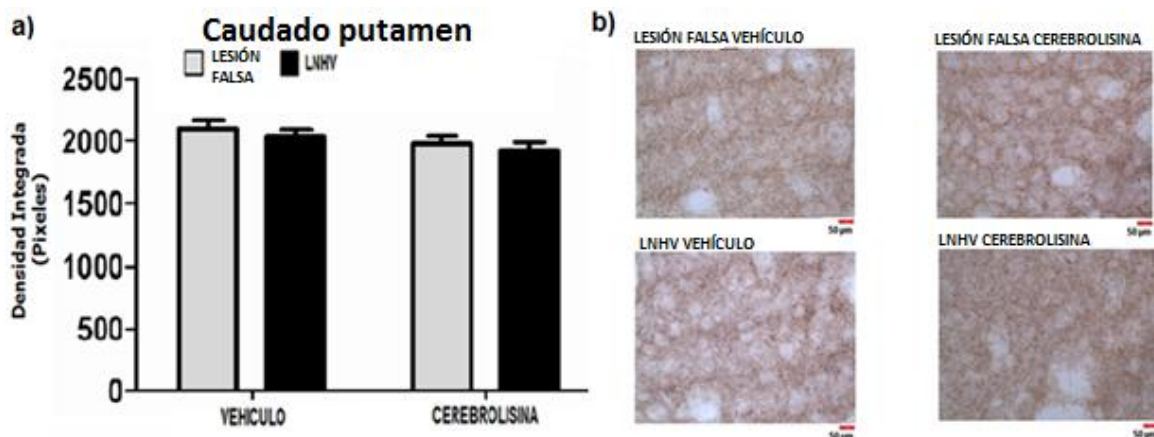


Figura 28. a) Análisis de densidad para la cuantificación de tirosina hidroxilasa en el CPu (n = 5 animales por grupo), no se encontraron cambios significativos en ninguno de los grupos experimentales. b) Imágenes de microscopio óptico en donde se muestra la inmunohistoquímica realizada con un anticuerpo contra la tirosina hidroxilasa en el CPu.

6.7 Verificación de la Lesión.

Los cortes histológicos coronales obtenidos de los animales LNHV a edad postpúber (PN60) fueron teñidos con violeta de cresilo mediante la técnica de tinción de Nissl para observar el daño bilateral provocado por la lesión realizada con el ácido iboténico en el hipocampo ventral (Fig. 29). Únicamente los animales con lesión bilateral en el hipocampo ventral fueron incluidos en este estudio. Los cerebros de los animales controles no muestran alteraciones morfológicas a este nivel.

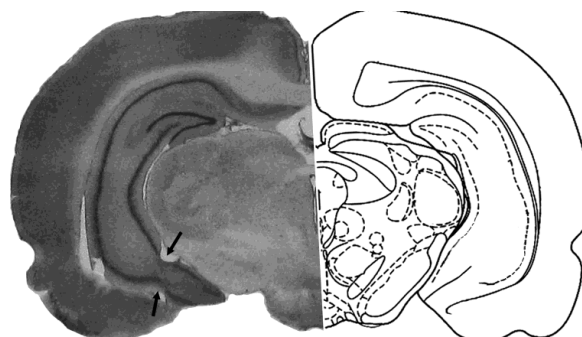


Figura 29. Fotografía de un corte coronal de un cerebro de rata LNHV teñido con violeta de cresilo a nivel del hipocampo ventral en donde se muestra una retracción de tejido, gliosis y pérdida neuronal a edad postpúber (PN60). Las Líneas indican la zona de la lesión

VII. Discusión.

Los resultados presentados en este trabajo han demostrado que la cerebrolisina disminuye las alteraciones conductuales inducidas por la lesión neonatal del hipocampo ventral a edad postpúber en la locomoción ante ambiente novedoso y la hiperlocomoción inducida por la aplicación de la anfetamina, así como en la interacción social y la inhibición por prepulso sobre la respuesta de sobresalto. Estas dos últimas deficiencias conductuales, concuerdan con estudios previos realizados en este modelo (Becker y cols., 1999; Le Pen y cols., 2003; Silva-Gomez y cols., 2003a; Flores y cols., 2005) y que a su vez también se manifiestan en pacientes esquizofrénicos (Tseng y cols., 2009). De manera consistente con estos hallazgos, los resultados presentados en este trabajo, demuestran que la cerebrolisina también tiene un efecto sobre la morfología dendrítica de las regiones límbicas estudiadas en ratas LNHV, en donde este fármaco revierte en parte la hipotrofia dendrítica generada por el efecto de la lesión neonatal del hipocampo ventral (LNHV). Asimismo, es importante mencionar que por primera vez mediante un análisis de cuantificación neuronal por estereología, se ha encontrado que la lesión neonatal del hipocampo ventral provoca una disminución en el número de neuronas de la CPFm y de la amígdala basolateral, y que dicho daño es revertido en gran medida por el tratamiento con cerebrolisina. De manera similar, se ha encontrado que la cerebrolisina reduce la hiperactividad dopaminérgica presente en las ratas LNHV, la cuál había sido reportada como responsable de algunas alteraciones conductuales relacionadas con la hiperlocomoción que se presenta en este modelo (Flores y cols., 1996; Wan y cols., 1996; Chrapusta y cols., 2003).

Se ha reportado que las ratas LNHV presentan a edad postpúber un incremento en la actividad locomotora ante ambiente novedoso y una alta hiperactividad locomotora cuando reciben un estímulo mediante la aplicación de anfetamina, dichas alteraciones han sido relacionadas fuertemente con la hiperactividad dopaminérgica presente en regiones mesolímbicas en este modelo animal

(Alquicer y cols., 2004; Flores y cols., 1996a, 2005b; Lispka y cols., 1993; Wan y cols., 1996; Brake y cols., 1999; Chrapusta y cols., 2003). El mecanismo por el cual la LNHV induce estas respuestas de hiperactividad en ambas condiciones aún no está determinado, sin embargo varios estudios han reportado que dichos cambios conductuales están relacionados con la hiperactividad dopaminérgica del sistema mesolímbico, debido a que el tratamiento con haloperidol y clozapina, los cuales son antagonistas dopaminérgicos, producen un efecto supresor sobre la hiperactividad de las ratas LNHV bajo las condiciones antes mencionadas (Lispka y Weinberger, 1994; Negrete-Díaz y cols., 2010). De manera interesante, hemos visto en los resultados del presente estudio que el incremento de tirosina hidroxilasa (TH) en el Nacc coraza fue revertido por la cerebrolisina en los animales LNHV. Además, se encontró que la cerebrolisina disminuye la deficiencia en la inhibición por prepulso mostrada en las ratas LNHV.

Como se sabe, la inhibición por prepulso (PPI) es una prueba que nos indica la capacidad de un individuo para filtrar la información sensorial. Esta alteración conductual es característica de los pacientes esquizofrénicos, la cual, se ha demostrado que puede ser revertida por algunos antipsicóticos (Kumari y Sharma, 2002) e inducida con tratamientos farmacológicos utilizando agonistas de receptores dopaminérgicos y antagonistas de los receptores glutamatérgicos (Geyer y cols., 2001), o bien por efecto de la LNHV (Lipska y cols., 1995). Por otro lado, se ha demostrado que, antagonistas dopaminérgicos como la clozapina o la risperidona atenúan significativamente el déficit de la inhibición por prepulso (PPI) inducido por la LNHV (Le Pen y Moreau, 2002; Rueter y cols., 2004). Por todo lo anterior, se ha sugerido que la LNHV promueve una hiperactividad dopaminérgica en el sistema mesolímbico, la cual, se ve reflejada en una deficiencia de la respuesta de la inhibición por prepulso, esta alteración conductual, fue revertida en las ratas LNHV cuando fueron tratadas con cerebrolisina.

Como se ha señalado anteriormente en los antecedentes de este trabajo, los pacientes esquizofrénicos presentan lo que se conoce como síntomas negativos,

tales como: alogia, apatía, y una disminución de la interacción social. El modelo de LNHV ha mostrado también que induce a una reducción de la interacción social en los animales lesionados (Sams-Dodd et al., 1997; Becker et al., 1999). Dentro de los resultados mostrados en este trabajo, hemos visto que las ratas LNHV-vehículo manifestaron una disminución en el tiempo total de interacción social y que de manera importante dicha deficiencia fue revertida en las ratas LNHV que recibieron el tratamiento con cerebrolisina. La deficiencia de la interacción social inducida por el efecto de la lesión, puede ser explicada por la hiperactividad dopaminérgica, debido a que se ha demostrado que el tratamiento sincrónico con clozapina incrementa el tiempo de contactos en la prueba de interacción social en ratas LNHV (Becker y Grecksch, 2003).

Los efectos de la cerebrolisina demostrados en las pruebas conductuales de las ratas LNHV en etapa postpúber, podrían deberse a la capacidad de la cerebrolisina de promover la regeneración dendrítica en regiones en donde la lesión induce una hipotrofia en las dendritas de algunas regiones tales como la CPFm, el Nacc (Flores y cols., 2005a, Alquicer y cols., 2008) y recientemente reportado en este estudio, la amígdala basolateral. Estudios recientes han señalado que las alteraciones neuroanatómicas en dichas áreas son las responsables de algunos síntomas conductuales en pacientes esquizofrénicos (Tseng y cols. 2009). También se sabe que las aferencias excitadoras de la CPFm provienen del area ventral tegmental, la cual es una de las vías dopaminérgicas más importantes del sistema mesolímbico (Sesack y Pickel, 1992). Por otra parte, se sabe también que el Nacc es la estructura principal del estriado ventral, la cual es una de las regiones que desempeña una función muy importante en la integración de la información límbica y motora (Meredith y Totterdell, 1999). Las principales neuronas del Nacc son las neuronas espinosas medianas, las cuales reciben información glutamatérgica proveniente del subículo ventral del hipocampo, de la amígdala basolateral, de la corteza prefrontal y del núcleos talámicos intralaminares (Christie y cols., 1985 McDonald, 1991; Berendse y cols., 1992). Estas distintas vías glutamatérgicas mantienen

conexiones tanto con la zona central del Nacc llamada centro, como con la periferia del Nacc conocida como coraza, de manera que dichas conexiones pueden estar estableciendo circuitos de entrada y de salida que puedan modular las respuestas generadas por la información proveniente de las zonas límbicas y motoras (Groenewegen y cols., 1999). Por otra parte, estudios recientes sugieren que la dopamina tiene un efecto dual sobre las conexiones entre la amígdala basolateral y la CPFm mediante la vía del área ventral tegmental (Floresco y Tse, 2007), debido a que la activación de los receptores dopaminérgicos D_2 y D_4 reducen la inhibición de las neuronas de la CPFm causada por la amígdala basolateral, mientras que la activación de los receptores D_1 disminuyen la actividad de las neuronas CPFm inducida por la amígdala basolateral. Sin embargo, el efecto más importante de la estimulación de la Amígdala Basolateral es una inhibición de la actividad de las neuronas CPFm (Dilgen y O'Donnell, 2006). De manera interesante, se ha sugerido que, la lesión de la amígdala basolateral puede alterar la actividad del área ventral tegmental sobre las conexiones entre la Amígdala y la CPF induciendo alteraciones en el control emocional y la función cognitiva.

Se han demostrado que la cerebrolisina tiene efectos sobre la arborización dendrítica en un modelo de estrés crónico en cultivo celular (Hartbauer y cols., 2001). Después de cuatro días en cultivo celular se cuantificó el crecimiento de las neuronas de telencéfalo de embrión de pollo en donde se demostró un efecto promotor de la cerebrolisina sobre el crecimiento de estas neuronas. Además, en contraste con la degeneración observada después de ocho días en células tratadas con una solución de aminoácidos sintéticos, las células tratadas con cerebrolisina presentaron una importante diferenciación neuronal, que incluso fue mayor a la presentada por las células tratadas con el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Estos resultados sugieren el papel neurotrófico de la cerebrolisina que podría deberse a la estabilización de la proteína asociada al microtúbulo 2 MAP2. También se ha demostrado en modelos de excitotoxicidad (Hutter-Paier y cols., 1996) en donde la cerebrolisina estimula un aumento en la

expresión de la MAP2. Además, es importante mencionar que se han obtenido algunos resultados en donde las ratas LNHV tratadas con vehículo presentan una disminución en la expresión de MAP2 y que la cerebrolisina disminuye esta deficiencia en este mismo modelo animal (datos no publicados Vazquez-Roque R, Masliah E. y Flores G.). El mecanismo por el cual la cerebrolisina induce un incremento en la expresión de la MAP2 aún no es claro, sin embargo, un estudio reciente demostró que en un modelo de ratón transgenico Mecp^{2308/Y} relacionado con el síndrome de Rett la proteína MAP2 se encuentra reducida a nivel de los ganglios basales, pero el tratamiento con cerebrolisina en dichos animales disminuye en gran medida dicho daño (Doppler y cols, 2008).

Finalmente, en neuronas del hipocampo y CPF han demostrado que factores ambientales en donde existe alguna privación, genera una hipotrofia neuronal y una pérdida de espinas dendríticas provocando alteraciones cognitivas en tareas controladas con cada una de dichas estructuras (Silva-Gomez y cols., 2003b). Además, se ha encontrado mediante estudios posmortem que existe una disminución de las dendritas y de las espinas de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal en cerebros de pacientes con alguna enfermedad mental como la esquizofrenia (Glantz y Lewis, 2000; Lewis y cols., 2003). Por otro lado, varios estudios sobre el efecto farmacológico de la cerebrolisina sugieren que este fármaco previene alteraciones dendríticas e induce una recuperación de la hipotrofia dendrítica, por lo que con base en estos resultados podemos sugerir que la cerebrolisina podría inducir una recuperación en las alteraciones neuronales que se presentan en zonas tales como la CPFm, la amígdala basolateral y el Nacc en pacientes esquizofrénicos y que son las responsables de la manifestación de los síntomas característicos de esta enfermedad. Por todo esto, los presentes resultados sugieren la posibilidad de la utilización de la cerebrolisina en tratamientos dirigidos para pacientes con esquizofrenia.

VII Conclusiones.

- La cerebrolisina a edad postpúber revierte alteraciones conductuales presentadas en el modelo de lesión neonatal del hipocampo ventral, tales como la actividad locomotora ente ambiente novedoso, la actividad locomotora inducida por la aplicación de anfetamina, la interacción social y la respuesta de inhibición de prepulso.
- La cerebrolisina a edad postpúber disminuye la hipotrofia dendrítica causada por el efecto de la lesión neonatal del hipocampo ventral presentada en regiones del sistema límbico tales como: la amígdala basolateral, el núcleo accumbens y la corteza media prefrontal Capa III y V.
- La cerebrolisina disminuye la pérdida de la densidad neuronal en ratas LNHV en áreas de la CPFm, el núcleo accumbens centro y la amígdala basolateral.
- La cerebrolisina revierte la hiperactividad dopaminérgica en el núcleo accumbens corea ocasionada por el efecto de la lesión neonatal del hipocampo ventral.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Akbarian S, Grüsser OJ, Guldin WO. 1993. Corticofugal projections to the vestibular nuclei in squirrel monkeys: further evidence of multiple cortical vestibular fields. *J Comp Neurol.* Jun 1;332(1):89-104.
2. Altshuler LL, Conrad A, Kovelman JA, Scheibel A., 1987. Hippocampal pyramidal cell orientation in schizophrenia. A controlled neurohistologic study of the Yakovlev collection. *Arch Gen Psychiatry.* Dec;44(12):1094-8.
3. Alquicer G, Silva-Gomez AB, Peralta F, Flores G., 2004. Neonatal ventral hippocampus lesion alters the dopamine content in the limbic regions in postpuberal rats. *Int J. Dev. Neurosci.* 22:103–111.
4. Alquicer G, Morales-Medina JC, Quirion R, Flores G., 2008. Postweaning social isolation enhances morphological changes in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of psychosis. *J. Chem. Neuroanat.* 35:179–187.
5. Alvarez XA, Cacabelos R, Laredo M, Couceiro V, Sampedro C, Varela M, Corzo L, Fernandez-Novoa L, Vargas M, Aleixandre M, Linares C, Granizo E, Muresanu D, Moessler H., 2006. A 24-week, double-blind, placebo-controlled study of three dosages of cerebrolysin in patients with mild to moderate Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* 13:43–54.
6. Amaral D. G., 1990. Hippocampal formation. In Paxinos, G. The human nervous system. San Diego: Academic. Press, pp. 711-755.
7. Andreasen N. C. y O'Leary D.S., 1997. Hypofrontality in schizophrenia distributed dysfunction circuits in neuroleptic naive patient. *Lancet.* 329: 1730-1734.
8. Andreasen N. C., 2000. Schizophrenia: the fundamental questions. *Brain Research Reviews.* 31: 106-112.
9. Bahena R. T. y Flores G., 2000. Dopamina: síntesis, liberación y receptores en el sistema nervioso central. *Review Biomedicine* 11:39-60.
10. Barbas H., 2000. Connections underlying the synthesis of cognition, memory, and emotion in primate prefrontal cortices. *Brain Research Bulletin.* 5: 319-330.
11. Becker A, Grecksch G, Bernstein H, Höllt V, Bogerts B., 1999. Social behavior in rats lesioned with ibotenic acid in the hippocampus: quantitative and qualitative analysis. *Psychopharmacology* 144:333–338.

12. Berendse HW, Galis-de-Graaf Y, Groenewegen HJ., 1992. Topographical organization and relationship with ventral striatal compartments of prefrontal corticostriatal projections in the rat. *J Comp Neurol* 316: 314–347.
13. Boado R., 1995. Brain-derived peptides regulate the steady state levels and increase stability of the blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter mRNA. *Neurosci Lett* 197: 179-182,
14. Bouwmeester H., Wolterink, G. y Van Ree, J.M., 2002. Neonatal development of projections from the basolateral amygdala to prefrontal, striatal, and thalamic structures in the rat. *J. Comp. Neurology* 442: 239-249.
15. Braff D. L., Geyer M. A., 1990. Sensorimotor gating and schizophrenia, human and animal model studies. *Arch. Gen. Psychiatry.* 47: 181-188.
16. Brake WG, Sullivan RM, Flores G, Srivastava LK, Gratton A., 1999. Neonatal ventral hippocampal lesions attenuate the nucleus accumbens dopamine response to stress: an electrochemical study in the adult rat. *Brain Res* 831:25–32.
17. Bubser M., y Schmidt WJ., 1990. 6-Hidroxydopamine lesion of the rat prefrontal cortex increases locomotor activity, impair aquisition of delayed alternation tasks, but does not affect uninterrupted tasks in the radial maze. *Behavior Brain research* 37: 157-168.
18. Buckland G., Buckland J., Jamieson C. y Ison J., 1969. Inhibition of startle response to acoustic stimulation produced by visual prestimulation. *Journal of Comparative and Psychophysiology.* 67:493-496.
19. Cannon M., Jones P.B., y Murray R.M., 2002. Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *J. Psychiatry.* 159: 1080-1092.
20. Chrapusta SJ, Egan MF, Wyatt RJ, Weinberger DR, Lipska BK., 2003. Neonatal ventral hippocampal damage modifies serum corticosterone and dopamine release responses to acute footshock in adult Sprague-Dawley rats. *Synapse* 47:270–277.
21. Christie MJ, James LB, Beart PM., 1985. An excitant amino acid projection from the medial prefrontal cortex to the anterior part of nucleus accumbens in the rat. *J Neurochem* 45:477–482.
22. Daenen E.W., Van der Heyden, J.A., Kruse, C.G., Wolterink, G. y Van Ree J.M., 2001. Adaptation and habituation to an open field and responses to

various stressful events in animals with neonatal lesions in the amygdala or ventral hippocampus. *Brain Research* 918: 153-165.

23. Daenen E.W., Wolterink, G., Van Der Heyden, J.A., Kruse, C.G. y Van Ree J.M., 2003. Neonatal lesions in the amygdala or ventral hippocampus disrupt prepulse inhibition of the acoustic startle response; implications for an animal model of neurodevelopmental disorders like schizophrenia. *Eur. Neuropsych.* 13:187-197.
24. Daenen .EW., Wolterink, G. y Van Ree, J.M., 2005 Hyperresponsiveness to phencyclidine in animals lesioned in the amygdala on day 7 of life. Implications for an animal model of schizophrenia. *Europe Neuropsychopharmacol.* 13: 273-279.
25. Damasio A.R., 1997. Towards a neuropathology of emotion and mood. *Nature.* 386: 769-770.
26. De Lisi L.E., 2000. Critical overview of current approaches to genetic mechanisms in schizophrenia research. *Brain Research Reviews.* 31: 187-192.
27. Diergaarde L., Gerrits, M.A., Brouwers, J.P. y van Ree, JM., 2005. Early amygdala damage disrupts performance on medial prefrontal cortex-related tasks but spares spatial learning and memory in the rat. *Neuroscience* 130: 581-590.
28. Drevets W.C., 2000. Functional anatomical abnormalities in limbic and prefrontal cortical structures in major depression. *Prog. Brain Research.* 126: 413-431.
29. Durany N., Zöchling R., 2000. Human post-mortem striatal $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor density in schizophrenia and Parkinson`s syndrome. *Neuroscience Letters* 287: 109-112.
30. Duvernoy H.M., 1988. The human hippocampus: An atlas of applied anatomy. Munich: J.F. Bergmann Verlag, p. 166.
31. Doppler E, Rockenstein E, Ubhi K, Inglis C, Mante N, Adame A, Crews L, Hitzl M, Moessler H, Masliah E., 2008. Neurotrophic effects of cerebrolysin in the Mecp2308/Y transgenic model of Rett syndrome. *Acta Neuropathol* 116:425–437.
32. Fernandez-Espejo E., 2000. How does the nucleus accumbens tick?. Review. *Neurology.* 30: 845-849.
33. Flores G., Valencia, J., Rosales, M., Sierra, A. y Aceves, J., 1993. Appearance of EMG activity and motor asymmetry after unilateral lesions of the

dopaminergic innervation to the subthalamic nucleus in the rat. *Neuroscience Letters* 1462: 153-156

34. Flores G, Wood GK, Liang JJ, Quirion R, Srivastava LK., 1996. Enhanced amphetamine sensitivity and increased expression of dopamine D₂ receptors in postpubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the medial prefrontal cortex. *J. Neuroscience* 16: 7366-7375.
35. Flores G., Barbeau D., Quirion R., Srivastava L.K., 1996a. Decreased binding of dopamine D3 receptors in limbic subregions after neonatal bilateral lesion of rat hippocampus. *J Neuros.* 16:2020-2026.
36. Flores G., Flores, J., Mena, R. y Valencia, J., 2002. Mutant Taipei rats exhibit an increase in D1 binding in basal ganglia. *Brain Research.* 956: 24–29.
37. Flores G, Alquicer G, Silva-Gomez AB, Zaldivar G, Stewart J, Quirion R, Srivastava LK., 2005a. Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Neuroscience* 133:463–470.
38. Flores G, Silva-Gomez AB, Ibanez O, Quirion R, Srivastava LK., 2005b. Comparative behavioral changes in postpubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus and the prefrontal cortex. *Synapse* 56:147–153.
39. Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR., 2001. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology* 156:117–154.
40. Gilboa A., Shalev, A.Y., Laor, L., Lester, H., Louzoun, Y., Chisin, R. y Bonne, O., 2004. Functional connectivity of the prefrontal cortex and the amygdala in posttraumatic stress disorder. *Biology Psychiatry.* 55: 263-272.
41. Glantz LA, Lewis DA., 2000. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57:65–73.
42. Goto Y, Grace AA. 2008. Limbic and cortical information processing in the nucleus accumbens. *Trends Neurosci* 31:552–558.
43. Grandy D. K., Marchionni, M. A., Makam, H., Stofko, R. E., Alfano, M., Frothingham, L., Fischer, J. B., Burke-Howie, K. J., Bunzow, J. R. y Server, A. C., 1989. Cloning of the cDNA and gene for a human D₂ dopamine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 9762-9766.

44. Grandy D. K., Zhang, Y., Bouvier, C., Zhou, Q.-Y., Johnson, R. A., Allen, L., Buck, K., Bunzow, J. R., Salon, J. y Civelli, O., 1991. Multiple human D₅ dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9175-9179.
45. Graveland G. A., y DiFiglia M., 1985. The frequency and distribution of medium sized neurons with indented nuclei in the primate and rodent neostriatum. *Brain Research*. 327: 308-311.
46. Gray T.S., 1999. Functional and anatomical relationships among the amygdala, basal forebrain, ventral striatum, and cortex. An integrative discussion. *Ann N. Y. Acad. Science* 877: 439-444.
47. Greschwind N. y Galaburda A. M., 1985. Cerebral lateralization Biological mechanisms, associations, and pathology. *Arch. Neurology*. 42: 521-552.
48. Groenewegen HJ, Wright CI, Beijer AV, Voorn P., 1999. Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877:49–63.
49. Harrison P. J., 1999. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain Research*. 122, 593-624.
50. Hartbauer M, Hutter-Paie B, Windisch M., 2001. Effects of cerebrolysin on the outgrowth and protection of processes of cultured brain neurons. *J. Neural. Transm.* 108:581–592.
51. Hernández López S., 1997. D1 receptor activation enhances evoked discharged in neostriatal medium spiny neurons by modulating an L-type C²⁺ conductance. *J. Neuroscience* 17: 3334-3342.
52. Hutter-Paier B, Grygar E, Windisch M., 1996. Death of cultured telencephalon neurons induced by glutamate is reduced by the peptide derivative cerebrolysin. *J. Neural. Transm. Suppl.* 47:267–273.
53. Jackson D. M., y Westlind-Danielsson, A., 1994. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioral aspects. *Pharmacology Ther.* 64: 291-369.
54. Kebabian J. W. y Calne, D. B., 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277, 93-96.
55. Kumari V, Sharma T., 2002. Effects of typical and atypical antipsychotics on prepulse inhibition in schizophrenia: a critical evaluation of current evidence and directions for future research. *Psychopharmacology* 162:97–101.

56. Laitinen J. T.. 1993. Dopamine stimulates K⁺ efflux in the chick retina via D₁ receptors independently of adenylyl cyclase activation. *J. Neurochem.* 61: 1461-1469.
57. Laruelle M., Abi-Dargham A. y Gil R., 1999. Increased dopamine transmission in schizophrenia: Relationship to illness phases. *Biology Psychiatry.* 46: 56-72.
58. Le Pen G, Kew J, Alberati D, Borroni E, Heitz MP, Moreau JL., 2003. Prepulse inhibition deficits of the startle reflex in neonatal ventral hippocampal-lesioned rats: reversal by glycine and a glycine transporter inhibitor. *Biol Psychiatry* 54:1162–1170.
59. Levine M.S., 1996. Neuromodulatory actions of dopamine on synaptically-evoked neostriatal responses in slices. *Synapse* 24: 65-78.
60. Lewis D., Glantz L. y Pierri J., 2003. Altered cortical glutamate neurotransmission in Schizophrenia. *Ann N. Y. Acad. Science.* 1003: 102-112.
61. Lipska B.K., Jaskiw G.E., Chrapusta S., Karoum F., Weinberger D.R., 1992. Ibotenic acid lesion of the ventral hippocampus differentially affects dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens and prefrontal cortex in the rat. *Brain Res.* 585: 1-6.
62. Lipska B.K., Jaskiw G.E., Weinberger D.R., 1993. Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* 9:67-75.
63. Lipska BK, Weinberger DR., 1994. Subchronic treatment with haloperidol and clozapine in rats with neonatal excitotoxic hippocampal damage. *Neuropsychopharmacology* 10:199–205.
64. Lipska BK, Weinberger DR., 1995. Genetic variation in vulnerability to the behavioral effects of neonatal hippocampal damage in rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:8906–8910.
65. Lipska BK, Weinberger DR., 2000. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology* 23:223–239.
66. Lipska B.K., Weinberger D.R., 2002. A neurodevelopmental model of schizophrenia: neonatal disconnection of the hippocampus. *Neurotox Res* 4:469–475.

67. Liu Y. F., Civelli, O., Zhou, Q.-Y. y Albert, P. R., 1992. Cholera toxin-sensitive 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and calcium signals of the human dopamine-D₁ receptor: selective potentiation by protein kinase A. *Mol. Endocrinology*. 6: 1815-1824.
68. Masliah E, Armasola F., Veinbergs I, Mallory M, 1999. Cerebrolysin ameliorates performance deficits, and neuronal damage in apolipoprotein E-deficient mice. *Pharmacol Biochem Behav* **62**: 239-245.
69. McAllister AK., 2000. Cellular and molecular mechanisms of dendrite growth. *Cereb Cortex* 10:963–973.
70. MacLean P.D., 1985. Brain evolution relating to family, play, and the separation call. *Archives of General Psychiatr.* 42: 405-417.
71. McDonald A.J., 1991. Organization of amygdaloid projections to the prefrontal cortex and associated striatum in the rat. *Neuroscience*. 44: 1-14.
72. McDonald A.J., 2003. Is there an amygdala and how far does it extend? *Ann N. Y. Acad. Science*. 985: 1-21.
73. Meredith G.E., Ypma, P., y Zahm, D., 1995. Effects of dopamine depletion on the morphology of medium spiny neurons in the shell and core of the rat nucleus accumbens. *J. Neuroscience*. 15: 3808-3820.
74. Meredith GE, Totterdel S., 1999. Microcircuits in nucleus accumbens' shell and core involved in cognition and reward. *Psychobiology* 27:165–186.
75. Missale C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M. y Caron, M.G., 1998. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiology Rev.* 78: 189-225.
76. Molteni R, Lipska BK, Weinberger DR, Racagni G, Riva MA., 2001. Developmental and stress-related changes of neurotrophic factor gene expression in an animal model of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 6:285–292.
77. Morgane P.J., Galler J. y Mokler D., 2005. A review of system and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Progress in Neurobiology*. Elsevier. 75: 143-160.
78. Negrete-Diaz JV, Baltazar-Gaytan E, Bringas ME, Vazquez-Roque RA, Newton S, Aguilar-Alonso P, Leon-Chavez BA, Flores G. 2010. Neonatal ventral hippocampus lesion induces increase in NO levels which is attenuated by subchronic haloperidol treatment. *Synapse* 64:941–947.

79. Niu L., Zhou, S. y Hagino, H., 2004. Volume reduction of the amígdala in patients with schizophrenia: a magnetic resonance imaging study. *Psychiatry Research: Neuroimaging*. 132: 41-51.
80. O'Donnell P. y Grace A.A., 1995. Synaptic interactions among excitatory afferents to nucleus accumbens neurons: hippocampal gating of prefrontal cortical input. *J. Neuroscience*. 15: 3622-3639.
81. O'Donnell P. y Grace A.A., 1996. Dopaminergic reduction of excitability in nucleus accumbens neurons recorded in vitro. *Neuropsychopharmacology*. 15: 87-98.
82. O'Donnell P. y Grace A.A., 1998. Phencyclidine interferes with the hippocampal gating of nucleus accumbens neuronal activity in vivo. *Neuroscience*. 87: 823-830.
83. O'Donnell P., Lewis B.L., Weinberger D.R. y Lipska B.K., 2002. Neonatal hippocampal damage alters electrophysiological properties of prefrontal cortical neurons in adult rats. *Cereb Cortex. Neuroscience* 12: 975-982.
84. Paré D., Royer, S., Smith, Y. y Lang, E.J. 2003. Contextual inhibitory gating of impulse traffic in the intra-amygdaloid network. *Ann N Y Acad. Science*. 985: 78-91.
85. Paxinos G. y Watson C., 1986 "The rat brain in stereotaxic coordinates" Academic Press. Fig. 16-20.
86. Pierce R.C. y Kumaresan, V. 2006. The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neuroscience Biobehavior Rev*. 30: 215-238.
87. Pitkanen A., Savander, V. y LeDoux J.E., 1997. Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: an emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends Neuroscience*. 20: 517-523
88. Pitkanen A., Savander M., Nurminen N. y Ylinen A., 2003. Intrinsic synaptic circuitry of the amygdala. *Ann N Y Acad. Science* 985: 34-49.
89. Price J.L., 2003. Comparative aspects of amygdala connectivity. *Ann N Y Acad. Science* 985: 50-58.
90. Rockenstein E, Torrance M, Mante M, Adame A, Paulino A, Rose JB, Crews L, Moessler H, Masliah E., 2006. Cerebrolysin decreases amyloid- β production by regulating amyloid protein precursor maturation in a transgenic model of Alzheimer's disease. *J Neurosci Res*. 83:1252-1261.

91. Rosenkranz J.A. y Grace A.A., 2002. Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons in vivo. *Journal Neuroscience* 22:324–337.
92. Sah P. y Lopez de Armentia, M., 2003. Excitatory synaptic transmisión in the lateral and central amygdala. *Ann N Y Acad. Science*. 985: 67-77.
93. Sams-Dodd F, Lipska BK, Weinberger DR., 1997. Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. *Psychopharmacology* 132:303–310.
94. Sesack SR, Pickel VM., 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.* 320:145–160.
95. Silva-Gomez AB, Bermudez M, Quirion R, Srivastava LK, Picazo O, Flores G., 2003a. Comparative behavioral changes between male and female postpubertal rats following neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Brain Res* 973:285–292.
96. Silva-Gomez AB, Rojas D, Juarez I, Flores G. 2003b. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. *Brain Res* 983:128–136.
97. Stevenson C.W. y Gratton A., 2003. Basolateral amygdala modulation of the nucleus accumbens dopamine response to stress: role of the medial prefrontal cortex. *Europe Journal Neuroscience*. 17:1287–1295
98. Swanson L.W., 2003. The amygdala and its place in the cerebral hemisphere. *Ann N Y Acad. Science*. 985, 174-184.
99. Swanson L.W. y Petrovich, G.D., 1998. What is the amygdala?. *Trends Neuroscience* 21: 323–331.
100. Swerdlow N. R. y Braff D. L., 1990. Schizophrenic like sensorimotor gating abnormalities in rats following dopamine infusion into the nucleus accumbens. *Psychopharmacology*. 101: 414-420.
101. Swerdlow N. R. y Caine S.B., 1992. Regionally selective effects on intracerebral dopamine infusion on sensorimotor gating of the startle reflex in rats. *Psychopharmacology*. 108: 189-185.
102. Tepper J. M. y Bolam J. P., 2004. Functional diversity and specificity of neostriatal interneurons. *Current Opinion in Neurobiology*. 14:685–692.

103. Terenius L., 2000. Schizophrenia: patophysiological mechanisms – a síntesis. Brain Research Review. 31: 200-204.
104. Tseng KY, Chambers RA, Lipska BK., 2009. The neonatal ventral hippocampal lesion as a heuristic neurodevelopmental model of schizophrenia. Behav Brain Res 204:295–305.
105. Torras M. y Portell, I. y Morgado I. 2001. La amígdala: implicaciones funcionales. Rev, Neurology 33: 471-476.
106. Tracy J. y Monaco C., 2001. Anticholinergic and cognitive processing in chronic schizophrenia. Biological Psychology. 56: 1-22.
107. Vallone D, Picetti R, Borrelli E. 2000. Structure and function of dopamine receptors. Neurosci Biobehav Rev. Jan;24(1):125-32.
108. Voorn P., Vanderschuren, J., Groenewegen, H., Robbins, T. y Pennartz, C., 2005. Putting a spin on the dorsal–ventral divide of the striatum. Trends Neuroscience 27: 468-474.
109. Wan RQ, Giovanni A, Kafka SH, Corbett R., 1996. Neonatal hippocampal lesions induced hyperresponsiveness to amphetamine: behavioral and *in vivo* microdialysis studies. Behav Brain Res 78:211–223.
110. Weiner D. M., Levey, A. I., Sunahara, R. K., Niznik, H. H., O'dowd, B. F., y Brann, M. R., 1991. Dopamine D₁ and D₂ receptor mRNA expression in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1859-1863.
111. Wolterink, G., Daenen, L.E., Dubbeldam, S., Gerrits, M.A., van Rijn, R., Kruse, C.G., Van Der Heijden, J.A. y Van Ree, J.M. 2001. Early amygdala damage in the rat as a model for neurodevelopmental psychopathological disorders. Europe Neuropsychopharmacol.11: 51-59.
112. Wong, A.H. y Van, Tol H.H., 2003. Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology. Neuroscience Biobehavior Review. 27: 269-306.
113. Yolken R.H., Karlson H., Yee F., Johnston-Wilson N.L. y Torrey E.F., 2000. Endogenous retroviruses and schizophrenia. Brain Research Reviews. 31: 193- 199.
114. Zhou Q. Y., Grandy, D. K., Thambi, L., Kushner, J. A., Van Tol, H.H.M, Cone, R., Pribnow, D., Salon, J., Bunzow, J. R., y Civelli, O., 1990. Cloning and expression of human and rat D₁ dopamine receptors. Nature 347: 76-80.
115. Zhou FM, Liang y, Dani J.A., 2001. Endogenous nicotinic cholinergic activity regulates dopamine release in the striatum. Nat. Neuroscience. 4:1224–1249.

116. Zhou F., Wilson C. J. y Dani J., 2002. Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *Neuroscience*. 10: 102-1015.