

UNIVERSIDAD DE
Belgrano

BUENOS AIRES - ARGENTINA

UNIVERSIDAD DE BELGRANO

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

“PRUEBA DE COMPORTAMIENTO EN UN MODELO DE
ESQUIZOFRENIA ANIMAL”

Alumno/a: Ayelén Cindy Fernández

Carrera: Farmacia (1404)

Matrícula: 2603

Tutora: María Graciela Lopez Ordieres

Agradecimientos

A mis padres por estar siempre, por darme todo y más, por haber formado la persona que soy ahora, y por su apoyo para poder seguir la carrera que tanto me apasiona.

A mi tutora, Dra. María Graciela Lopez Ordieres, por guiarme para realizar este trabajo, brindándome siempre su apoyo, dedicación, sabiduría, tiempo y paciencia.

A mis compañeras y amigas Belu, María Paz, Nanu, Lucía y Quimey, por compartir tantos momentos hermosos juntas y por ayudarme en cada paso de la carrera, sin ellas no hubiese sido lo mismo.

A todos los profesores que fueron parte de mi camino, por ayudarme e instruirme en mi formación.

Por último y más reciente, a mis compañeros de Farmacia Herrera no solo por darme tiempo y espacio para realizar esta tesina, sino también por guiarme en mis primeros pasos en farmacia comunitaria.

Índice

Resumen.....	4
Introducción	5
Objetivo General	7
Objetivos específicos.....	7
Hipótesis.....	8
Antecedentes	9
Tratamiento.....	12
Modelos animales de experimentación.....	15
“Las Tres R”	16
Modelos animales empleados para el estudio de la esquizofrenia	19
Modelo farmacológico	19
Modelos del neurodesarrollo.....	20
Modificaciones epigenéticas.....	22
Materiales y métodos	25
Reactivos	25
Animales.....	25
Evaluación del aprendizaje y de la memoria no espacial de largo término.....	26
Resultados.....	29
Discusión	38
Conclusión.....	42
Bibliografía	43

Resumen

La esquizofrenia es una enfermedad mental que es causada por una etiología multifactorial, lo que dificulta su estudio y tratamiento. El estudio de esta enfermedad presenta problemas éticos y logísticos. El empleo de modelos animales parece ser una solución aceptable. Existen diversos modelos animales que ayudan a los investigadores a conocer más sobre los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad y así poder estudiar nuevos tratamientos. El presente trabajo se enfoca en un modelo epigenético en ratones, que consiste en el tratamiento subcrónico de altas dosis de L- metionina. Posteriormente, para corroborar la eficacia del modelo animal, se evaluaron los cambios en la conducta animal observados en la tarea de reconocimiento de objetos en el campo abierto.

Abstract

Schizophrenia is a mental illness that is caused by a multifactorial etiology, making it difficult to study and treat. The study of this disease presents ethical and logistical problems. The use of animal models seems to be an acceptable solution. There are several animal models that help researchers learn more about the pathological mechanisms of the disease so that they can study new treatments. This work focuses on an epigenetic model in mice, consisting of subchronic treatment of high doses of L- methionine. Subsequently, to corroborate the effectiveness of the animal model, changes in animal behavior observed in the task of recognizing objects in the open field were evaluated.

Introducción

La perspectiva histórica demuestra cuán eficaz y esencial ha sido la utilización de los animales como sujetos de prueba. Se ha logrado salvar vidas y responder a diferentes preguntas biomédicas, a partir de esta práctica. La utilidad de los animales de investigación tiene como objetivo principal mejorar la comprensión tanto sobre los procesos fisiológicos como los patológicos (Briel M, y otros, Syst Rev. 2013). Los modelos animales pueden ser clasificados basándose en la fidelidad, es decir, lo bien que el modelo se asemeja a los humanos, también sobre la base de validez, es decir que tan bien se parece lo que está midiendo y adicionalmente basados en la fiabilidad, es decir, la precisión y exactitud de la medición.

Los modelos animales son simuladores fácilmente disponibles en el aprendizaje de procedimientos médicos. La formación de habilidades en estos modelos ha sido recomendada en varias técnicas complejas. La evidencia disponible nos sugiere que la práctica en modelos animales tiene una influencia favorable en la curva de aprendizaje y que facilita la adquisición de habilidades en técnicas complejas (Parra-Blanco A, González N, González R, Ortiz-Fernández-Sordo J, & Ordieres C., 2013).

Un modelo ideal debe poseer las siguientes características:

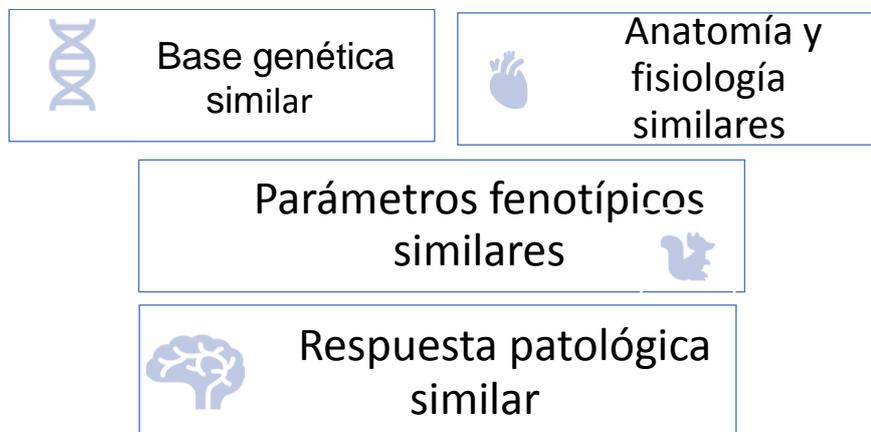


Figura 1. Características de un modelo animal ideal

Los estudios en animales ofrecen una amplia gama de posibilidades para examinar la toxicidad de las intervenciones o la patología en estudio, y mecanismos de la enfermedad (MacCallum CJ, 2010). Sin embargo, en ocasiones se presentan errores debidos a la dificultad para replicar los estudios preclínicos, a la existencia de sesgos de publicación y prácticas metodológicas que comprometen la validez de la investigación (Henderson VC, Kimmelman J, Fergusson D, Grimshaw JM, & Hackam DG, 2013).

Los modelos animales en psiquiatría constituyen una herramienta para la determinación de los sustratos neurobiológicos de los desórdenes psiquiátricos, aunque tienen la limitación de reproducir en un animal sano, conductas humanas muy complejas. A pesar de todo, se utilizan para comprender las bases biológicas de las enfermedades mentales y estudiar nuevos tratamientos farmacológicos (Genis AD & López Rubacava C, 2011)

Objetivo General

La esquizofrenia es una enfermedad mental que presenta una etiología multifactorial y compleja, la que dificulta su tratamiento y estudio, es por lo que, con el propósito de lograr una mejor comprensión de la enfermedad, se han desarrollado diversos modelos animales. En el presente trabajo se estudiará el comportamiento de animales sometidos a un modelo epigenético de esquizofrenia animal.

Objetivos específicos

- Analizar los modelos animales que más se utilizan en la investigación preclínica para el estudio de la esquizofrenia, sus ventajas y desventajas.
- Evaluar en el marco de un modelo epigenético de esquizofrenia la conducta de los animales en un campo abierto en la tarea discriminación de objetos.

Hipótesis

La expectativa para este trabajo experimental es poder determinar, a través de la observación visual si:

Hi El comportamiento de los ratones (administrados con L-metionina) corresponde a síntomas de la esquizofrenia.

Ho El comportamiento de los ratones (administrados con L-metionina) no corresponde a síntomas de la esquizofrenia.

Ha El comportamiento de los ratones (administrados con L-metionina) corresponde a síntomas de la esquizofrenia de forma muy significativa.

Antecedentes

La esquizofrenia es un desorden mental crónico cuyos síntomas son heterogéneos (Jáquez-Cabalceta, 2017). La enfermedad generalmente surge al final de la adolescencia o en la edad adulta temprana y con frecuencia sigue un curso crónico. El inicio (primer brote o episodio psicótico) es raro antes de los 16 años y poco frecuente después de los 50 años (Nicholas Meyer, 2012). La evolución es muy variable de unos pacientes a otros y los síntomas son típicamente individuales. Esta patología cursa con síntomas positivos, negativos, cognitivos y del ánimo (Guías Clínicas AUGE 2017) según se muestra en la tabla 1.

Síntomas Positivos	Síntomas Negativos	Síntomas cognitivos	Síntomas Afectivos y Ansiosos
<ul style="list-style-type: none"> - Distorsión de la realidad - Pensamientos y conductas desorganizadas. - Ideas delirantes - Alucinaciones - Síntomas catatónicos - Agitación - Comportamiento bizarro - Delirios persistentes (ej: ser perseguido por el gobierno) - Pensamiento en eco - Roturas en el tren del pensamiento - Desorganización conceptual 	<ul style="list-style-type: none"> - Ausencia o disminución del procesamiento normal - Disminución de la expresión - Abulia (Falta de voluntad o energía) - Afecto embotado o aplanamiento afectivo - Retraimiento emocional - Retraimiento social - Apatía (Desinterés o falta de motivación) - Pasividad - Falta de espontaneidad - Pensamiento estereotipado - Alogia (limitación en la fluidez y la productividad del discurso y pensamiento) - Abolición (restricción en la iniciación de la conducta frente a un objeto) - Anhedonia (sin placer en cosas cotidianas) - Deterioro atencional - Escasez del lenguaje - Expresión emocional reducida 	<ul style="list-style-type: none"> - Déficit de atención - Déficit en la memoria - Déficit en el procesamiento de la información - Pobreza ideativa (dificultad en elaborar nuevas ideas) - Déficit en funciones ejecutivas (problemas para estructurar una meta, concentrarse, priorizar, ordenar, evaluar, adaptarse). - Déficit en flexibilidad de aprendizaje 	<ul style="list-style-type: none"> - Disforia (irritabilidad, preocupación, tensión, etc.) - Humor depresivo - Desesperanza - Ideas e intentos suicidas. - Hostilidad - Impulsividad

Tabla 1. Sintomatología de la esquizofrenia

El primer fármaco descubierto con efecto antipsicótico fue la clorpromazina, introducida a partir del año 1952. Posteriormente los avances en la psicofarmacoterapia de los delirios y alucinaciones han permitido a los esquizofrénicos vivir fuera de hospitales neuropsiquiátricos.

Se ha observado que la mayoría de los pacientes, adolescentes y adultos jóvenes por excelencia, presentan problemas para integrarse a una vida social y laboral normal. Desafortunadamente, estudios recientes indican que aún los mejores antipsicóticos disponibles resultan poco efectivos en revertir los déficits cognitivos, afectivos y de interacción social.

Además, diversos estudios clínico-epidemiológicos indican que muchos de estos déficits están presentes, en algún grado, desde la infancia temprana de los pacientes, décadas antes de que las manifestaciones psicóticas de la enfermedad se hagan evidentes. Como resultado de estos hallazgos y de la identificación de noxas, tanto prenatales como perinatales, involucradas en la génesis de esta enfermedad, tales como infecciones por virus influenza durante el primer trimestre del embarazo, malnutrición materna, o asfisia perinatal ha surgido la idea de que la esquizofrenia es una enfermedad del neurodesarrollo que compromete primariamente la capacidad cognitiva y emocional de los individuos afectados. Sutiles anomalías en la estructura del cerebro, tales como un volumen cerebral disminuido, son observables al comienzo de los primeros episodios psicóticos, indicando que estas anomalías son causadas por fenómenos patológicos que preceden a la psicosis (Paz, 2005).

Los procesos patológicos que causan el deterioro en la estructura y neuroquímica cerebral, así como en los rendimientos cognitivos son la psicosis en si misma que provocan neurotoxicidad y los tratamientos antipsicóticos que comprometen el trofismo o la viabilidad neuronal (Paz, 2005).

Dada la irreversibilidad de los reajustes sinápticos producidos en la etapa del desarrollo, es esperable que, de no actuar a tiempo, la pérdida de conectividad producida por hiperactividad glutamatérgica (dada principalmente en los episodios de psicosis) alcance un nivel crítico que conduzca a estados de deterioro cognitivo y emocional sobre los cuales sea difícil intervenir una vez superado el período crítico de psicosis (Paz, 2005).

Por otro lado, dado que un cierto nivel de actividad glutamatérgica es fundamental para el trofismo neuronal, es posible que el drástico bloqueo de la neurotransmisión dopaminérgica inducido por los antipsicóticos disponibles lleve a atrofia neuronal por hipoglutamatergia en la corteza prefrontal (Paz, 2005). Los estados crónicos de la enfermedad podrían estar más relacionados con el tránsito de estados de hiper a hipoglutamatérgicos. Este tránsito podría estar mediado por pérdida de espinas dendríticas y atrofia neuronal provocados por la exposición repetida a niveles elevados de glutamato.

Entre los factores de riesgo para esquizofrenia se incluyen: susceptibilidad genética, lesiones en los comienzos del desarrollo, epigenética, haber nacido en los meses de invierno (por la posibilidad de una gripe durante el embarazo), condición de migrante y ser concebido por padres añosos, problemas obstétricos, hipoxia fetal, infección de la madre en el embarazo, infección inmunológica de la madre, estrés maternal o prenatal, mal nutrición maternal o prenatal, bajos o altos índices de masa corporal de la madre, abuso de cannabis (Jáquez-Cabalceta, 2017).

En cuanto a la vulnerabilidad genética son genes que se encuentran involucrados en la migración neuronal, la formación de las sinapsis, la regulación de la dopamina y la trasmisión de glutamato (Nicholas Meyer, 2012). Probablemente la esquizofrenia no es producto de un gen único sino de una genética heterogénea (Ordieres, 2018). Pero si los padres tienen la enfermedad, el riesgo de transmitirla a los hijos es del 40%. El índice de concordancia entre gemelos monocigotos es de 40% a 50%. Lo que habla de una vulnerabilidad genética alta, dado que la concordancia entre monocigotos (que comparten el 100% de su material genético) no es del 100%, se hipotetiza que habría otros factores que también incidirían en la expresión de la enfermedad (Guías Clínicas AUGÉ, 2017). Estudios genético-moleculares han identificado polimorfismos en múltiples genes involucrados en la regulación del desarrollo cerebral y la plasticidad neuronal normal (Paz, 2005).

En este sentido, es donde la epigenética toma un papel protagónico, dado que estaría influenciando la expresión de genes de los gemelos de manera diferencial. Recientemente se ha propuesto que las diferencias de metilación del ADN podrían ser la causa de la discordancia en gemelos monocigóticos, y también podría proporcionar un mecanismo para una variedad de factores de riesgo ambiental para la esquizofrenia (PV Gejman, 2010). La epigenética es una consecuencia del entorno e influye sobre el individuo. Por ejemplo, un ambiente familiar con violencia física y psicológica durante la niñez, abuso de sustancias como el alcohol, vivir en condiciones precarias y de indigencia con falta de higiene y malnutrición, residir en zonas urbanas sobrepobladas.

Otros factores involucrados en el desarrollo de la enfermedad serían el consumo de cannabis, anfetamina, cocaína, LSD, éxtasis y ketamina que también se han asociado con la precipitación de estados psicóticos (Nicholas Meyer, 2012).

En relación al género, se ha encontrado una incidencia más temprana en la aparición de síntomas psicóticos en hombres en comparación con las mujeres. La edad de inicio de la enfermedad en los hombres es entre los 18 y 25 años, mientras que en las mujeres este rango oscila entre los 25 y los 35 años. En cuanto a la aparición de la enfermedad suele ir precedida varias semanas antes o meses de un retraimiento social y ocupacional, pérdida de interés en actividades cotidianas, cambio de personalidad, estado de ánimo alterado, depresión e ideas

paranoides. Los síntomas positivos que se observan durante el estado psicótico agudo, pueden estar acompañados o no de síntomas negativos. La dimensión exclusiva de los síntomas negativos es en la fase crónica del síndrome, es un aspecto altamente incapacitante de la enfermedad. Es esta etapa también se pueden observar los síntomas cognitivos, afectivos y ansiosos (Nicholas Meyer, 2012).

Para el diagnóstico de la esquizofrenia se solicita la historia clínica y psiquiátrica del paciente y su familia. Se le realizan exámenes generales completos y si se sospecha de alguna causa patológica, se realizan exámenes específicos como resonancia magnética y EEG. El examen físico incluye un examen neurológico completo para identificar patología orgánica (Nicholas Meyer, 2012). Recientes estudios de neuroimagen muestran reducciones progresivas de sustancia blanca y gris, así como en los niveles de N-acetil-aspartato (considerado como un marcador de viabilidad neuronal), en el cerebro de pacientes esquizofrénicos (Paz, 2005).

Después del primer episodio de psicosis, se puede lograr una remisión de los síntomas psicóticos positivos en más del 80% de los pacientes. No obstante, si el paciente no accede a un tratamiento de mantenimiento con antipsicóticos podría volver recaer, se estima que más del 90% de los pacientes recaen por falta del tratamiento. El 5% de los pacientes con esquizofrenia mueren por una conducta autolítica, la que ocurre en los primeros 5 años en la mitad de esos pacientes. Además, la condición de salud física de los pacientes esquizofrénicos asociada a la enfermedad acorta la esperanza de vida en unos 12 a 15 años (Nicholas Meyer, 2012). A pesar de que un número importante de esquizofrénicos responde al tratamiento inicial con fármacos antipsicóticos, alrededor del 80% de los pacientes recaerá en un plazo de 5 años desde el primer episodio tratado, por el abandono del tratamiento antipsicótico. Sin embargo, la incorporación temprana a un programa terapéutico que incluya intervenciones sociales, psicológicas y farmacológicas, constituye un factor importante para la obtención de logros terapéuticos a largo plazo. Una buena respuesta durante los dos primeros años de la enfermedad aparece como un buen predictor del pronóstico a los 15 años (Guías Clínicas AUGÉ, 2017)

Tratamiento

El tratamiento debe ser personalizado en consenso con el paciente y su familia. Debe contener estos cinco componentes: evaluación integral, intervenciones psicosociales (incluyendo intervenciones sobre las familias y cuidadores de los pacientes), rehabilitación neuro-cognitiva, farmacoterapia y servicios de apoyo. En cuanto a la elección del antipsicótico el paciente debe ser debidamente informado de los efectos colaterales. Se recomienda usar siempre monoterapia por excelencia y combinaciones solo por tiempo determinadamente corto. El paciente debe ser informado sobre los altos riesgos de recaídas si se suspende la medicación

de forma brusca. El paciente puede elegir el tipo de presentaciones medica que desee (oral, de depósito, etc) (Guías Clínicas AUGE, 2017).

El tratamiento de la esquizofrenia tiene por objetivo:

- Mejorar los síntomas positivos, cognitivos, afectivos y negativos.
- Prevenir la hospitalización.
- Potenciar la capacidad de vivir en forma independiente.
- Potenciar la capacidad de establecer y perseguir objetivos educacionales y ocupacionales.
- Minimizar los posibles efectos no deseados relacionados con los medicamentos.
- Lograr una adecuada calidad de vida e integración social (Guías Clínicas AUGE, 2017)

Efectos adversos de antipsicóticos primera generación (Guías Clínicas AUGE, 2017)						
Nombre	Aumento de peso	Síntomas extra-piramidales	Prolactina	Sedación	QT Prolongado	Otros
Clorpromazina	++	++	-	+++	++	Efectos anticolinérgicos, ortostasis, sensibilidad a la luz, colestasis, hipotensión.
Tioridazina	+	+	++	++	+++	Efectos anticolinérgicos, hipotensión.
Trifluoperazina				++		Menos efectos anticolinérgicos.
Perfenazina	+	++	++	++	-	
Loxapina		+++		++		
Molindrona		+++		-		
Haloperidol	+	+++	+++	++	+	
Flufenazina		+++		+		
Tiotixeno		+++		+		
Sulpirida			++	++		Galactorrea

Efectos adversos de antipsicóticos segunda generación (Guías Clínicas AUGE, 2017)						
Nombre	Aumento de peso	Síntomas extra piramidales	Prolactina	Sedación	QT Prolongado	Otros
Lurasidona		++		++		Náusea
Iloperidona	+++	-	-	-	+	Mareo, hipotensión.
Asenapina	+	+	-	++	-	Mareo, ansiedad
Paliperidona	++	+	+++	+	-	Inquietud, cefalea
Aripiprazol	+	-	-	+	-	Nausea, ansiedad, insomnio, inquietud.
Ziprasidona	-	+	+	++	++	Hipotensión
Quetiapina	++	-	-	++	+	Ansiedad, efectos anticolinérgicos, hipotensión, hiperglucemia.
Olanzapina	+++	-	-	++	-	Hiperglucemia
Risperidona	++	++	+++	+	+	Ortostasis
Amisulpirida	+	-		-	++	
Clozapina	+++	-		+++		Agranulocitosis (1%), convulsiones, babeo, hipertermia, hiperglucemia,

Tabla 2. Comparación entre los efectos adversos producidos por los antipsicóticos de primera y segunda generación (Guías Clínicas AUGE, 2017)

Los agentes de primera generación ejercen principalmente antagonismo en el receptor D2 junto con antagonismo en los receptores colinérgicos muscarínicos, histaminérgicos y α -1 adrenérgicos, mientras que los antipsicóticos de segunda generación tienen un perfil de

receptor más amplio, antagonizan los receptores serotoninérgicos centrales y bloquean un rango de receptores de dopamina más débilmente. Por lo tanto, sus perfiles de efectos adversos son diferentes, ya que los medicamentos de primera generación tienden a causar efectos extrapiramidales (EPSE) problemáticos a través del bloqueo de los receptores D2 nigrostriatales. Los antipsicóticos de segunda generación causan menos efectos adversos motores, pero predisponen al síndrome metabólico, caracterizado por aumento de peso, dislipidemia e intolerancia a la glucosa. O en casos más graves, como en la Clozapina, entre 0,5 -1% de los pacientes que la usan desarrollan agranulocitosis, potencial causa de muerte (Nicholas Meyer, 2012). Los antipsicóticos deben utilizarse siempre a la mínima dosis efectiva de forma de lograr la máxima efectividad clínica con los menores efectos adversos posibles (Guías Clínicas AUGÉ, 2017). La disminución de los síntomas psicóticos demora varios días, llegando incluso a tardar cuatro a seis semanas en verse con claridad el efecto del fármaco (Guías Clínicas AUGÉ, 2017).

Modelos animales de experimentación

El estudio de la esquizofrenia en pacientes se dificulta debido a la falta de uniformidad en la presentación de los síntomas característicos de la enfermedad. Estos modelos han sido desarrollados en animales de laboratorio, en especial roedores con la intención de evaluar determinados síntomas de la enfermedad a través de la modificación de la conducta animal, aunque existen síntomas como las alucinaciones que son más difíciles de modelar. En la tabla 3. se muestran los síntomas presentes en la esquizofrenia y sus respectivos correlatos evaluados como cambios en el comportamiento de los roedores:

	Humanos	Roedores
Síntomas positivos	Alucinaciones	Hiperactividad locomotora, estereotipia, disminución en la inhibición del prepulso.
	Comportamiento bizarro	Esterotipia
	Pensamiento desorganizado	No existe equivalente
Síntomas negativos	Aislamiento social	Aislamiento y agresividad social
	Anhedonia	Anhedonia
	Apatía	Falta de motivación y anticipación de recompensa a estímulos positivos
	Aplanamiento afectivo y alogia	Falta de contacto olfatorio, grooming social y vocalizaciones ultrasónicas
Síntomas cognitivos	Disminución de la memoria de trabajo	Disminución de la memoria de trabajo

	Déficit en atención y procesamiento de la información.	Déficit en atención y procesamiento de la información.
	Déficit en flexibilidad de aprendizaje	Déficit en flexibilidad de aprendizaje
	Déficit en la función ejecutiva	Déficit en la función ejecutiva (impulsividad, comportamientos perseverantes)

Tabla 3. Correlación entre los síntomas presentes en la esquizofrenia y los cambios conductuales de los roedores.

“Las Tres R”

En los modelos animales para el estudio de la esquizofrenia, como para otros modelos, se siguen los principios conocidos como las tres R, es decir reemplazo, reducción y refinamiento.

La primera erre (reemplazo) alude a métodos que eviten o sustituyan el uso de animales. Esto incluye tanto los reemplazos absolutos (sustituir animales por cultivos celulares, modelos matemáticos, modelos informáticos o el uso de humanos voluntarios) como los reemplazos relativos (sustituir vertebrados por animales con una menor percepción del dolor, como insectos, parásitos y bacterias).

La tecnología propició la creación de modelos computacionales. Estos modelos presentan menos dilemas éticos que el estudio en animales o en pacientes esquizofrénicos y simulan la fisiología de dopamina, serotonina, acetilcolina, norepinefrina, ácido gamma-aminobutírico (GABA) y ácido glutámico (Geerts, Spiros, Roberts, Twyman, & Alphs, 2012).

Para la ejecución de los modelos experimentales, la esquizofrenia es una enfermedad mental que presenta una etiología multifactorial, los roedores presentan la ventaja de ser una especie genéticamente homogénea. Además, se puede estudiar el progreso de la enfermedad desde muy temprana edad y a través de varias generaciones, sin que el estudio se prolongue en el tiempo (Jáquez-Cabalceta, 2017).

La segunda erre (reducción) alude a cualquier estrategia que tenga como resultado el uso de un menor número de animales hasta un mínimo indispensable para obtener información (no usar tantos como para que se desperdicien vidas de animales, ni tan pocos que se tenga que repetir), o la maximización de la información obtenida por animal (por ejemplo, al compartir órganos), para así limitar o evitar el uso posterior de otros. Se selecciona una especie genética homogénea o consanguíneas. Los animales seleccionados siempre tienen una calidad sanitaria óptima.

En cuanto a la tercera erre (refinamiento), alude a la modificación y mejoramiento de las técnicas experimentales para minimizar el dolor, el sufrimiento, la angustia, el estrés y el daño duradero de los animales, así como para mejorar su bienestar desde su nacimiento hasta su muerte.

Hay una gran variedad de metodologías y fármacos que disminuyen el dolor, sufrimiento y técnicas menos invasivas. Por otra parte, es un hecho comprobado que los animales que viven en bienestar, con sus necesidades cubiertas, condiciones higiénicas sanitarias y ambientales adecuadas más un enriquecimiento ambiental, proveen resultados más adecuados, válidos y extrapolables. Los cambios en el bienestar o la conducta pueden conducir a variaciones en los resultados experimentales que afecta tanto a la fiabilidad y repetibilidad de los estudios (NC3RS, National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research).

En este caso, se priorizó el uso de video cámara para filmar a los animales en el campo abierto y de esta forma exponerlos menos veces al momento. El experimento fue lo más breve posible según lo permitido por el protocolo, para disminuir el potencial de causar daño grave o duradero.

En el bioterio se alimentó y dio de beber adecuadamente, en un ambiente con temperatura controlada, sin contaminación y con humedad correcta. Se transportaron del bioterio al laboratorio en su misma jaula cada vez que era necesario para el experimento. El alojamiento en jaula cumplió con el requisito de proporcionar un mínimo lugar de espacio óptimo y de alta calidad para el bienestar animal, para minimizar el estrés y la angustia. Se tuvo en cuenta las consideraciones específicas de la especie, junto con los requisitos del comportamiento y el enriquecimiento ambiental. Se debió proporcionar a los animales un entorno físico complejo, variado y alojar a los animales en agrupaciones sociales adecuadas, con el objetivo de promover tanto el ejercicio como el desempeño de comportamientos típicos de la especie (National Centre for the Replacement, Refinement, & and Reduction of Animals in Research (NC3RS), 2008)

La jaula está organizada de una manera que permita a los ratones compartimentar su espacio. Por ejemplo, el agua y los alimentos en un extremo de la jaula, dejando el otro extremo libre para ser utilizado para la micción y la defecación. A su vez proporciona una estructura de escalada en el techo con el fin de aumentar la complejidad de la jaula. El área de suelo libre y disponible permitiendo la compartimentación espacial. Los ratones prefieren suelos sólidos con camas de virutas de madera.

Los ratones son animales altamente sociales y en la naturaleza viven en grupos familiares que suelen consistir en un macho dominante, varias hembras con sus crías. Alojados en

grupos, se proporcionan mutuamente apoyo social cuando se enfrentan a una situación estresante. Los episodios de agresión son más comunes en los ratones macho que en las hembras (NC3RS, National Centre for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research). Para evitar que se dé lugar a la agresión, estrés crónico, lesiones y ocasionalmente la muerte, se evitó que los machos convivieran con las hembras.



Figura 2. Jaula abierta convencional

Modelos animales empleados para el estudio de la esquizofrenia

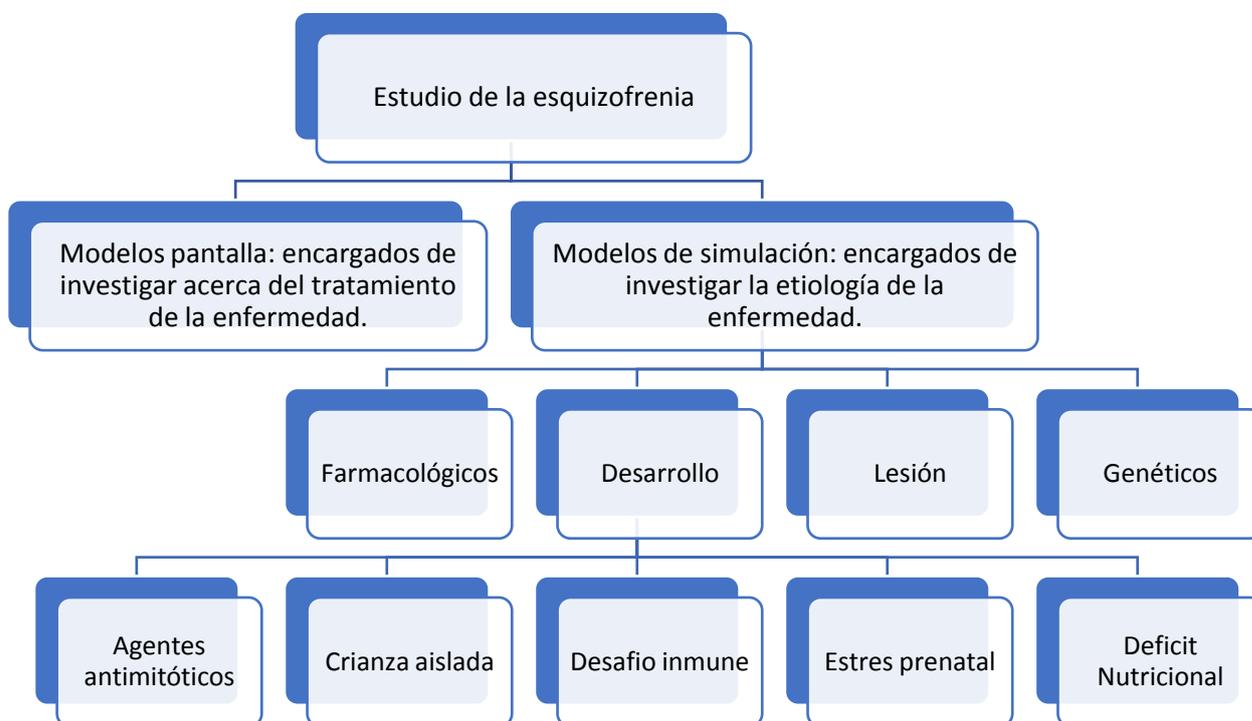


Figura 3. Modelos pantalla y simulación para el estudio de la esquizofrenia.

Modelo farmacológico

Este modelo se centra en estudiar los mecanismos moleculares de la esquizofrenia más importantes que involucran a la neurotransmisión dopaminérgica y la glutamatérgica. La primera plantea que la psicosis presente en la enfermedad es debida a un aumento en la neurotransmisión de dopamina (DA) en la vía mesolímbica, ya que drogas que provocan hiperdopaminergia también causan psicosis, mientras que drogas que disminuyen la neurotransmisión de DA (antipsicóticos) provocan lo opuesto. La hipótesis glutamatérgica por su lado propone que el silenciamiento de los receptores ionotrópicos de glutamato (NMDA) causa psicosis, síntomas negativos y trastornos cognitivos, por lo que sustancias antagonistas no competitivos de los receptores NMDA (RNMDA), como la fenciclidina (PCP), el MK-801, y la ketamina, entre otras, son responsables de síntomas psicóticos presentes en la esquizofrenia e incluso causan liberación de DA. Estos también producen cambios a nivel genético.

Entre los modelos farmacológicos, el más consistente es el modelo de PCP, porque permite estudiar características en el animal relacionadas con los síntomas negativos y los trastornos cognitivos, pero no son revertidos con antipsicóticos de primera generación como haloperidol. En este sentido, se podría decir que el modelo tiene una mala validez predictiva para aquellos

fármacos antipsicóticos que actúen principalmente como bloqueantes dopaminérgicos y no para aquellos que se comporten como antagonistas de los receptores NMDA del glutamato (Jáquez-Cabalceta, 2017).

Modelos del neurodesarrollo

Estos modelos tienen su base en la hipótesis de que eventos adversos durante la gestación afectan al neurodesarrollo como causa de la esquizofrenia (Jáquez-Cabalceta, 2017).

Agentes antimetabólicos: Los agentes antimetabólicos utilizados en la investigación del modelo del desarrollo son: el metilazoximetano→mitoxina (MAM) y el arabinósido de citosina (Ara-C). Producen lesiones en el ADN que conducen a daños en el sistema nervioso en el segundo trimestre del desarrollo fetal en humanos y el día 17 de gestación en roedores. Se observa una reducción del grosor del hipocampo y la corteza prefrontal. Tiene una alta validez de constructo y validez aparente, ya que simulan los cambios físicos y los síntomas positivos, negativos y cognitivos. La validez predictiva se ve acotada ya que los psicotrópicos hasta hoy conocidos revierten los síntomas positivos por excelencia (Jáquez-Cabalceta, 2017).

Crianza aislada: Se aísla a los ratones a los 21-28 días post-destete. Reproduce síntomas positivos, negativos y cognitivos. En estos ratones aislados se ha encontrado reducida las áreas de corteza prefrontal y el hipocampo. Presenta una alta validez de constructo y aparente, porque se pueden observar cambios de comportamiento y neurobiológicos en roedores aislados, similares a los observados en pacientes esquizofrénicos. En cuanto a la validez predictiva, varios estudios han encontrado que antipsicóticos típicos y atípicos, revierten déficits cognitivos, la hiperactividad locomotora y los efectos del aislamiento social (Jáquez-Cabalceta, 2017).

Desafío inmunológico: para este modelo se producen infecciones durante el primer trimestre de embarazo. El grado de afección depende del agente infeccioso. Puede emplearse la infección viral que produce la enfermedad de Borna (EB) y la influenza humana (IH). Además, se usan los agentes poli (I-C) y Lipopolisacáridos (LPS), que activan la respuesta inmunológica, ya sea viral o bacteriana, porque son generados en la infección y reconocidos por el sistema inmunológico. Por lo tanto, en estos modelos se pretenden activar respuestas inmunológicas en la madre. Como conclusión general se puede decir que el uso de agentes infecciosos, dentro del modelo de desarrollo presenta validez aparente, debido a que, se reproducen muchos de los síntomas encontrados en la ESQ en humanos. Asimismo, el modelo en general presenta validez predictiva porque se han encontrado el comportamiento presente en ratones que se revierten al administrar antipsicóticos (Jáquez-Cabalceta, 2017).

Estrés Prenatal: Se somete a la madre a estrés variable o constante. Ejemplo de estrés variable: 1 hora de inmovilización en un cilindro de plexiglás, exposición durante 6 horas a un

ambiente frío (4°C), privación de alimento de un día para otro, luz durante 24 hs sin periodo de oscuridad, estrés social inducido por muchos animales conviviendo en un espacio pequeño durante el ciclo de oscuridad, privación de sueño durante el ciclo de luz por 90 min, 15 min de nado forzado y reversión del ciclo de luz-oscuridad. Otros ejemplos son la administración de corticosterona, shocks eléctricos en las patas, o 15 min expuestos al olor de un depredador. El constante solo varía en el tiempo de exposición. El estrés prenatal induce muchos cambios de comportamiento y neurobiológicos en roedores, que han sido observados en la esquizofrenia, por lo que presenta validez aparente, de constructo y predictiva. En relación con esta última, se encontró que la clozapina revirtió muchos de los síntomas (Jáquez-Cabalceta, 2017).

Déficit nutricional: La falta de algunos nutrientes que juegan un papel importante en el desarrollo cerebral. Los modelos animales que más se utilizan son aquellos con deficiencia de vitamina D y deficiencia proteica. Su validez aparente se ve afectada debido a que existen hallazgos contradictorios en cuanto a los síntomas observados en ratones sometidos a este modelo. La validez predictiva no ha sido aún determinada, dado que existen pocos estudios al respecto. Otro problema que podría presentar el modelo de malnutrición en general es quizá que las hambrunas en épocas de crisis, aparte de tener el factor de la deficiencia alimentaria, se acompañan de estrés (Jáquez-Cabalceta, 2017).

Modelo de lesión: Estos modelos pretenden probar la hipótesis del neurodesarrollo. Se proponen lesiones en tres diferentes regiones: amígdala, el hipocampo ventral y la corteza prefrontal. Este modelo presenta una alta validez aparente y predictiva. Una de las debilidades que presenta el modelo de lesión es la que involucra dificultades técnicas, principalmente en la cirugía. Además, debido a que el cerebro de un paciente con la enfermedad no presenta una lesión análoga a la presente en estos modelos, se plantea que carece de validez de constructo. Es probable que una enfermedad tan compleja no sea producto sólo una lesión localizada en una región cerebral (esto se ve reflejado en la gran variedad de síntomas), aunque esta pueda influir en otras regiones cerebrales. Parece ser que la utilidad de este modelo radica más en entender el rol de cada una de estas regiones cerebrales en la esquizofrenia, y no en proponerlas individualmente como la causa única de la enfermedad (Jáquez-Cabalceta, 2017).

Modelos genéticos: La esquizofrenia es una enfermedad que puede originarse como producto, tanto de variables ambientales como de variables genéticas. Los genes humanos más frecuentes asociados con la esquizofrenia han sido estudiados posteriormente en modelos animales para generar endofenotipos. Muchos de los genes implicados codifican para proteínas involucradas en la plasticidad neuronal, sinaptogénesis y actividad dopaminérgica y glutamatérgica (sinapsis, inervación). Los modelos genéticos presentan discrepancias e inconsistencias en los resultados por lo que aún requieren más investigación para validarse. A pesar de que poseen alta validez de constructo, no replican con fidelidad los síntomas de la enfermedad y por tanto su validez aparente es baja. Se dificulta su estudio debido a la

complejidad de las interacciones entre los diferentes genes y entre estos y el ambiente (Jáquez-Cabalceta, 2017).

Modificaciones epigenéticas

Los mecanismos epigenéticos son la modificación de la expresión de los genes influenciada por el medio ambiente, los cuales pueden ser o no heredados (a través de la mitosis y/o meiosis (Bedregal, Shand, Santos, & Ventura-Junca, 2010)) sin producir cambios en el ADN (en otras palabras, sin alterar la lectura de las bases nitrogenada adenina, citosina, guanina y timina) (Mardomingo Sanz, 2015). Es la interacción entre genotipo y fenotipo, es decir, entre la información codificada por los genes y aquella que efectivamente se expresa (Conde & Santos, 2015). Estos cambios tienen lugar principalmente en el soporte físico del ADN: la cromatina. Estos mecanismos pueden silenciar genes como así también activarlos (Mardomingo Sanz, 2015).

La epigenética está involucrada en procesos biológicos básicos como la diferenciación celular (todas las células tienen el mismo genoma, para diferenciarse, las marcas epigenéticas determinan que genes se activan y silencian) o la selección sexual, en la conformación de la conducta y en la personalidad, en el desarrollo de enfermedades complejas como el síndrome de Rett y en trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia y la depresión. Respecto a la función neuronal, la epigenética desempeña un papel destacado durante la diferenciación celular en el neurodesarrollo, el mantenimiento de los ritmos circadianos, en los cambios celulares inducidos por actividad sináptica en la terapia electroconvulsiva, en la formación de contenidos mnésicos y en la plasticidad sináptica (Conde & Santos, 2015).

Se han descrito dos mecanismos principales de regulación epigenética (Conde & Santos, 2015):

- 1) Metilación del ADN: este fenómeno se produce al añadir un grupo metilo al par de bases citosina-guanina en la región promotora del gen. En la mayoría de los casos, la consecuencia de la metilación del ADN es una menor expresión del gen o "silenciamiento genético", a la vez que una menor metilación suele asociarse a una mayor activación en la transcripción del gen.
- 2) Modificación de histonas: las histonas son unas proteínas globulares alrededor de las que el ADN se enrolla de manera recurrente. El complejo ADN + histona se denomina nucleosoma y la agrupación de nucleosomas se denomina cromatina, que a su vez conforma los cromosomas. Por ejemplo, la acetilación de histonas abre la cromatina a los factores de transcripción y promueve la activación de la función génica, y la desacetilación determina la compactación de la cromatina y el silenciamiento de la actividad del gen.

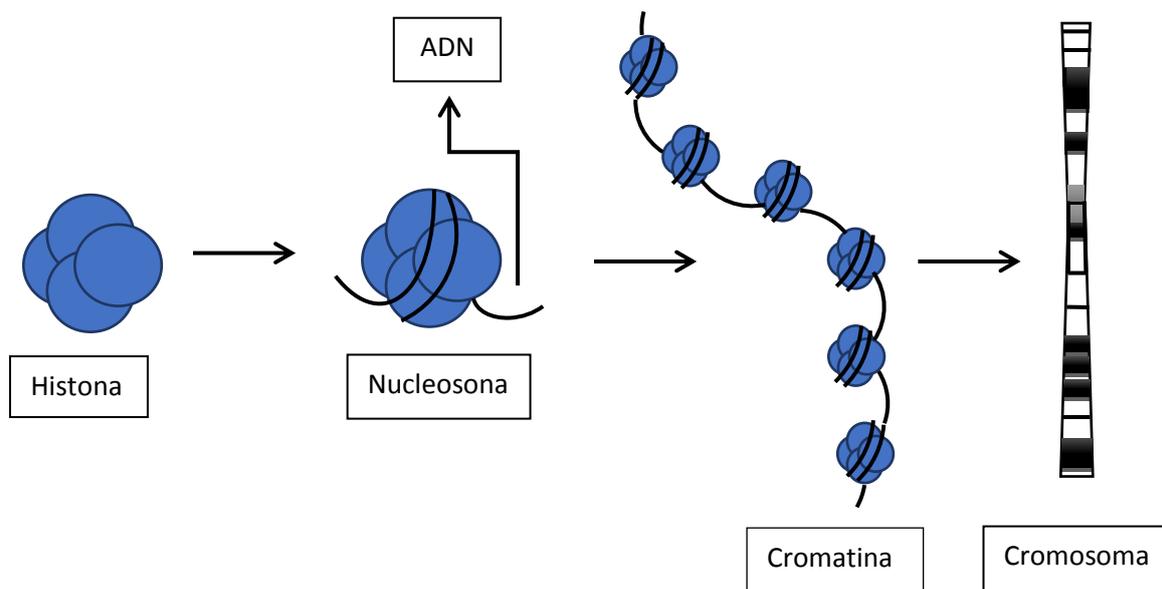


Figura 4. Organización del material genético.

Se pueden inducir cambios en las modificaciones epigenéticas a través de estímulos ambientales como la nutrición, cuidado y comportamiento materno, hormonas y drogas. La producción metabólica de metilo necesaria para la metilación es derivada de la dieta (por ejemplo, la metionina), cofactores cíclicos (por ejemplo, ácido fólico/vitamina B9, vitamina B12), colina y betaína (Stuffrein-Roberts, Joyce, & Kennedy, 2008).

Se pudo observar en ratones que reciben mejores cuidados en la infancia muestran una menor respuesta al estrés y menos propensión a la ansiedad. Esto se debe a que químicamente una menor metilación produce una mayor expresión del receptor glucocorticoide que atenúa la respuesta al estrés del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA). A pesar de la estabilidad de las marcas epigenómicas, estas pueden ser reversibles a lo largo de la vida a través del empleo de fármacos y la exposición a diferentes eventos ambientales. Un estudio en ratones adultos con baja respuesta al estrés se observó que la infusión de metionina (sustancia donante de metilo) revertía el patrón de metilación del receptor glucocorticoide en el hipocampo y aumentaba la reactividad del eje HHA a los estímulos estresantes (Conde & Santos, 2015). Se observó en pacientes con esquizofrenia crónica que la administración de L-metionina resulta en la exacerbación de los síntomas psicóticos. Este compuesto está involucrado en la producción de S-adenosil metionina que proporciona los grupos metilos para la ADN metilación (Stuffrein-Roberts, Joyce, & Kennedy, 2008).

En animales la administración de inhibidores de la ADN metiltransferasa como la zebularia, 5-aza-deoxicitidina o RG-108 produce un efecto de inhibición del aprendizaje de la respuesta del congelamiento condicionado (Conde & Santos, 2015).

Los modelos animales también han propuesto algunos mecanismos epigenéticos beneficiosos del enriquecimiento ambiental: La acetilación de histonas H3 y H4 en la corteza prefrontal y el hipocampo se asocia a mejoras en el aprendizaje, un aumento de la fosfo-acetilación de histonas H3 del hipocampo relacionado con una menor respuesta al estrés y un mejor rendimiento cognitivo, y una inducción de trimetilación de histonas H3 en el BDNF del hipocampo (Conde & Santos, 2015).

Esta interacción gen-ambiente acontece durante toda la vida, pero fundamentalmente en el embarazo, los primeros años de vida y los cambios hormonales como también por estrés o abuso de drogas (Mardomingo Sanz, 2015).

La esquizofrenia es un trastorno del neurodesarrollo en el que tiene lugar una perturbación de los mecanismos epigenéticos que regulan el desarrollo de las neuronas y los oligodendrocitos. Esta perturbación consiste en que se altera una proteína de la matriz extracelular, la reelina y una glicoproteína que se expresa en neuronas gabaérgicas durante el desarrollo del sistema nervioso y en la vida adulta. Esta glicoproteína tiene una importante función en la migración neuronal. También se ha encontrado alteraciones en el sistema dopaminérgico y en la cromatina (Mardomingo Sanz, 2015). La enzima ácido glutámico descarboxilasa (encargada de sintetizar el ácido gama aminobutírico, GABA) tiene sus genes codificantes hipermetilados en pacientes con esquizofrenia. La hipermetilación estaría produciendo un menor nivel de expresión de esa enzima y consecuentemente menores niveles de GABA, lo que involucra íntimamente a este neurotransmisor en el desarrollo de la esquizofrenia (Scolari, 2009).

Materiales y métodos

Reactivos

Se usaron L- Metionina para el grupo sometido al modelo de esquizofrenia experimental y solución fisiológica al grupo control.

El ambiente es capaz de modular la expresión génica mediante modificaciones epigenéticas, las que se definen como cambios heredables que no involucran alteraciones en la secuencia del ADN. Entre ellas se encuentra la metilación del ADN, proceso esencial en la regulación de la expresión génica en mamíferos. Este mecanismo involucra la adición covalente de un grupo metilo (CH_3), a la citosina de un dinucleótido citosina-guanina (CpG), desde el donante de metilos S-Adenosil Metionina (SAME). Esta reacción es catalizada por las enzimas ADN metiltransferasas (DNMTs) y ocurre tanto a nivel global como a nivel gen-específico. Así que su metilación conduce al silenciamiento de dicho gen.

La metionina (Nombre IUPAC: Ácido 2-amino-4-metilbutanoico) es un aminoácido esencial que se obtiene con la dieta. A su vez en alta concentraciones puede metilar el ADN. Esta metilación es la que conduce a los cambios conductuales y bioquímicos en los roedores similares a los que ocurren en la esquizofrenia.

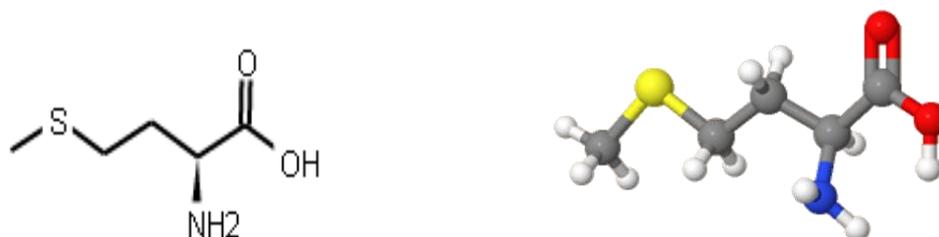


Figura 5. fórmula estructural y modelo molecular en 3D de L-metionina

Animales

Todos los procedimientos se realizaron con ratones Swiss Albino. Los animales se alojaron en conjunto en jaulas estándar con lecho de aserrín. Los alimentos y el agua se proporcionaron ad-libitum. Las pruebas fueron realizadas fuera del bioterio, en una habitación libre de ruidos.



Figura 6. Ratón Swiss Albino

En el presente modelo de herencia epigenética se estudiaron diez ratones. Se tomaron cinco ratones control que fueron inyectados por dos semanas, dos veces al día con solución fisiológica. Los otros cinco ratones fueron inyectados por dos semanas con L-Metionina en dosis de 3,1mmol/Kg subcutáneamente dos veces por día. A ambos grupos, control y tratado, se les inyectó 0,1 ml cada 10 g de las soluciones de L-metionina o fisiológica. El estrés por las inyecciones aumenta la actividad exploratoria (Akkerman, y otros, 2012), por esto mismo se familiarizo a los animales con el procedimiento completo de prueba y administración para evitar sesgos durante el experimento.

Dado que la administración periférica de metionina puede elevar sus niveles sanguíneos produciendo cambios en el animal, se dejan descansar los animales una semana. De esta manera se evidencian los cambios epigenéticos y no debidos a la administración del aminoácido.

Evaluación del aprendizaje y de la memoria no espacial de largo término.

La prueba de reconocimiento de objetos es una poderosa herramienta experimental para valorar los efectos de los tratamientos sobre la memoria y los mecanismos neurobiológicos relacionados con el aprendizaje y la memoria. Esta prueba se fundamenta en la tendencia natural de los ratones a explorar nuevos objetos y ambientes y compararlos con otros que les son familiares. Al exponer al ratón a una serie de objetos se espera a que éste los explore.

La prueba se realiza en un campo abierto, prueba que consiste en colocar al animal en un ambiente abierto para evaluar la conducta en el mismo. En este caso se utilizó una caja de madera con piso de cerámica blanca, cuyas dimensiones eran 25cm ancho x 25cm largo x 15 cm de alto. El piso de la estructura se divide por líneas para delimitar regiones de igual tamaño, en este caso tres por tres regiones. Cada prueba tiene una duración de 10 minutos, durante la cual se evalúan los comportamientos del roedor dentro del campo abierto mediante una cámara de video colocada en alto en uno de los lados de este.

1	2	3
4	5	6
7	8	9

Figura 7. Modelo de campo abierto con sus cuadrantes numerados

El campo abierto se dispuso en una habitación homogéneamente iluminada y con objetos que deben ser de similar textura, color y tamaño, pero de distinta forma. En una primera fase de habituación, se coloca el animal en el campo abierto sin ningún objeto y se deja transcurrir un tiempo variable (10 minutos) para que se familiarice con el entorno. A las 24 horas se colocan dos objetos idénticos en distinta posición (posición 1 y posición 2) y se deja cada animal en el interior de la caja durante 10 minutos. Transcurridas 24 horas, se mide la memoria a largo plazo, para lo cual se cambia un objeto por uno nuevo y se sigue el mismo procedimiento. La investigación de los objetos se definió en dirigir la nariz del roedor hacia el objeto a una distancia de 2 cm o menos.



Entre prueba y prueba, tanto el campo abierto como los objetos fueron rociados con una solución hidroalcohólica al 5% para evitar que los olores de ratones anteriores pudieran influenciar el comportamiento de los ratones siguientes.

Resultados

Los 10 animales, controles y tratados, fueron observados durante 10 minutos en cada sesión. En total se registraron 20 videos de 10 minutos. Los 10 primeros corresponden a la exposición a dos objetos idénticos y los otros 10 videos a la exposición a uno de los objetos de muestra anterior y uno nuevo.

Los animales se evaluaron los 2 primeros minutos de cada video (Figuras 7 y 8), pero también durante los 10 minutos totales de los videos (Figuras 9 y 10). Dado que para ciertos autores los dos primeros minutos son preponderantes en la discriminación de los objetos porque consideran que el animal necesita alrededor de 2 minutos como máximo para detectar y codificar un objeto novedoso. Es por lo que se obtuvieron resultados a los dos minutos y a los 10 minutos, luego de esos tiempos es esperable que el animal genere una preferencia por el objeto nuevo o el familiar debido a las características intrínsecas del objeto (color, forma, altura, utilidad, brillo, etc). En la primera sesión de prueba se usan dos tapas de probeta en distinta posición. En la segunda sesión, 24 hs más tarde se mantuvo una tapa y se cambió la otra tapa por un objeto liso en textura con forma de caja. Los parámetros por evaluar fueron actividad locomotora, actividad exploratoria o "rearing", el número de toques con la nariz a los objetos y para medir la emocionalidad se contaron el número de bolas de materia fecal y gotas de orina promedio.

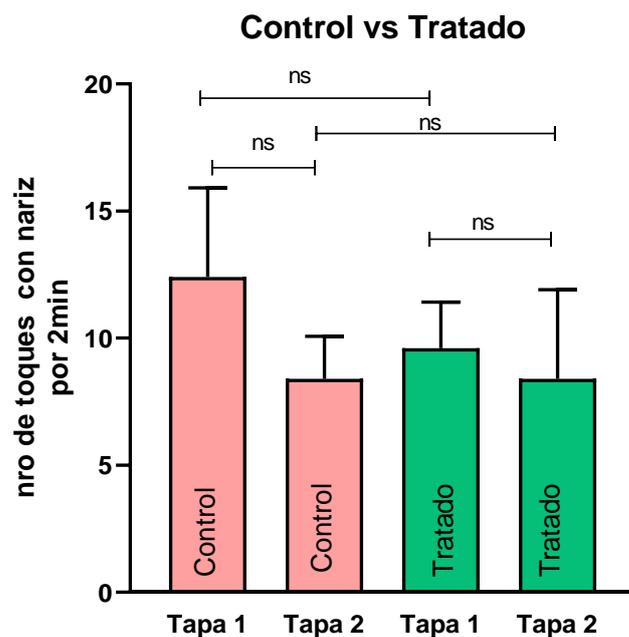


Figura 9. Número de toques con la nariz a los objetos observado en los primeros 2 minutos de los videos. Los resultados se expresaron como expresado como $\bar{A} \pm DS$. No diferencia significativa (ns) determinada por ANOVA de una vía, ($F=2,319$; P valor= $0,1142$) entre las medias.

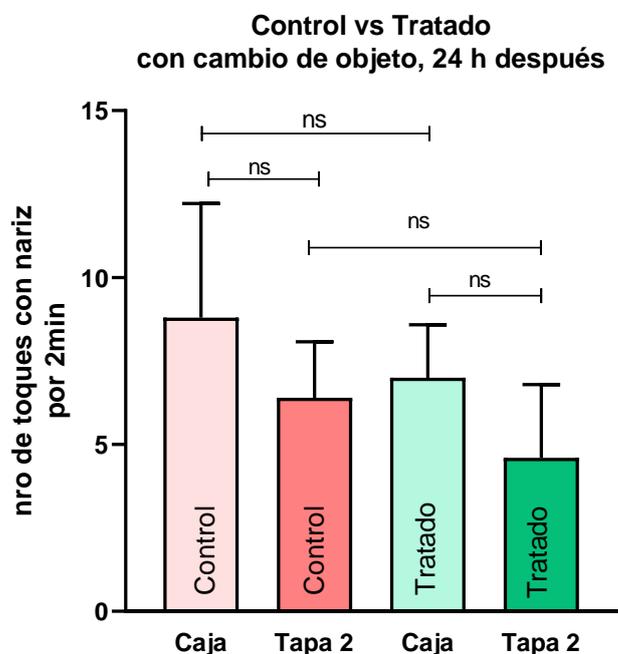


Figura 10. Número de toques con la nariz a los objetos observado en los primeros 2 minutos de los videos. Los resultados se expresaron como $\bar{A} \pm DS$. Se realizó un

cambio de objeto y la evaluación fue realizada 24 h después de la primera sesión. No diferencia significativa (ns) determinada por ANOVA de una vía, ($F=2,752$; P valor= $0,0767$) entre las medias.

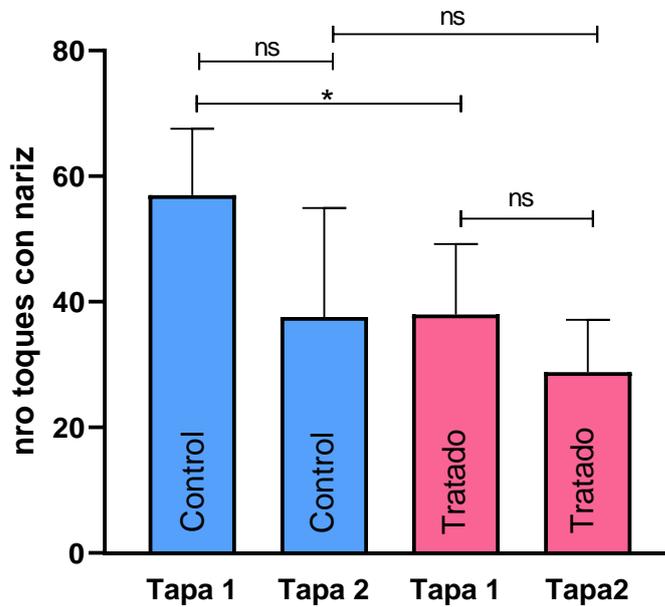


Figura 11. Número de toques con la nariz a los objetos. Observado en los 10 minutos de los videos, los resultados se expresaron como $\bar{A} \pm DS$. Estudio estadístico consistió en la realización de una ANOVA de una vía ($F=4,651$, P valor = $0,016$). Diferencia entre medias ($*P<0.05$) entre el control vs tratado. No diferencia significativa (ns) entre el resto de las medias.

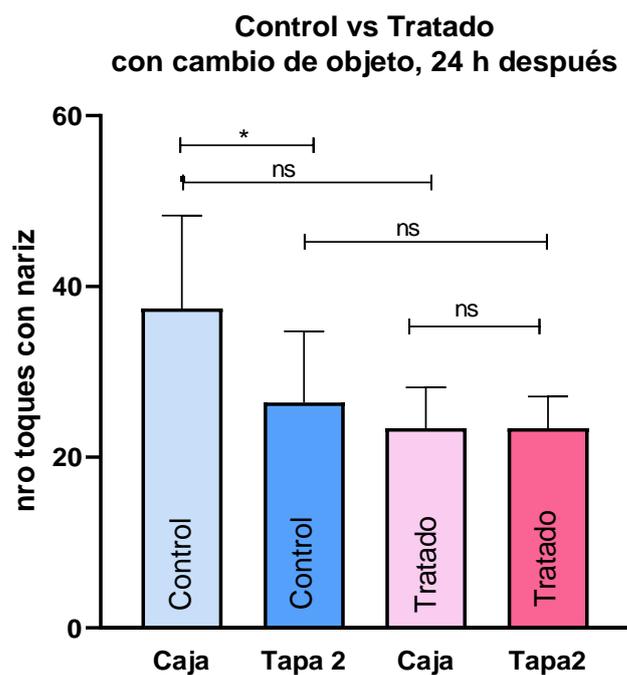


Figura 12. Número de toques con la nariz a los objetos, expresado como $\bar{A} \pm DS$, observados en los 10 minutos de los videos. Estudio estadístico realizado por ANOVA de una vía, ($F=4,340$, P valor = 0,05. Diferencia entre medias ($*P<0.05$) entre los controles. No diferencia significativa (ns) entre el resto de las medias.

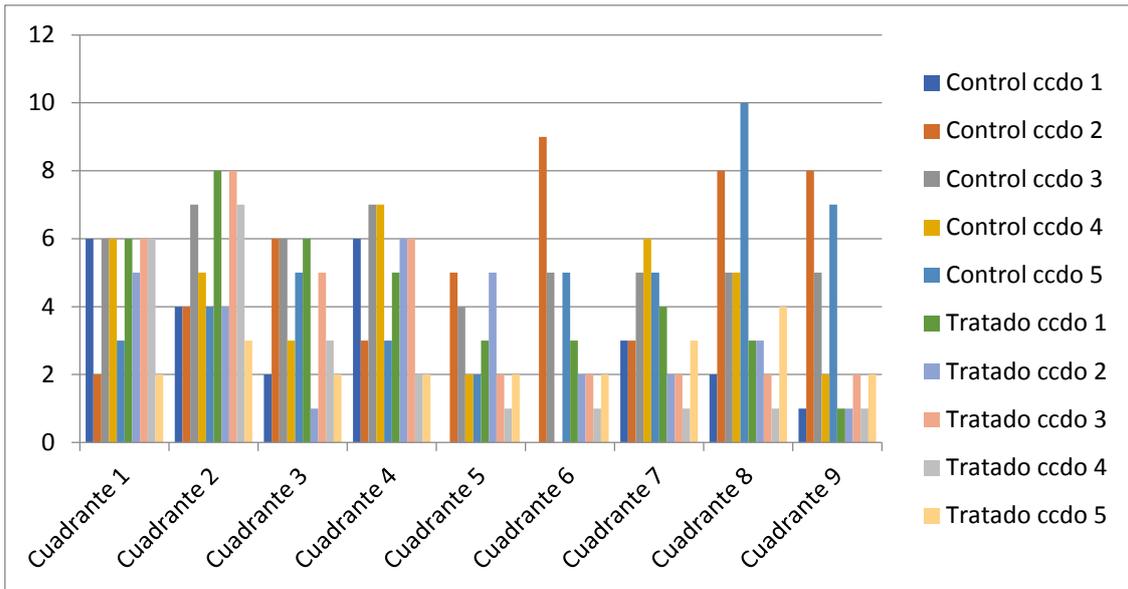


Figura 13. Trayectoria o actividad locomotora. Número de veces que el animal pasa con sus cuatro patas por un cuadrante. Observado en los 2 primeros minutos de los videos, solo de la exposición a cambio de objeto (ccdo), 24 h después de la primera sesión.

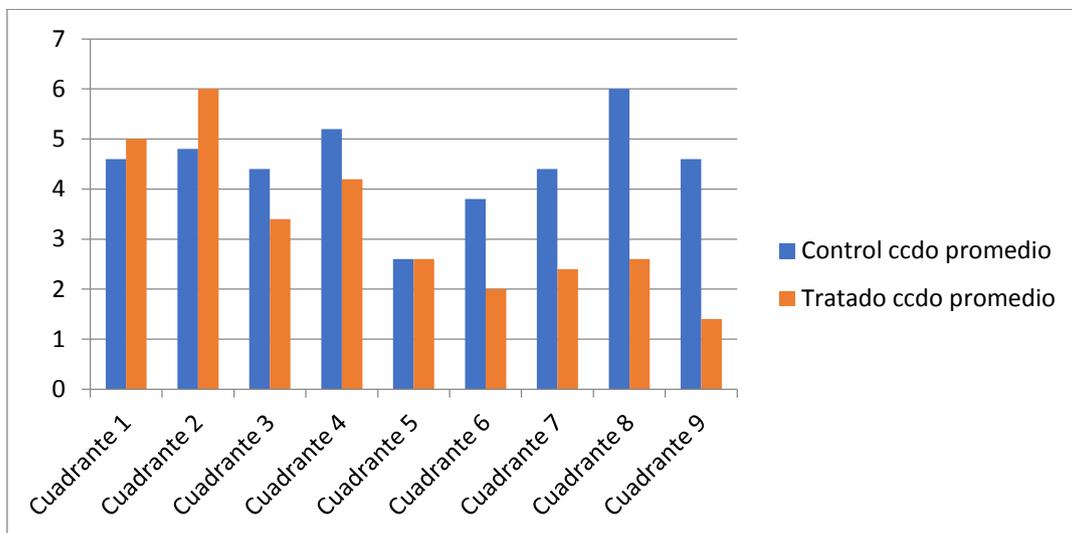


Figura 14. Trayectoria o actividad locomotora en promedio. Número de veces que el animal pasa con sus cuatro patas por un cuadrante, observado en los 2 primeros minutos de los videos, solo de la exposición a cambio de objeto (ccdo), 24 h después de la primera sesión.

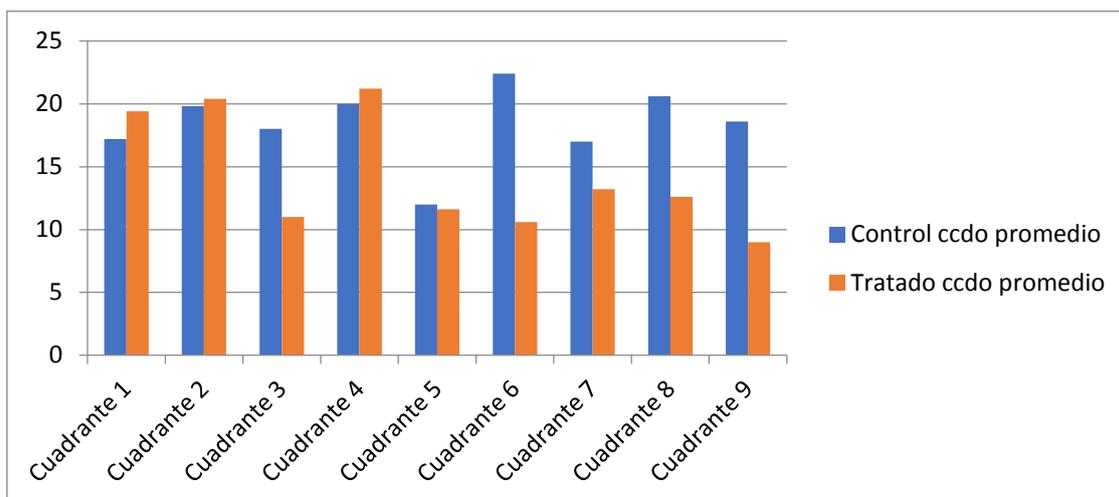


Figura 15. Trayectoria o actividad locomotora en promedio. Número de veces que el animal pasa con sus cuatro patas por un cuadrante. Observado en los 10 minutos completos de los videos, solo de los animales que tuvieron cambio de objeto (ccdo), 24 h después de la primera sesión.

El Rearing (ver tabla 4) es un término inglés empleado para referirse a una tarea evaluada en el campo abierto que consiste en la observación del animal cuando se levanta apoyado en sus dos patas traseras para explorar y se interpreta como la exploración del espacio por parte del animal. Diferentes trabajos describen dos formas de exploración (rearings), el que se hace con apoyo (el animal explora apoyándose contra las paredes de la arena), y la exploración sin apoyo (en la que el animal se incorpora o levanta sin tocar las paredes de la arena) porque se observó que ambos comportamientos dependen en gran medida del contexto. Las exploraciones sin apoyo permiten la evaluación de estados de ansiedad/estrés en los animales, por ejemplo, un mayor número de exploraciones sin apoyarse a las paredes de la arena significa menor stress/ansiedad de los animales, y es usualmente evidenciado en los últimos minutos de una prueba (Figura 13).

A) Exploraciones con y sin apoyo durante 2 min

control			ccdo 24h			tratado			tratado ccdo 24h		
Ā	DS	N	Ā	DS	N	Ā	DS	N	Ā	DS	N
15,2	3,7	5	14,2	4,3	5	19	6,3	5	11,4	3,9	5

B) Exploraciones con y sin apoyo durante 10 min

control			ccdo 24h			tratado			tratado ccdo 24h		
\bar{A}	DS	N	\bar{A}	DS	N	\bar{A}	DS	N	\bar{A}	DS	N
81,6	27	5	61,8	28	5	74,8	18	5	53,6	10	5

Tabla 4. Cantidad de veces en promedio (\bar{A}) que el animal se para sobre sus patas traseras y explora, observado durante A) 2 minutos B) 10 min.

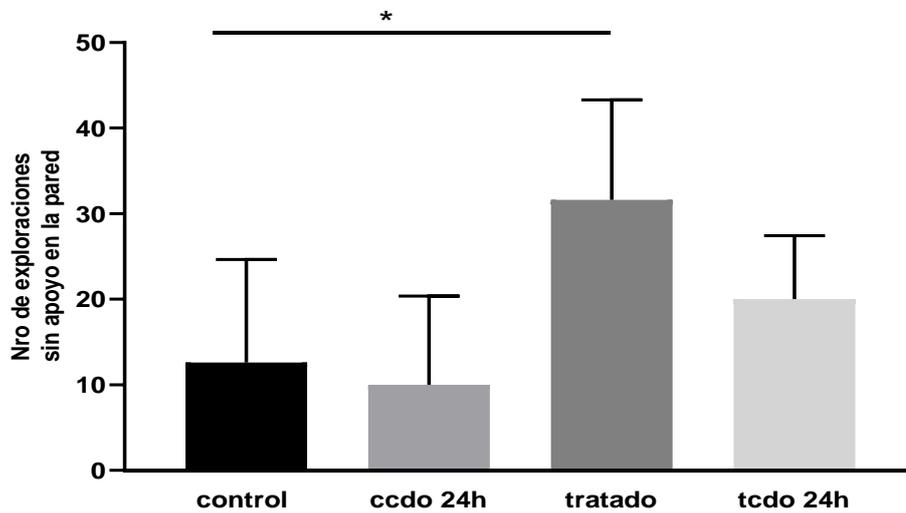
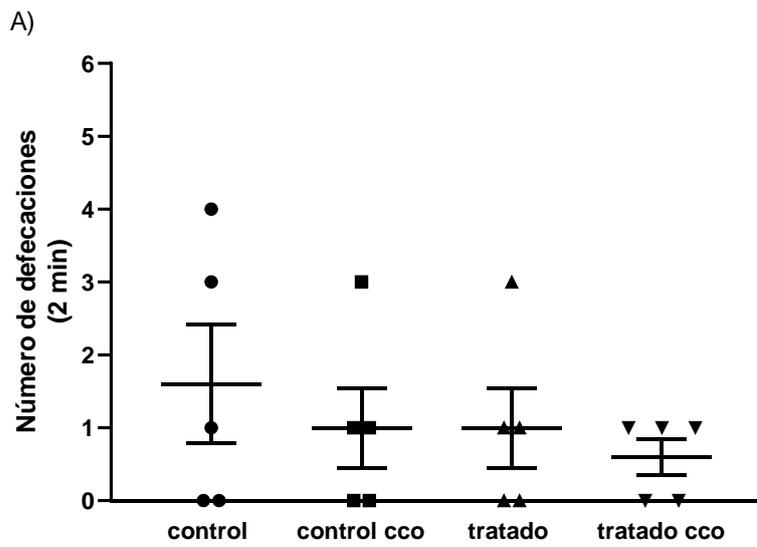
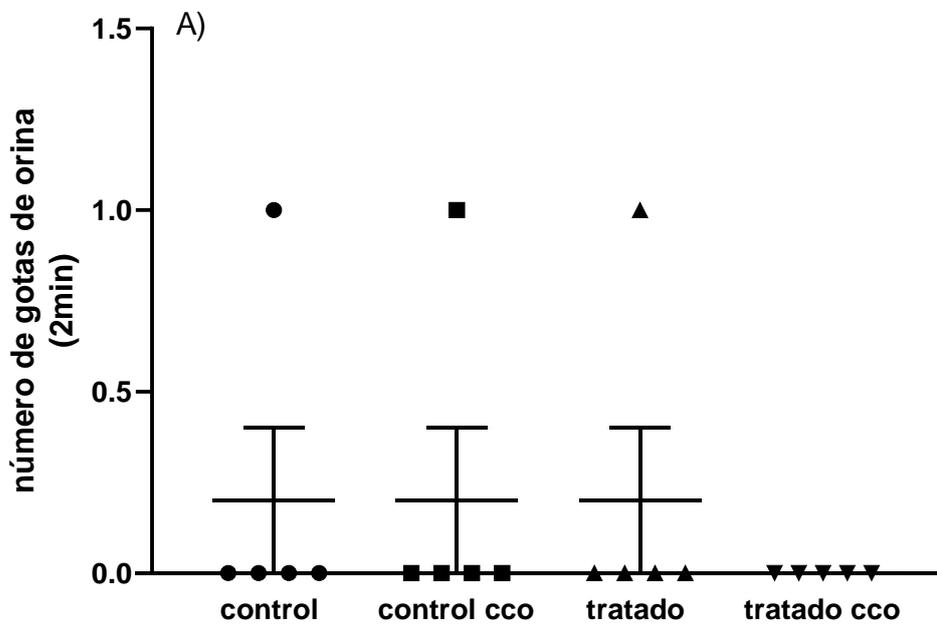


Figura 16. El grafico se muestra el número de exploraciones ($\bar{A} \pm DS$) realizadas por cada animal durante 10 minutos, sin el apoyo a las paredes del campo abierto. Los resultados se expresan como ($\bar{A} \pm DS$). *P < 0.05 según test de 't' Student, para las exploraciones realizadas por los animales tratados respecto a los controles.



B)

Figura 17. Los gráficos de dispersión muestran el número de bolas de materia fecal registrada en 2 minutos (A) y en 10 min (B) de observación del video. Los gráficos A y B, muestran la media como una línea horizontal y al error estándar correspondiente.



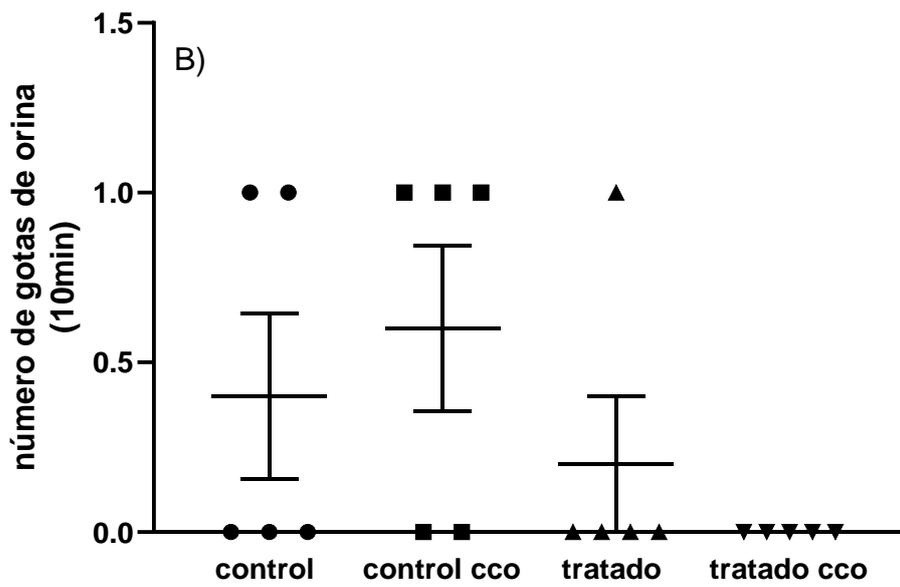


Figura 18. Los gráficos de dispersión muestran el número de gotas de orina, para los ratones pertenecientes a un grupo registrado en 2 minutos (A) y en 10 min (B) de observación del video. Los gráficos A y B, muestran la media como una línea horizontal y al error estándar correspondiente.

Discusión

La regulación de la expresión génica, cuándo, cómo y dónde se expresan los genes, debe ser especialmente precisa durante la formación del cerebro. Por esta razón, cualquier alteración causada por cambios en los mecanismos epigenéticos podría resultar crítica para la aparición de desórdenes del neurodesarrollo, una de las posibles causas de la esquizofrenia.

Para el desarrollo de este trabajo de tesina se seleccionó a un modelo epigenético de ratón empleado para evaluar la vulnerabilidad de la esquizofrenia (L. Tremolizzo, y otros, December 24, 2002). Este consiste en el tratamiento prolongado con L-metionina (3,1 mmol/kg durante 15 días) a ratones provocando en el cerebro un aumento de la S-adenosil-homocisteína y de S-adenosil-metionina como donador de metilos. Este efecto de la L-metionina se asocia a un aumento del número de citosinas metiladas en la isla CpG de la región promotora de la reelina. Desde el punto de vista conductual, los autores emplearon la inhibición de prepulso del sobresalto, que es una prueba característica para evaluar síntomas relacionados con la esquizofrenia en los animales de experimentación. El prepulso del sobresalto, se vio alterado observándose una disminución más rápida a medida que aumentaba el intervalo prepulso/salto en los ratones que recibieron L-metionina.

En este estudio se empleó la prueba de reconocimiento de objetos que se fundamenta en la tendencia natural de los ratones a explorar nuevos objetos, ambientes y compararlos con otros que les son familiares. En una primera fase de habituación, se coloca el animal en el campo abierto sin ningún objeto y se deja transcurrir un tiempo variable (10-30 minutos) para que se familiarice con el entorno. A las 24 horas se realiza el entrenamiento, para lo cual se colocaron dos objetos idénticos en distinta posición y se deja cada animal en el interior del campo abierto durante 10 minutos. Como fue de interés estudiar la memoria de largo plazo, transcurridas otras 24 horas se dejó un objeto familiar y se colocó en la otra posición a un objeto nuevo (Figura 8).

Los objetos se eligieron de manera cuidadosa para evitar sesgos de interés positivos o negativos (características amenazantes que mantiene al animal alejado del objeto). A veces los ratones prefieren los objetos a los que puede trepar o interactuar. También se sabe que los ratones son miopes, ven bien de cerca pero no de lejos. Así que por esta razón los ratones usan mucho su sentido del olfato. En este sentido, para evitar cualquier sesgo se limpian cuidadosamente los objetos antes de usarlos con otro animal. Si se eliminan los olores entonces podemos suponer que los animales usaron la visión para moverse hacia los objetos.

En los gráficos 9 y 10, se observaron solo los dos primeros minutos de las pruebas. La evaluación del número de toques con la nariz mostró que no hubo una preferencia marcada por

alguno de los dos objetos en particular. Estos resultados permiten concluir que 2 min de exposición no fueron suficientes para lograr una diferencia significativa en ningún caso.

En los gráficos 11 y 12, se observaron los 10 minutos completos de los videos. En la primera sesión (gráfico 11) llevada a cabo con dos objetos idénticos, no hubo diferencias significativas en el número de toques con la nariz entre los controles tratados con solución salina entre sí o los tratados con L-Metionina entre sí. Pero pudo observarse que los animales control registraron una mayor preferencia por la tapa 1 (67%) respecto a los animales tratados con L-Metionina. En la segunda sesión, realizada en el mismo campo abierto 24 horas después, pero cambiando una tapa por una caja (gráfico 12) solo los animales control, tratados con solución salina, tuvieron preferencia por el objeto nuevo en un 70%. Fueron capaces de discriminar entre el objeto nuevo y el antiguo. Los animales tratados, por el contrario, a través del conteo de toques a los objetos con sus narices, mostraron no tener preferencia por ninguno de los dos objetos. Al ser los dos objetos igualmente interesantes, esto marca que el objeto familiar no se recuerda. Los roedores son capaces de recordar un objeto por mucho más de 24 horas, hasta días o incluso retengan permanentemente la información del objeto después de una única prueba y después del primer conocimiento (Akkerman, y otros, 2012). El recuerdo del objeto familiar decayó. Este deterioro en la memoria puede hacer que el objeto visto anteriormente parezca nuevo o vagamente familiar y requiera tanta exploración como al objeto presentado junto a él que nunca había visto. La preferencia nula refleja una etapa en la que se presta igual atención a la novedad y al objeto familiar, se puede interpretar como un recuerdo debilitado del objeto familiar y en este caso un decaimiento de la memoria de largo plazo (Ennaceur, 2010).

Al observar el gráfico 13 (datos obtenidos de los 2 primeros minutos de los videos) se puede comprobar una marcada diferencia en la trayectoria de los cuadrantes 6, 8 y 9. En estos cuadrantes se encontraba el objeto nuevo o novedoso. El grupo control tuvo una marcada preferencia por el objeto novedoso, probablemente debido a una conducta notoriamente elevada de la actividad locomotora en los cuadrantes donde se encontraba el objeto. Por otro lado, en los animales tratados, se pudo observar lo contrario: una actividad locomotora significativamente disminuida. En el gráfico 14 que muestra los datos promedio de las trayectorias por los cuadrantes, durante los 10 min, los animales control realizaron un recorrido mayor alrededor del objeto novedoso en contraposición con los animales tratados que pasaron más tiempo alrededor del objeto familiar. Esto también se pudo observar en el gráfico 15 que refleja los datos promedio de las trayectorias por los cuadrantes, durante 10 min, confirmando los datos anteriores.

En la Tabla 4 se muestra que no se observaron diferencias significativas en el número total de exploraciones entre los controles y controles sometidos a un cambio de objeto, ni entre los tratados o tratados con cambio de objeto, registrados en los primeros 2 minutos o a los 10 min

de video. El número total de exploraciones hace referencia a las que se realizan por el animal apoyándose o no a las paredes del campo abierto.

Las exploraciones sin apoyo permiten la evaluación de estados de ansiedad/estrés en los animales, por ejemplo, un mayor número de exploraciones sin apoyarse a las paredes de la arena significa menor stress/ansiedad de los animales, y es usualmente evidenciado en los últimos 5 minutos de una prueba que dura 10 min (Figura 16). Por tal motivo, los animales tratados mostraron un mayor número significativo de exploraciones sin apoyo a las paredes del campo abierto y una menor discriminación en comparación con los animales control que son más activos/exploratorios (Akkerman, y otros, 2012). En los animales tratados con cambio de objeto también se pudo observar un aumento, aunque no significativo, de las exploraciones sin apoyo.

Se caracteriza a la "defecación emocional" como la que se produce a un ritmo mayor de aquella producida en la casa jaula. La falta de alimento o bebida en el campo abierto y un ayuno moderado de los animales debería producir disminuciones en el número de las bolas de materia fecal o las gotas de orina, pero se demostró que los ratones incrementan sus defecaciones y micciones en vez de disminuirlas con pruebas repetidas y sucesivas en el campo abierto. A su vez, se demostró que la defecación parece ser una mejor medida de la emocionalidad que micción (Hall, 1934).

En cuanto al número de bolas de material fecal registradas de este trabajo, se pudieron obtener los valores promedio y su error estándar (Figura 17). Los animales control y los controles con cambio de objeto mostraron un valor promedio de número de bolas de material fecal fue de 1.6 ± 0.8 y 1.0 ± 0.5 respectivamente, valores registrados en los primeros 2 minutos de videos. Mientras que, para los animales tratados y tratados con cambio de objeto, los valores promedio de bola de materia fecal registrados durante ese tiempo fueron de 1.0 ± 0.5 y de 0.6 ± 0.2 . Esto podría indicar que dos minutos no fueron suficientes como para encontrar diferencias.

Los valores obtenidos durante los 10 minutos totales del video mostraron un incremento en todos los casos, para los controles y controles con cambio de objeto el valor promedio de bolas de materia fecal fue de 3.4 ± 0.8 y 4.4 ± 1.2 y para los tratados y tratados con cambio de objeto de 4.0 ± 1.0 y 4.6 ± 1.1 respectivamente. La falta de cambios drásticos en la defecación registrada para los animales controles y tratados (con y sin cambio de objeto), podría mostrar que la exposición repetida a un estímulo no influye en el comportamiento en este caso.

La falta de resultados concluyentes podría deberse al tamaño de la muestra o a que la interpretación de la defecación como indicador de emocionalidad, no es suficiente dado que depende de un número de variables como la tensión, el sexo y la experiencia temprana (Schambra, Nunley, Harrison, & Lewis, 2016). Para otros investigadores la defecación no

estaría relacionada con la emocionalidad porque no estaría estrictamente bajo el control del sistema nervioso simpático (ARCHER, 1973).

En la figura 18 se puede observar que los animales controles tuvieron micciones con y sin cambio de objeto. Por otra parte, los animales tratados con y sin cambio de objeto prácticamente tuvieron micción nula. Se considera que la micción no es una buena medida de emocionalidad ya que no se tuvieron datos contundentes para demostrarlo.

Con la prueba de reconocimiento de objetos fue posible conocer que el modelo epigenético presenta validez aparente, debido a que, se reproduce alteraciones de la memoria presentes en los pacientes esquizofrénicos. Futuros experimentos empleando este modelo permitirán establecer o no la existencia de validez predictiva es decir la reversión de los comportamientos descritos por la administración de fármacos antipsicóticos.

Conclusión

Los modelos animales para el estudio de la esquizofrenia permiten modelar algunos de los síntomas característicos de la enfermedad, dado que una de las principales dificultades es la variabilidad sintomatológica de los pacientes esquizofrénicos. Los modelos animales, también permiten un acercamiento hacia las causas que originan la enfermedad, así como la búsqueda de nuevas terapias o mejora de los tratamientos ya existentes. Es por ello, que empleando modelos experimentales en roedores, se han intentado reproducir los principales síntomas de la esquizofrenia, resolviendo los problemas éticos y logísticos presentes en los estudios con seres humanos. En este estudio se empleó un modelo de herencia epigenética, luego los animales fueron sometidos a una prueba de reconocimiento de objetos en el campo abierto, dado que es una herramienta de evaluación de la memoria, capaz de detectar alteraciones cognitivas y conductuales sutiles. Los ratones son capaces de discriminar entre objetos y reconocer un objeto visto previamente de una novedad. En este caso se pudo observar que los ratones control pudieron discriminar entre el objeto nuevo y el familiar durante los 10 minutos totales de los videos. Los tratados con cambio de objeto no tuvieron preferencia por ninguno de los dos objetos, preferencia nula, lo que fue interpretado como un déficit de memoria. En cuanto a la trayectoria se pudo observar una preferencia marcada en el grupo control por el objeto nuevo, debido a una actividad locomotora elevada cerca del objeto novedoso. Los animales tratados por otro lado tuvieron una actividad locomotora disminuida y pasaron más rato cerca del objeto familiar. En las exploraciones sin apoyo, los animales tratados tuvieron valores más elevados y una menor discriminación, en contraposición con los animales control que fueron más activos/exploratorios. Finalmente, la evaluación de los cambios de emocionalidad de los animales medidos por las defecaciones y micciones en el campo abierto no mostraron diferencias significativas entre los animales controles y tratados con L-metionina.

Bibliografía

- Akkerman, S., Blokland, A., Reneerkens, O., P. van Goethem, N., Bollen, E., Gijsselaers, H. J., . . . Steinbusch, H. W. (2012). Objects recognition testing: methodological consideration on exploration and discrimination measures. *Behav. Brain Res*, 335–347.
- ARCHER, J. (1973). Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behaviour*, 21, 205–235.
- Bedregal, P., Shand, B., Santos, M. J., & Ventura-Junca, P. (2010). Aportes de la epigenética en la comprensión del desarrollo humano. *Revista Médica de Chile*, 366-372.
- Briel M, Müller KF, Meerpohl JJ, von Elm E, Lang B, & Motschall E, et al. (Syst Rev. 2013). *Publication bias in animal research: a systematic review protocol*.
- Chile, D. d. (2017, Junio). Guías Clínicas AUGÉ. *Tratamiento de personas desde el primer episodio de Esquizofrenia*. Santiago de Chile: Gobierno de Chile.
- Conde, I. L., & Santos, P. M. (2015). Implicaciones de los mecanismos epigenéticos en el desarrollo y tratamiento de los trastornos de la personalidad. *Actas españolas de psiquiatría*, (pp. 42-50).
- Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res* 215, 244–254.
- Geerts, H., Spiros, A., Roberts, P., Twyman, R., & Alphs, L. (2012). *Blinded Prospective Evaluation of Computer-Based Mechanistic Schizophrenia Disease Model for Predicting Drug Response*. Retrieved from PLoS ONE: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049732>
- Genis AD, & López Rubacava C. (2011). *¿Es posible modelar esquizofrenia en un modelo animal?* El Residente.
- Hall, C. S. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, 18(3), 385–403.
- Henderson VC, Kimmelman J, Fergusson D, Grimshaw JM, & Hackam DG. (2013). *Threats to Validity in the Design and Conduct of Preclinical Efficacy Studies: A Systematic Review of Guidelines for In Vivo Animal Experiments*. PLoS Med.
- Jáquez-Cabalceta, G. M.-G. (2017). Modelos animales en roedores para el estudio de la esquizofrenia. *PSIENCIA. Revista Latinoamericana de Ciencia Psicológica*.
- L. Tremolizzo, G. Carboni, W. B. Ruzicka, C. P. Mitchell, I. Sugaya, P. Tueting, . . . E. Costa. (December 24, 2002). *An epigenetic mouse model for molecular and behavioral neuropathologies related to schizophrenia vulnerability*. PNAS .

- MacCallum C.J. (2010). *Reporting Animal Studies: Good Science and a Duty of Care*. PLoS Biol.
- Mardomingo Sanz, M. (2015). Epigenética y trastornos psiquiátricos. *Volumen XIX*.
- McGraw-Hill. (n.d.). Esquizofrenia. *Global Education Holdings*.
- National Centre for the Replacement, Refinement, & and Reduction of Animals in Research (NC3RS). (2008). Responsibility in the Use of Animals in Bioscience Research: Expectations of the Major Research Council and Charitable Funding Bodies. *London: Tradewinds*.
- NC3RS. (n.d.). *National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research*. Retrieved from <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>
- NC3RS. (n.d.). *National Centre for the Replacement, Refinement, and Reduction of Animals in Research*. Retrieved from <https://www.nc3rs.org.uk/housing-and-husbandry-mice>
- Nicholas Meyer, J. H. (2012). Schizophrenia. *Elsevier*.
- Oliver Sturman, Pierre-Luc Germain, & Johannes Bohacek. (2018 Sep). *Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test*. *Stress*.
- Ordieres, M. G. (2018). Genética e epigenética.
- Parra-Blanco A, González N, González R, Ortiz-Fernández-Sordo J, & Ordieres C. (2013). *Animal models for endoscopic training: do we really need them?*
- Paz, R. H. (2005). Modelos fisiopatológicos de la esquizofrenia: de dopamina a glutamato, de glutamato a GABA. *Rev Chil Neuro-Psiquiat*.
- PV Gejman, A. S. (2010, Marzo). El papel de la genética en la etiología de la esquizofrenia. *Psiquiatr Clin North Am*.
- Schambra, U. B., Nunley, K., Harrison, T. A., & Lewis, N. (2016). *Consequences of low or moderate prenatal ethanol exposures during gastrulation or neurulation for open field activity and emotionality in mice*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2016.06.003>.
- Scolari, M. J. (2009). Hipótesis epigenética de la esquizofrenia: bases moleculares y modelos experimentales. *Psicofarmacología (Buenos Aires)*, 29-32.
- Stuffrein-Roberts, S., Joyce, P. R., & Kennedy, M. A. (2008). Papel de la epigenética en los trastornos mentales. *Revista de psiquiatría de Australia y Nueva Zelanda*.