

PROYECTO FINAL DE INGENIERÍA

ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES METABÓLICAS E INMUNOLÓGICAS EN UN MODELO MURINO DE LA ESQUIZOFRENIA

Becker, Lucila Belen – LU 1082624

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

Gelman, Diego Matías – IBYME

2021



**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Índice

Resumen	4
Abstract	5
1. Introducción	6
1.1. La esquizofrenia.....	6
1.2. Signos y síntomas de la esquizofrenia	7
1.3. Modelos animales para el estudio de la esquizofrenia.....	8
1.4. Hipótesis del origen de la esquizofrenia	11
1.4.1. Hipótesis dopaminérgica	11
1.4.2. Hipótesis gabaérgica.....	11
1.5. Interneuronas de parvalbúmina y los receptores de dopamina D2	12
1.5.1. Interneuronas de parvalbúmina	12
1.5.2. Receptores de dopamina.....	13
1.6. Pacientes esquizofrénicos presentan problemas metabólicos e inmunológicos	13
2. Hipótesis.....	17
3. Objetivos	18
4. Materiales y Métodos.....	20
4.1. Animales utilizados	20
4.2. Marcación de animales	20
4.3. Extracción de ADN.....	21
4.4. Genotipado de los animales	21
4.5. Extracción de suero.....	23
4.6. Citometría	23
4.7. Perfusión de animales y obtención de cortes cerebrales.....	24
4.8. Protocolo de inmunofluorescencia de IBA-1 para identificar microglía.....	24
4.9. Inmunohistoquímica para identificar la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH)	25
4.10. Montaje de tejidos en portaobjetos	26
4.11. Deshidratación de los tejidos	26
4.12. Ensayos ELISA.....	26
4.13. Medición de Triglicéridos, Colesterol total, LDL y HDL	27
4.14. Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (GTT).....	27

4.15. Cuantificación de microglía.....	27
4.16. Análisis estadístico	28
5. Resultados	29
5.1. Caracterización metabólica.....	29
5.1.1. Determinación de Triglicéridos, Colesterol total, HDL, LDL y ratios	29
5.1.2. Test de tolerancia a la glucosa.....	33
5.2. Caracterización inmunológica	34
5.2.1. Determinación de citoquinas proinflamatorias.....	34
5.2.2. Análisis de células y parámetros inmunes a través de citometría	35
5.2.3. Caracterización y análisis de microglía a través de inmunofluorescencia	45
5.2.4. Inmunohistoquímica de la enzima Tirosina-Hidroxilasa	47
6. Discusión.....	49
6.1. Perspectivas a futuro.....	53
7. Conclusión	54
8. Bibliografía	55

Resumen

La esquizofrenia es un trastorno mental crónico que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial (Farah, 2018) y se caracteriza por un conjunto heterogéneo de signos y síntomas que se clasifican en síntomas positivos, negativos y cognitivos (Golam M. Khandaker et al., 2015).

Los pacientes que padecen esta enfermedad presentan una esperanza de vida reducida respecto a la de la población general ya que la tasa de mortalidad es dos veces mayor. Las causas del aumento en el índice no sólo se deben al mayor número de suicidios, accidentes o conductas de riesgo, sino que hay evidencias que sugieren como responsables del aumento a enfermedades asociadas, como las cardiovasculares y la diabetes mellitus tipo 2 (Perry, McIntosh, Weich, Singh, & Rees, 2016), así como también las alteraciones metabólicas e inmunológicas.

Aunque aún no se haya definido dónde está el origen de las comorbilidades médicas observadas, se sabe que hay una asociación entre la desregulación glucémica, la inflamación y la esquizofrenia (Steiner et al., 2014).

En este trabajo, analizamos características metabólicas e inmunológicas en un modelo animal de la esquizofrenia que carece del receptor de dopamina D2 exclusivamente de las interneuronas de PV, de forma de identificar una expresión diferencial de marcadores objetivos que puedan resultar útiles para desarrollar métodos diagnósticos confiables que finalmente puedan ser trasladados a la clínica.

Nuestros resultados reflejan que el modelo estudiado, presenta diferencias significativas en niveles de colesterol total, HDL y una recuperación más lenta de los niveles de glucosa en sangre en pruebas de tolerancia a la glucosa. Además, presentan una tendencia de niveles de IL-6 y CRP elevados, tal cómo se observa en pacientes; y presentan alteraciones en las poblaciones inmunitarias estudiadas con diferentes tendencias a diferentes edades, siendo éste un punto clave para seguir estudiando ya que nos permitiría identificar en esa variación de tendencias, potenciales marcadores pronósticos de la enfermedad.

Abstract

Schizophrenia is a chronic mental disorder that affects approximately 1% of the world's population (Farah, 2018) and is characterized by a heterogeneous set of signs and symptoms that are classified into positive, negative and cognitive symptoms (Golam M. Khandaker et al., 2015).

Patients with this disease have a reduced life expectancy compared to that of the general population since the mortality rate is two times higher. The causes of the increase in the index are not only due to the greater number of suicides, accidents or risk behaviors, but there is evidence that suggests associated diseases such as cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus are responsible for the increase (Perry et al., 2016), as well as metabolic and immunological alterations.

Although the origin of the observed medical comorbidities has not yet been defined, it is known that there is an Association between glyceic dysregulation, inflammation and schizophrenia (Steiner et al., 2014).

In this work, we analyze metabolic and immunological characteristics in an animal model of schizophrenia that lacks the dopamine D2 receptor exclusively from PV interneurons, in order to identify a differential expression of objective markers that may be useful to develop reliable diagnostic methods that finally may be transferred to the clinic.

Our results reflect that the studied model presents significant differences in total cholesterol levels, HDL and a slower recovery of blood glucose levels in glucose tolerance tests. In addition, they present a trend of elevated IL-6 and CRP levels, as observed in patients; and present alterations in the immune populations studied with different trends at different ages, this being a key point to continue studying since it would allow us to identify potential prognostic markers of the disease in this variation in trends.

1. Introducción

1.1. La esquizofrenia

La esquizofrenia es un trastorno mental crónico que afecta aproximadamente al 1% de la población mundial, con mayor prevalencia de aparición en hombres (Farah, 2018). Generalmente, se presenta mediante delirios paranoicos y alucinaciones auditivas en la adolescencia tardía o adultez temprana (Insel, 2010).

El concepto moderno de esquizofrenia se desarrolló a finales del siglo XIX, aunque sus síntomas fueron descriptos durante años. En la década de 1890, la esquizofrenia fue categorizada por el psiquiatra alemán Emil Kraepelin con el concepto de “demencia praecox”. Emil Kraepelin había propuesto dos categorías para clasificar a los pacientes con trastorno mental severo, “demencia praecox” y “enfermedad maniácodepresiva”, llamada más tarde trastorno bipolar. Sin embargo, la clasificación no fue utilizada, dado que el pronóstico, punto clave para la categorización, no fue diferencial. Por lo tanto, surgieron clasificaciones alternativas donde se incluyen la teoría del desarrollo, que sugiere una superposición genética entre los trastornos bipolares y la esquizofrenia, y la teoría del continuo, que sugiere un continuo entre los principales trastornos psiquiátricos que va desde el trastorno depresivo unipolar hasta la esquizofrenia con una gravedad creciente en todo el espectro (Laursen, Nordentoft, & Mortensen, 2014).

De todos modos, en la Clasificación Internacional de Enfermedades de la Organización Mundial de la Salud (CIE-10; Órgano Mundial de la Salud. 1994a), el Manual Estadístico de Diagnóstico 5 (DSM V) y en el manual europeo de enfermedades psiquiátricas, la esquizofrenia se define como una entidad distinta respecto de la bipolaridad y otros trastornos psiquiátricos (d'Arma et al., 2021; Laursen et al., 2014; Tandon et al., 2013).

La importancia del estudio de la enfermedad radica en las severas consecuencias que produce en los pacientes que pueden derivar en la imposibilidad para estos de llevar una vida normal, teniendo consecuencias para los familiares directos que deben atenderlos. Además, los pacientes con esquizofrenia presentan una esperanza de vida reducida respecto a la de la población general ya que la tasa de mortalidad es dos veces mayor para quienes presentan esta enfermedad respecto de la población sana. Las causas del aumento en el índice, no sólo se deben al mayor número de suicidios, accidentes o conductas de riesgo, sino que hay

evidencias que sugieren como responsables del aumento a enfermedades asociadas, como las cardiovasculares y la diabetes mellitus tipo 2 (Perry et al., 2016).

1.2. Signos y síntomas de la esquizofrenia

La esquizofrenia es caracterizada por un conjunto heterogéneo de signos y síntomas. Estos se clasifican en síntomas positivos, negativos y cognitivos. Los síntomas positivos son aquellos que se suman a la personalidad de los pacientes, manifestándose principalmente en forma de delirios y alucinaciones. Los síntomas negativos son aquellos referidos a una disminución, pérdida o ausencia de comportamientos normales relacionados con la motivación, el interés y la expresión, por lo tanto, se observa en los pacientes síntomas de asocialidad, abolición, anhedonia, alogia o afecto embotado (Correll & Schooler, 2020; Kahn et al., 2015). Por último, tenemos los síntomas cognitivos que afectan tanto la función ejecutiva como la memoria, dando como resultado una memoria deficiente (Golam M. Khandaker et al., 2015).

La gravedad de los síntomas positivos generalmente oscila durante el tiempo, pero se sabe que éstos aumentan con la presencia del estrés y tienen tendencia a disminuir a medida que la edad avanza.

Los síntomas negativos son centrales en la esquizofrenia y han sido reconocidos como una de las características principales de la enfermedad desde las primeras descripciones del trastorno (Galderisi, Mucci, Buchanan, & Arango, 2018). Sin embargo, hoy en día no existen tratamientos farmacológicos para estos síntomas, ya que la mayoría de los medicamentos antipsicóticos actuales tienen un rol efectivo sólo sobre los síntomas positivos, pero no así sobre los negativos o cognitivos (Correll & Schooler, 2020), siendo únicamente tratados por medio de terapia psicosocial, con resultados limitados.

El primer antipsicótico descubierto fue la clorpromazina, el cual tenía un rol efectivo sobre los síntomas positivos, pero generaba agranulocitosis en algunos pacientes; por lo tanto, se restringió su uso y se indagó en el desarrollo de otros antipsicóticos que no causaran efectos secundarios motores, denominados antipsicóticos atípicos o antipsicóticos de segunda generación (SGA, del inglés *second generation antipsychotics*). En el corto plazo, los síntomas son mejor controlados por los antipsicóticos de segunda generación, aunque hoy en día, no hay

evidencias significativas de que sean más efectivos que los de primera generación (Vogel Martinez, León, Torres, & Crossley, 2017).

Actualmente, ante el primer episodio de psicosis, se comienza el tratamiento para la enfermedad por medio de la administración de antipsicóticos de segunda generación como son la risperidona, olanzapina o quetiapina, aunque todavía se usan fármacos de primera generación como el haloperidol, dada su eficacia clínica y bajo costo, ya que son medicamentos genéricos. En la actualidad, la mayoría de los neurolépticos utilizados para tratar la enfermedad tienen mayor afinidad por los receptores de dopamina D2, aunque puedan bloquear también otros receptores (Seeman, 1987), como los de serotonina.

La clozapina también es un antipsicótico de segunda generación, pero se administra a pacientes que no hayan mostrado una respuesta efectiva frente a otros fármacos, dado que tiene severos efectos secundarios en los glóbulos blancos y requiere de rigurosos controles sanguíneos para su administración (Khokhar, Henricks, Sullivan, & Green, 2018).

En cuanto al diagnóstico de la enfermedad, no hay hoy en día métodos confiables o marcadores efectivos. El diagnóstico se basa únicamente en la visualización de signos y síntomas a lo largo del tiempo según la perspectiva del psiquiatra, donde se evalúa la presencia de síntomas claves: delirios, alucinaciones, dificultad en el habla, conducta desorganizada y la visualización de síntomas negativos; aunque sólo con la presencia de los dos primeros, es válido el diagnóstico (Farah, 2018). Sin embargo, no hay manera de identificar los pacientes que van a desarrollar esquizofrenia antes de que los síntomas positivos sean evidentes y menos aún, adelantarse a la enfermedad.

1.3. Modelos animales para el estudio de la esquizofrenia

Los modelos animales con poder predictivo de trastornos psiquiátricos complejos, como la esquizofrenia, son esenciales para aumentar la comprensión de sus bases neurobiológicas y para el desarrollo de nuevos fármacos con mejor acción terapéutica. Su utilización permite monitorear la progresión de la enfermedad y hacer comparaciones con estudios en humanos, brindando la oportunidad de realizar monitoreos invasivos o pruebas de nuevas terapias que no serían posibles en pacientes. Sin embargo, hay algunos síntomas centrales de los trastornos psiquiátricos que son exclusivamente humanos, como las

alucinaciones y delirios, los cuales son difíciles de evaluar en los modelos animales. Por ello, no se habla de animales con esquizofrenia sino de animales que presentan características reminiscentes a dicha enfermedad.

Los modelos animales, para que sean de utilidad, deben cumplir con ciertas características: que posean una validez aparente (homología de síntomas), validez predictiva (mostrar la respuesta farmacológica esperada, o la falta de ella, al tratamiento con antipsicóticos conocidos y posibles nuevas terapias complementarias aún por desarrollar) y validez constructiva (replicar la lógica y patología neurobiológica teórica) del trastorno clínico que se está modelando.

Actualmente existen diversos modelos animales que se basan en diferentes aproximaciones experimentales: alteraciones durante el desarrollo, inducción por fármacos, lesiones cerebrales o por medio de manipulación genética (Jones, Watson, & Fone, 2011).

Los modelos animales del neurodesarrollo se generan mediante la manipulación del medio ambiente en el que se encuentran los animales durante las etapas neonatales, o bajo la administración de fármacos, con el fin de producir cambios irreversibles en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) durante el período perinatal y juvenil ya que se ha observado, según la epidemiología humana, que la exposición del neonato a agresiones ambientales adversas, aumenta el riesgo de desarrollar esquizofrenia. Algunos ejemplos de estas perturbaciones son el estrés materno, la desnutrición, la infección o activación inmunitaria, o las complicaciones obstétricas como la hipoxia (Boksa, 2010).

La interrupción de la neurogénesis durante un período gestacional crítico, las lesiones neonatales del hipocampo ventral, el aislamiento social posterior al destete de los roedores y la activación inmune perinatal o materna se han propuesto como modelos de neurodesarrollo que replican varios de los síntomas centrales de la esquizofrenia (Cilia, Reavill, Hagan, & Jones, 2001; Jongen-Rêlo et al., 2004; Le Pen et al., 2006; Meyer, Feldon, & Fatemi, 2009; Moser, Hitchcock, Lister, & Moran, 2000).

Los modelos farmacológicos son también muy utilizados y dos de los principales son por medio de la administración de amfetamina y/o de fenciclidina (Koszła, Targowska-Duda, Kędzierska, & Kaczor, 2020). El modelo generado a partir de amfetamina trata de imitar la desregulación de la neurotransmisión dopaminérgica, dado que fue la primera hipótesis

propuesta para la esquizofrenia; y el modelo de fenciclidina genera los síntomas a través de una afección a los receptores de NMDA (Mouri, Noda, Enomoto, & Nabeshima, 2007). Sin embargo, ambos se generan mediante el mismo mecanismo: la administración diaria de dosis de los mencionados fármacos a roedores, con resultados que modelan muy bien a los síntomas positivos observados en pacientes esquizofrénicos (Featherstone, Kapur, & Fletcher, 2007).

Los modelos de lesiones se obtienen mediante la generación de una lesión neonatal en el hipocampo ventral (vHip), ya que esta región se corresponde con el hipocampo anterior en humanos. La lesión se genera mediante la inyección local de un compuesto químico particular, causando anomalías en el comportamiento luego de la pubertad y anomalías del desarrollo de la corteza prefrontal (PFC) y el núcleo accumbens (nAcc). Los cambios de comportamiento producidos por las lesiones vHip aparecen progresivamente con el desarrollo, entre los que se encuentran los déficits en la interacción social, el aumento de la agresión, el deterioro en el aprendizaje espacial y la memoria de trabajo, junto con la hipersensibilidad locomotora al estrés (Chambers, Moore, McEvoy, & Levin, 1996; Lodge & Grace, 2009).

Por último, se encuentran los modelos genéticos que son superiores en muchos sentidos respecto a los mencionados anteriormente, ya que son homogéneos y reproducibles, cualidades que los mencionados previamente no presentan, dado que las lesiones no siempre van a ser generadas de la misma forma en diferentes animales, ni la administración de los fármacos es específica, generando una liberación de dopamina sistémica y difícil de controlar. Además, los modelos genéticos nos permiten obtener una población de estudio dentro de la cual sabemos qué animales van a reproducir los síntomas y eso nos puede dar la oportunidad de detectar con mayor precisión un marcador predictivo de la enfermedad. Existen diversos modelos genéticos, obtenidos a partir de distintos abordajes entre los cuales tenemos el modelo obtenido mediante la delección del receptor *ErbB4* en interneuronas, lo cual despliega fenotipos similares a los observados en pacientes con esquizofrenia (Del Pino et al., 2013), y al modelo generado a partir de la hipofunción de receptores de NMDA en interneuronas gabaérgicas (Nakao et al., 2019), pero en este trabajo utilizamos el modelo generado en el laboratorio del Dr. Diego Gelman que resulta de la eliminación selectiva del receptor dopaminérgico D2 de las interneuronas de parvalbúmina *PvalbCre-D2* (Tomasella et al., 2018).

1.4. Hipótesis del origen de la esquizofrenia

1.4.1. Hipótesis dopaminérgica

La hipótesis dopaminérgica fue postulada por primera vez en la década de 1960 y es la más duradera en psiquiatría. Establece que los pacientes esquizofrénicos presentan una mayor actividad dopaminérgica o anomalías en la neurotransmisión dopaminérgica (Koszła et al., 2020). Fue propuesta luego de observar que la clorpromazina trataba con éxito los síntomas positivos de pacientes con esquizofrenia y posteriormente se demostrara que esa droga bloquea los receptores de dopamina de tipo 2.

La dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico más importante del Sistema Nervioso Central de los mamíferos y participa en la regulación de diversas funciones como la conducta motora, la emotividad y la afectividad, así como también en la comunicación neuroendocrina (Howes, McCutcheon, Owen, & Murray, 2017).

Este neurotransmisor está presente en vías discretas identificadas y muy caracterizadas. La velocidad de síntesis de la dopamina está determinada por la acción de la tirosina hidroxilasa (TH), enzima que hidroxila el aminoácido tirosina para formar L-dopa, que es precursor de la dopamina. Por lo tanto, la tirosina hidroxilasa es un punto de control clave en el que la neurona dopaminérgica regula la cantidad y disponibilidad del neurotransmisor (Thompson, 1990).

El exceso de la actividad dopaminérgica en pacientes esquizofrénicos se puede estabilizar utilizando antagonistas de receptores de dopamina, particularmente antagonistas del receptor de dopamina D2, el cual es un receptor acoplado a proteína G. El antagonismo sobre los receptores de dopamina D2 es un objetivo común para los fármacos antipsicóticos (Yang & Tsai, 2017).

1.4.2. Hipótesis gabaérgica

El ácido gamma-aminobutírico (GABA), es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central y es sintetizado principalmente por la acción de la enzima GAD67. Diversos estudios han demostrado una reducción en la expresión de la enzima en pacientes esquizofrénicos (Stedehouder & Kushner, 2017).

Las interneuronas gabaérgicas son fundamentales para las redes cerebrales y la sincronía de las oscilaciones neuronales, que es un mecanismo fundamental para el establecimiento de memoria, percepción y conciencia. Las anomalías en la actividad de las interneuronas gabaérgicas pueden ser la base de alteraciones en la sincronía neural, oscilaciones gamma anormales y alteraciones de la memoria de trabajo que se observan en la esquizofrenia (Yang & Tsai, 2017).

Además, estudios clínicos de pacientes han mostrado alteraciones en el sistema de neurotransmisores GABA, lo que sugiere que podría estar involucrado en la fisiopatología de la enfermedad, particularmente el subtipo de neuronas gabaérgicas que expresan el neuropéptido parvalbúmina (Koszła et al., 2020; Yang & Tsai, 2017).

1.5. Interneuronas de parvalbúmina y los receptores de dopamina D2

1.5.1. Interneuronas de parvalbúmina

Dentro de las interneuronas gabaérgicas encontramos principalmente tres subtipos según el marcador que expresen: la proteína de unión a calcio (Ca^{2+}) llamada parvalbúmina (PV), el neuropéptido llamado somatostatina (SST), o el receptor de serotonina ionotrópico 5HT3a (5HT3aR). Las interneuronas de parvalbúmina son un subtipo de interneuronas gabaérgicas, las cuales liberan el neurotransmisor GABA y son interneuronas inhibitorias locales que juegan un papel fundamental en la configuración de los circuitos corticales. En ratones, el grupo de interneuronas de parvalbúmina representa el 40% del total de las interneuronas gabaérgicas, el grupo SST el 30% y el 30% restante corresponde al grupo 5HT3aR. La gran diversidad de interneuronas gabaérgicas proporciona los medios por los cuales la corteza cerebral puede realizar operaciones complejas. Los subtipos de interneuronas difieren en la morfología, las propiedades intrínsecas de la membrana, la conectividad y la dinámica de la sinapsis (Rudy, Fishell, Lee, & Hjerling-Leffler, 2011).

Estudios en pacientes con esquizofrenia han demostrado que la expresión de interneuronas gabaérgicas positivas para parvalbúmina se ve disminuida, junto con la visualización de anomalías en la mielinización de las mismas. Teniendo en cuenta que la edad de inicio de la esquizofrenia en la adolescencia tardía se superpone con la maduración de la mielinización en la corteza prefrontal, se cree que las anomalías en este proceso también

pueden estar involucradas en la fisiopatología de la enfermedad (Reynolds & Neill, 2016; Stedehouder & Kushner, 2017). Así mismo, la disminución en el número de interneuronas positivas para parvalbúmina, puede deberse al efecto del estrés oxidativo observado en pacientes esquizofrénicos durante las primeras etapas del trastorno (Steullet et al., 2018).

1.5.2. Receptores de dopamina

Los receptores de dopamina se clasifican según si son de tipo D1 o de tipo D2. Los receptores de dopamina de tipo D1 son mediadores de la excitación, mientras que los receptores de dopamina de tipo D2 son mediadores de la inhibición. La familia de receptores de tipo D2 está compuesta por los receptores D2, D3 y D4, los cuales inhiben la formación de AMPc mediante la inhibición de la enzima adenilato ciclasa, mientras que la familia de receptores de tipo D1, está conformada por los receptores D1 y D5, y son los responsables de estimular la adenilato ciclasa, favoreciendo la formación de AMPc. Los receptores D1 y D2 son los subtipos más abundantes en el sistema nervioso central y se expresan en distintos tipos neuronales (Missale, Nash, Robinson, Jaber, & Caron, 1998).

El modelo animal generado por el laboratorio y utilizado en este trabajo, obtenido mediante la eliminación selectiva de los receptores de dopamina D2 exclusivamente de las interneuronas de parvalbúmina, evidencia comportamientos reminiscentes a los observados en pacientes, así como también expresa varios endofenotipos descriptos para la esquizofrenia. El modelo surge a partir de la combinación de dos evidencias observadas hasta el momento: que defectos en las interneuronas de parvalbúmina llevarían al desarrollo de enfermedades psiquiátricas, y que los receptores de dopamina D2 son el blanco central de los antipsicóticos y se expresan durante el desarrollo en dichas interneuronas (Tomasella et al., 2018).

1.6. Pacientes esquizofrénicos presentan problemas metabólicos e inmunológicos

Las alteraciones metabólicas en pacientes esquizofrénicos se han observado en diversos estudios, así como también las alteraciones inmunológicas. Aunque aún no se haya definido dónde está el origen de las comorbilidades médicas observadas en los pacientes, se

sabe que hay una asociación entre la desregulación glucémica, la inflamación y la esquizofrenia (Steiner et al., 2014).

Las anormalidades observadas en el metabolismo de la glucosa conducirían al desarrollo de síndrome metabólico y diabetes tipo 2, enfermedades para las cuales los pacientes con esquizofrenia tienen mayor prevalencia (Garcia-Rizo et al., 2017; Perry et al., 2016). El síndrome metabólico es definido por la American Heart Association como la presencia de tres o más de los siguientes componentes: obesidad abdominal, dislipidemia aterogénica, presión arterial elevada, resistencia a la insulina, estado protrombótico y estado proinflamatorio. Si bien se sabe que los medicamentos antipsicóticos tienen efectos sobre control glucémico, se ha observado intolerancia a la glucosa en pacientes esquizofrénicos que no tomaban ninguna medicación, indicando que el metabolismo aberrante de la glucosa es inherente a la esquizofrenia e independiente de la administración de antipsicóticos (Steiner et al., 2014).

A su vez, la esquizofrenia está asociada a la desregulación del sistema inmune, con la presencia de niveles alterados de células inmunitarias, y a una concentración aumentada de citoquinas proinflamatorias, que podría conducir a afecciones inflamatorias crónicas y autoinmunes (Bergink, Gibney, & Drexhage, 2014). Se han observado concentraciones elevadas de interlequina-1- β (IL-1 β), de proteína C reactiva (CRP) y de factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) en pacientes esquizofrénicos (Perry et al., 2016), así como también se han observado niveles elevados de interlequina-6 (IL-6) en la infancia, la cual se asocia a un mayor riesgo de desarrollo de psicosis (Golam M. Khandaker et al., 2015).

Además, dentro del estado proinflamatorio mencionado en pacientes esquizofrénicos, análisis histológicos post mortem y de tomografía de emisión de positrones (PET) demostraron un estado de microglía activada. La microglía se puede definir fundamentalmente como los macrófagos del sistema nervioso central que, en estado de activación, liberan citoquinas proinflamatorias induciendo un estado proinflamatorio (Bergink et al., 2014; Golam M. Khandaker et al., 2015; Steiner et al., 2014).

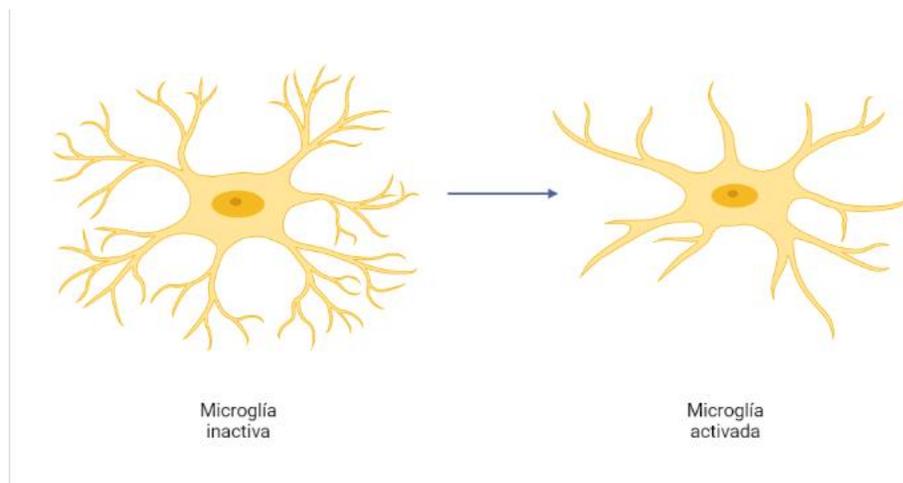


Figura 1. Diagrama de activación de la microglía. Podemos diferenciar una microglía activada de una inactiva, observando el estado de condensación en sus ramificaciones. En su estado inactivo, la microglía se encuentra ampliamente ramificada. Por el contrario, podemos ver una condensación de su estructura en su estado activado.

Al mismo tiempo, en pacientes esquizofrénicos, se han encontrado niveles elevados de monocitos circulantes, una elevada expresión de genes correspondientes a citoquinas proinflamatorias en leucocitos circulantes y una reducción en el número de células T (Bergink et al., 2014). En resumen, los parámetros inmunes en sangre de pacientes esquizofrénicos se ven alterados, así como los niveles absolutos de linfocitos CD3⁺, CD4⁺, linfocitos totales y la relación CD4/CD8 (Miller, Gassama, Sebastian, Buckley, & Mellor, 2013).

Por otra parte, se cree que no sólo la infección puede desencadenar psicosis, sino también la autoinmunidad. Una enfermedad autoinmune es definida como la presencia de autoanticuerpos específicos circulantes, y hay cierta evidencia de autoanticuerpos contra el receptor de NMDA, avalando una interacción entre ambas afecciones médicas. La hipótesis que avala esta teoría expone lo siguiente, dado que en muchos casos la prevalencia de enfermedades autoinmunes inflamatorias era anterior al inicio de la psicosis, esta última, podría ser inducida por un proceso inflamatorio desencadenado por la reacción autoinmune (Bergink et al., 2014). Actualmente, hay evidencia que avala el papel del sistema inmune en la patogénesis de la

esquizofrenia y otras patologías mentales como la depresión, lo cual refuerza la interacción mencionada entre la esquizofrenia y la autoinmunidad (Golam M. Khandaker et al., 2015).

2. Hipótesis

La hipótesis de trabajo plantea que el modelo animal PV ^{D2R/-} reproduce alteraciones inmunológicas y metabólicas de forma comparable a lo que se describe en pacientes con esquizofrenia.

3. Objetivos

El objetivo general de este proyecto de investigación fue ahondar en los mecanismos celulares y moleculares mediados por el receptor de dopamina D2 expresado en interneuronas de parvalbúmina que conducen al desarrollo de los fenotipos reminiscentes a la esquizofrenia observados en un modelo animal.

Para lograrlo, fueron propuestos los siguientes objetivos específicos:

- Determinar si los animales mutantes para el receptor de dopamina D2 muestran niveles alterados de marcadores inflamatorios como Interleuquina 1 (IL-1), Interleuquina 6 (IL-6) y Proteína C Reactiva (CRP).
- Determinar si el sistema nervioso central de animales mutantes para el receptor de dopamina D2 muestra activación microglial asociada a un estado inflamatorio.
- Determinar los niveles de fosforilación de la proteína glucosa sintasa kinasa 3 beta (Gsk-3 β) en sangre periférica de animales mutantes para el receptor de dopamina D2.
- Determinar los niveles de ácidos grasos en sangre de animales mutantes para el receptor de dopamina D2.

Pero dado el contexto de la pandemia Sars-Cov-2, los objetivos que se pudieron cumplir fueron los siguientes:

- Determinación de los niveles de Interleuquina 6 (IL-6) y Proteína C Reactiva (CRP).
- Determinación de la activación microglial asociada a un estado inflamatorio.
- Determinación de los niveles de ácidos grasos en sangre.

Quedando excluidos los siguientes objetivos:

- Determinación de Interleuquina 1 (IL-1)

- Determinación de los niveles de fosforilación de la proteína glucosa sintasa kinasa 3 beta (Gsk-3 β) en sangre periférica de animales mutantes para el receptor de dopamina D2.

Alternativamente, se añadieron los siguientes objetivos que pudieron cumplirse gracias a la disponibilidad de insumos y equipos:

- Determinación de los niveles de expresión de la enzima Tirosina Hidroxilasa en animales mutantes y controles.
- Determinación de intolerancia a la glucosa en los animales mutantes y controles a través de un test de tolerancia a la glucosa (GTT).
- Determinación de alteraciones en las poblaciones linfocitarias en animales mutantes y controles a través de citometría.

4. Materiales y Métodos

4.1. Animales utilizados

Los grupos de animales de estudio en este trabajo fueron obtenidos mediante el cruzamiento de dos líneas de ratones: la línea $DRD2^{flox/flox}$ y la línea $PV+/Cre::DRD2flox/flox$. Dentro de este trabajo, se consideran animales control (Wt) aquellos que son negativos para Cre y que por lo tanto tienen presente el exón 2 del receptor de dopamina D2. Por el contrario, se consideran animales knock-out (Ko) aquellos que sí portan la recombinasa Cre y escinden al exón 2 del receptor de dopamina D2 ($DRD2$), provocando un cambio en el marco de lectura que genera una proteína aberrante. Todos los animales fueron mantenidos en un ambiente controlado de temperatura, ciclo de luz y humedad y fueron agrupados en un máximo de 5 animales en cajas ventiladas individualmente, con alimento y agua a libre demanda.

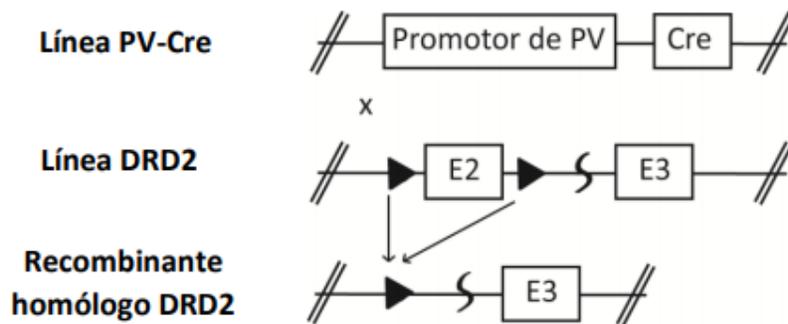


Figura 2. Eliminación selectiva del DRD2 de las interneuronas de PV. Diagrama esquemático de las líneas de animales que se utilizaron para generar la escisión del exón 2 del DRD2 en las interneuronas de PV. El exón 2 del receptor de dopamina D2 se encuentra flanqueado por sitios loxP (triángulos negros), sitios que son reconocidos por la recombinasa Cre. En presencia de dicha recombinasa, se produce la escisión del exón 2, cambiando el marco de lectura y produciendo una proteína aberrante. La recombinasa Cre se expresa bajo el promotor de PV, otorgando especificidad neuronal.

4.2. Marcación de animales

Para la marcación de los animales se siguió un sistema de referencia con marcas en las orejas. Se inmovilizaron los animales y se realizaron muescas en las orejas, con el fin de asignarle un número a cada individuo para poder identificarlo. El tejido extraído al momento

de la marcación fue guardado en tubos eppendorf para la posterior extracción de ADN y genotipado.

4.3. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN del tejido proveniente de la marcación de los animales, se añadieron 75ul de solución de lisis (NaOH 50mM) a cada eppendorf cuidando de no contaminar las muestras, y se colocaron 45 minutos a 95°C en un baño seco. Pasados los 45 minutos, se dejaron reposar los eppendorfs unos segundos a temperatura ambiente hasta que la temperatura disminuyó y se realizó un spin en la centrifuga para evitar que se pierda material al abrirlos. Luego se añadieron 75ul de solución de neutralización (TrisHCl 10 mM) y fueron almacenados a 4°C.

4.4. Genotipado de los animales

Para genotipar los animales, se realizaron dos PCRs: PCR de DRD2^{flox/flox} y PCR de CRE. La secuencia de los cebadores utilizados para genotipificar los animales fueron: Para DRD2: sentido 5' GCT TCA CAG TGT GCT GCC TA 3' (forward primer) y antisentido 5' CCA TTG CTG CCT CTA CCA AG 3' (reverse primer) y para PV+/Cre: sentido 5' GCA TAA CCA GTG AAA CAG CAT TGC TG 3' (forward primer: Cre2) y antisentido 5' AAA ATT TGC CTG CAT TAC CG 3' (reverse primer: Cre6).

Las condiciones de reacción para la PCR de DRD2^{flox/flox} fueron las siguientes: 2,5ul de Buffer 10X, 0,6ul [0,2mM final] de dNTP's (10mM), 0,9ul [1,5mM final] de Mg⁺⁺ (50mM), 2ul [2uM final] de Primer forward (25uM), 2ul [2uM final] de Primer reverse (25uM), 16ul de H₂O, 1ul de ADN y se añaden 5ul de Mix Taq (que contiene 0,5ul de Buffer 10X, 0,3ul de Taq y 4,2ul de H₂O) para llegar a un volumen final de 30ul. El programa utilizado consta de 5 minutos a 95°C; 34 ciclos de 30 segundos a 95°C, 20 segundos a 62°C y 20 segundos a 72°C; y finalmente 5 minutos a 72°C.

Las condiciones de reacción para la PCR de PV+/Cre, fueron las siguientes: 0,50ul [0,2mM final] de dNTP's (10mM), 2,50ul [1X final] de Buffer Taq (10X), 1,25ul [1,25uM final] de Primer Cre2 (25uM), 1,25ul [1,25uM final] de Primer Cre6 (25uM), 1,00ul [2mM] de MgCl₂ (50mM), 17,25ul de H₂O, 1ul de ADN y 0,25ul de Taq para llegar a un

volumen final de 25ul. El programa utilizado consta de 5 minutos a 94°C; 35 ciclos de 25 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C y 20 segundos a 72°C; y finalmente 5 minutos a 72°C.

Los productos de PCR corresponden a una banda de 300pb en el caso de la detección de Cre. Los animales que no portan el gen de la recombinasa Cre no amplifican ninguna banda. En el caso de los animales DRD2 flox, se observa una banda de 230 pb en un animal Wt o de 375 pb en un animal con sitios loxP. Los productos de las PCRs fueron corridos en geles de agarosa 0.9% (SIGMA) en buffer TAE 1X. Se dejaron correr aproximadamente 20 minutos para detectar la presencia de Cre y 45 minutos para DRD2, y se tomaron fotos bajo luz ultravioleta. A modo de ejemplo se presentan dos fotografías correspondientes a los productos de PCR mencionados.

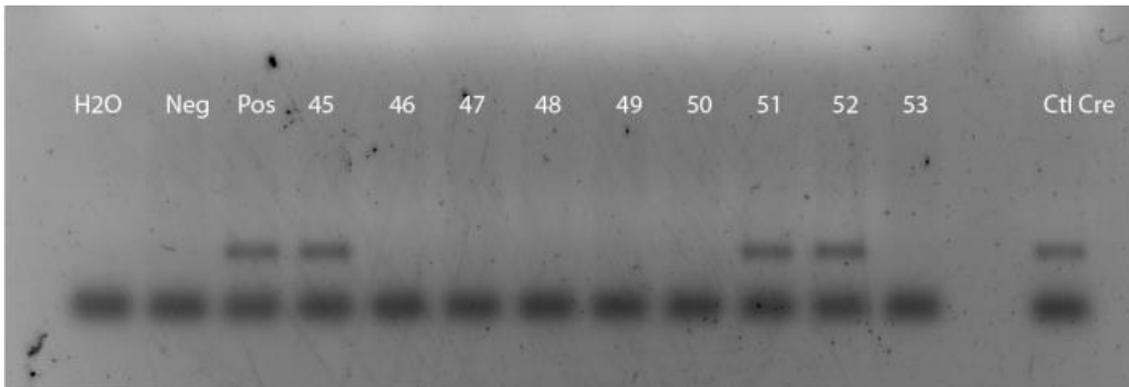


Figura 3. Productos de PCR correspondientes al gen Cre+. Se detecta la presencia de la enzima Cre en los animales. Se observa la columna correspondiente al control interno “H2O”, el control negativo en la columna “Neg”, el control positivo “Pos” y las muestras corresponden a las columnas identificadas como 45,46,47,48,49,50,51,52,53. La banda tiene aproximadamente 300pb. Los animales 45, 51 y 52 son positivos para el gen de Cre.

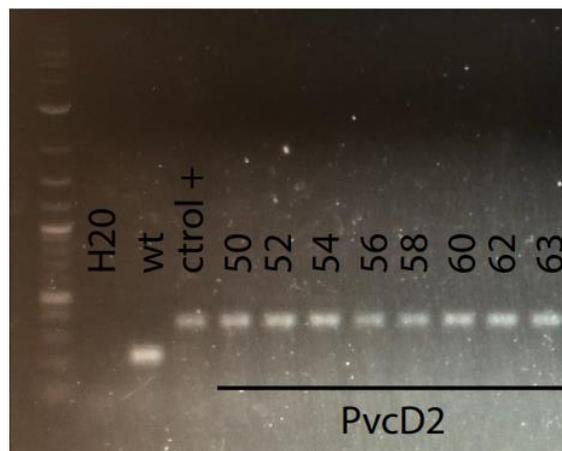


Figura 4. Productos de PCR correspondientes al gen DRD2 flox/flox. Se detecta la presencia de los sitios LoxP por medio de una banda de mayor tamaño respecto de un animal salvaje (Wt). Se puede observar la presencia del control interno en la columna identificada como “H2O”, el control negativo en la columna “wt”, el control positivo en la columna “ctrol +” y las muestras en las columnas subsiguientes. En esta imagen podemos observar, como era de esperar, que todos los animales son positivos para DRD2 flox/flox.

4.5. Extracción de suero

Se colectaron las muestras de sangre de animales Wild-type (Wt) y Knock-out (Ko) mediante decapitación. Con el fin de estandarizar el procesamiento de las muestras, se dejó transcurrir aproximadamente una hora para realizar la primera centrifugación de la sangre. Se centrifugó a 3200rpm durante 10 minutos. Luego, se tomó el sobrenadante (suero) cuidando de no tomar el precipitado que contenía los eritrocitos, y se procedió a una segunda centrifugación con los mismos parámetros (3200 rpm durante 10 minutos). Luego de la segunda centrifugación, se volvió a tomar el sobrenadante, que fue posteriormente alicuotado. Se realizaron alícuotas de diversos volúmenes: 5ul, 10ul, 25ul, 50ul y 100ul, y se almacenaron a -20°C. El fin de las alícuotas fue para evitar descongelar numerosas veces las muestras ya que esto modificaba la concentración sérica de proteínas.

4.6. Citometría

Para realizar las mediciones en el citómetro, se utilizó sangre heparinizada, la que fue tratada de la siguiente forma: Se diluyó la solución RBC Lysis/Fixation Solution (10X)

de BioLegend a 1X, diluyendo 1 parte de la solución con 9 partes de H₂O a temperatura ambiente. Se mezclaron 100ul de sangre total con anticuerpos conjugados fluorocromados anti-Mouse CD45 BV785, anti-Mouse CD11b APC, anti-Mouse Ly6G PE, anti-Mouse Ly6C APC-Cy7, anti-Mouse CD4 APC-Alexa 700, anti-Mouse CD8 PerCPCy5.5, anti-Mouse CD3 FITC. Se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 20 minutos y posteriormente se añadió 2 ml de solución RBC Lysis/Fixation Solution 1X mezclando suavemente en cada tubo. Se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 15 minutos y luego se centrifugó a 350Xg durante 5 minutos en una centrifuga con adaptadores para placa. Se desechó el sobrenadante y se añadieron 2 ml de Buffer de citometría (PBS 1X + 1 %FBS + 1 mM EDTA). Se centrifugó a 350XG durante 5 minutos y se volvió a desechar el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento celular en 0,5 ml de buffer de citometría y se analizaron las células inmediatamente por citometría de flujo en un citómetro BD LSR-Fortessa X20. Todos los Eppendorfs utilizados y placas MW96, poseían fondo en "U".

4.7. Perfusión de animales y obtención de cortes cerebrales

Los ratones fueron perfundidos por vía transcardíaca con paraformaldehído (PFA) 4% y el cerebro fue removido y fijado en la misma solución por 180 minutos a 4°C. El tejido fue crioprotegido secuencialmente en solución de sacarosa 10%, 20%, y 30% preparada en buffer salino fosfato (PBS) y luego cortados secuencialmente en un criostato Shandon Cryotome E (Thermo Scientific) en secciones coronales de 40 µm de grosor. Los cortes se distribuyeron de forma representativa en 10 series en tubos eppendorf que contenían polietilenglicol (PEG) y se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

4.8. Protocolo de inmunofluorescencia de IBA-1 para identificar microglía

Se tomó un tubo eppendorf con tejidos cerebrales de animales Ko y de animales Wt. Se volcaron los tejidos sobre una placa de Petri que contenía PBS 1X. Se colocó PBS 1X en dos pocillos de una placa MW12 y suavemente con un pincel fino, se pasaron los tejidos desde la placa a su respectivo pocillo. Se absorbió el Polietilenglicol/PBS de los pocillos utilizando una pipeta Pasteur cuidando de no llevarse ninguna sección. Se colocó solución de bloqueo (BSA 5% + PBS 1X).

Se dejó bloquear a temperatura ambiente durante 1 hora aproximadamente. Luego se quitó la solución de bloqueo y se colocaron 500ul de anticuerpo primario Rabbit anti-IBA 1 a cada pocillo y se dejó incubando durante dos noches en cuarto frío (4°C) con agitación. Posteriormente, se recuperó el anticuerpo primario, se lavó tres veces con PBST (PBS 1X + Tritón) durante 5 minutos y se colocó el anticuerpo secundario anti-Rabbit marcado con Alexa 555. Se dejó incubar durante 2 horas, se recuperó el anticuerpo y se lavó nuevamente (3 veces durante 5 minutos cada una con PBST). Posteriormente, los tejidos se montaron.

4.9. Inmunohistoquímica para identificar la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH)

Se utilizó tejido seccionado de animales Wt y Ko conservados a -20°C y se los pasó suavemente a una placa de Petri con PBS 1X y luego se pasaron a pocillos de una placa MW12 que contenía PBS 1X. Una vez transferidos a sus respectivos pocillos, se los dejó agitando sobre un agitador durante unos minutos a temperatura ambiente. Luego, se realizó el bloqueo utilizando BSTH (2% BSA, 10% suero de caballo, 0,25% Triton, disuelto en PBS 1X) que se encontraba a -20°C. Se colocaron 500ul de BSTH en cada pocillo. Se completaron los demás pocillos con agua filtrada para mantener la presión de vapor y se dejó bloquear durante 1 hora. Posteriormente, se retiró la solución de bloqueo y se colocó el anticuerpo primario Rabbit-anti-TH (1:1000) que estaba a 4°C. Se colocaron aproximadamente 400ul de solución con anticuerpo primario en los pocillos y se dejó incubando overnight en cuarto frío (4°C) con agitador. Al día siguiente, se recuperó el anticuerpo primario y se lavaron los tejidos tres veces con 500ul de PBST (PBS 1X + 0,25% Tritón). Se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con agitador. Terminados los lavados, se inactivaron las peroxidasas presentes en el tejido con una solución de 100ul de H₂O₂ 10 volúmenes (3%) + 900ul de PBS 1X (para evitar señal de peroxidasas endógenas, ya que el anticuerpo secundario tenía acoplado el sustrato de la enzima peroxidasa). Se colocaron 500ul de la solución en cada pocillo, y se dejó en agitador hasta que no salieron más burbujas, las cuales indican el agotamiento de las enzimas endógenas. Luego, se lavó nuevamente con PBST y se colocó el anticuerpo secundario anti-Rabbit IgG-peroxidasa (1:500). Se dejó incubar durante 1 hora. Pasada la incubación, se recuperó el anticuerpo secundario y se lavó 3 veces con PBS 1X durante 5 minutos en agitador y se colocó el complejo ABC (Streptavidina-Peroxidasa). Se dejó actuar durante 30 minutos sobre agitador

a temperatura ambiente. Luego, se recuperó el complejo ABC y se realizaron dos lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno. Para realizar el revelado, se utilizó el kit comercial DAB Peroxidase (HRP) Substrate Kit, 3,3'-diaminobenzidine (Catalog Number SK-4100) de VECTOR Laboratories. Para preparar la solución de revelado, se colocaron 84ul de Buffer, 20ul de DAB y 80ul de H₂O₂, y se llevaron a 5 ml con agua filtrada. Se añadió la solución simultáneamente a ambos tejidos dejando que la coloración aparezca lentamente y luego se frenó para evitar exceso de color, diluyendo la solución con PBS 1X y pipeteo. Luego, se procede al montaje de los tejidos y posterior deshidratación.

4.10. Montaje de tejidos en portaobjetos

Los tejidos se pasaron suavemente a una placa de Petri con solución de montaje (Gelatina SIGMA 0,2% y Tris-HCL pH 8) utilizando un pincel. Sobre la placa, se colocó el portaobjetos limpio (previamente se lavó con detergente y agua filtrada) inclinado y se comenzaron a montar los tejidos sobre el portaobjetos delicadamente de forma ordenada. Una vez terminado el montaje, se dejaron secando los portaobjetos con los tejidos resguardados de la luz.

4.11. Deshidratación de los tejidos

Una vez secos los tejidos montados, se los deshidrató para quitar lípidos presentes en el tejido realizando un pasaje por cuatro soluciones. Primero se los sumergió en etanol 70% durante 5 minutos, luego en etanol 96% durante 5 minutos, después en etanol 100% durante 5 minutos y finalmente en xilol durante 5 minutos. Una vez terminada la deshidratación, los tejidos quedaron transparentes y se colocaron los cubreobjetos utilizando DPX como medio de montaje, cuidando de que los tejidos no se sequen prematuramente.

4.12. Ensayos ELISA

Para la realización de los ensayos ELISA se utilizaron kits comerciales. Para determinar proteína C reactiva (CRP), se utilizó el kit comercial Mouse C-Reactive Protein/CRP DuoSet® ELISA (Catalog Number: DY1829) de R&D SYSTEMS; y para la determinación de interleuquina 6 (IL-6), se utilizó el kit comercial ELISA MAX™ Deluxe Set

Mouse IL-6 (Catalog Number: 431304) de Biolegend®. Seguimos el procedimiento indicado por el fabricante.

4.13. Medición de Triglicéridos, Colesterol total, LDL y HDL

Para estas determinaciones, el suero utilizado no debía haber pasado por un proceso de congelación por lo que se extrajo el suero minutos anteriores a las mediciones. La determinación de triglicéridos en suero de animales knock-out y wild-type, se realizó con el Kit comercial TG Color GPO/PAP AA de Wiener Lab. En cuanto a las determinaciones de colesterol total, HDL y LDL, también se utilizaron Kits comerciales. Se utilizó el Kit comercial Colestat enzimático de Wiener Lab para determinar colesterol total y el Kit comercial LDL Colesterol Reactivo Precipitante para la separación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en suero, determinando finalmente HDL. Luego por diferencia entre el valor del colesterol total y el valor de HDL, se determinó el valor de LDL para las muestras Knock-out y Wild-type. Para las determinaciones de LDL Colesterol y Triglicéridos, se requería que los animales estuvieran en ayuno, por lo que fueron hambreados previamente al ensayo.

4.14. Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (GTT)

Los animales fueron sometidos a 12 horas de ayuno la noche previa a la prueba, sin limitar el acceso al agua. Al día siguiente, se realizaron las mediciones basales (en ayunas) haciendo una incisión en la punta de la cola de los ratones para aplicar una gota de sangre en la tira reactiva del glucómetro. Se registraron los datos y luego se les administró 2 g de glucosa/kg de peso corporal mediante una inyección intraperitoneal (volumen de inyección de 0,1ml/10 g de peso corporal). Luego, se midió la glucosa en sangre a los 15, 30, 60 y 120 minutos aplicando una gota de sangre en una nueva tira reactiva.

4.15. Cuantificación de microglía

Para realizar la cuantificación de microglía, se tomaron fotos utilizando el microscopio confocal OLYMPUS BX41 con un objetivo 60X y se generaron stacks de fotos que se reconstruyeron utilizando el plug-in “Z project” del programa Image J. El análisis

posterior, constaba de un procesamiento de imágenes a través del plug-in “Analyse Skeleton”. Las imágenes fueron convertidas a 8 bits y a escala de grises, tal como lo indica el procedimiento, para visualizar mejor todas las tinciones positivas. Luego, se ajustó el brillo y contraste, y se ejecutó el filtro Unsharp Mask para aumentar aún más éste último. Se realizó un paso de limpieza aplicando el filtro Despeckle y luego se convirtió la imagen en binaria, quedando la imagen invertida con pérdida de uniones entre las ramificaciones de las unidades microgliales, por lo que se utilizaron las imágenes originales para reconstruirlas, tal como se muestra en la Figura 5. Luego de la reconstrucción, se guardó la imagen como un nuevo archivo y se ejecutó el plug-in AnalyzeSkeleton (2D/3D), el cual arrojó los resultados en forma de tabla y fueron exportados a Excel.

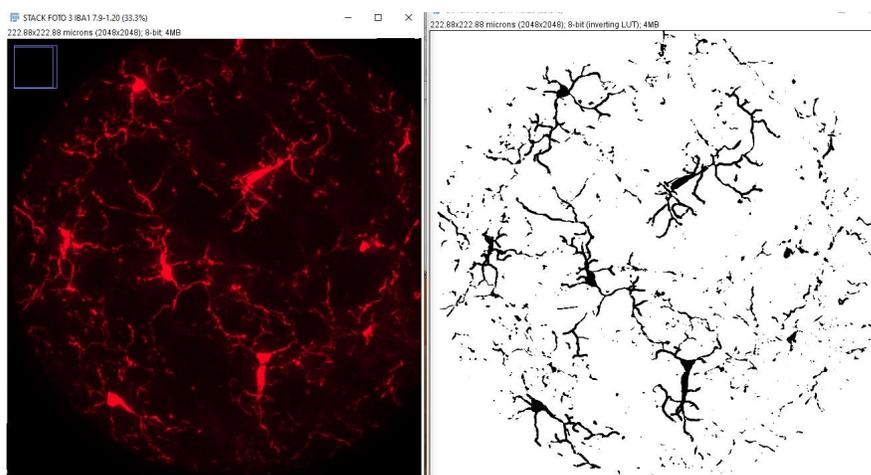


Figura 5. Reconstrucción de las células microgliales. A modo ilustrativo, se puede observar cómo se reconstruye la imagen para analizar las ramificaciones.

4.16. Análisis estadístico

Se realizaron los análisis estadísticos con el programa GraphPad Prism 8. Los resultados se presentan como la media \pm desvío estándar. Los datos fueron analizados por prueba t de Student no apareado. Se simboliza con ns las diferencias no significativas, con * si $p < 0,05$ y con ** si $p < 0,01$.

5. Resultados

5.1. Caracterización metabólica

5.1.1. Determinación de Triglicéridos, Colesterol total, HDL, LDL y ratios

Dado que existen reportes describiendo alteraciones metabólicas en pacientes con esquizofrenia, quisimos evaluar si el modelo animal desarrollado por nuestro laboratorio también presentaba dichas alteraciones. Para comenzar, realizamos la determinación de los niveles de ácidos grasos. Para esta determinación, utilizamos suero de los animales previamente ayunados y lo analizamos utilizando el kit comercial TG Color GPO/PAP AA de Wiener Lab®. En la **Figura 6** podemos observar que no hay diferencia significativa para los niveles de triglicéridos entre el grupo control y el grupo knock-out ($p=0,8117$).

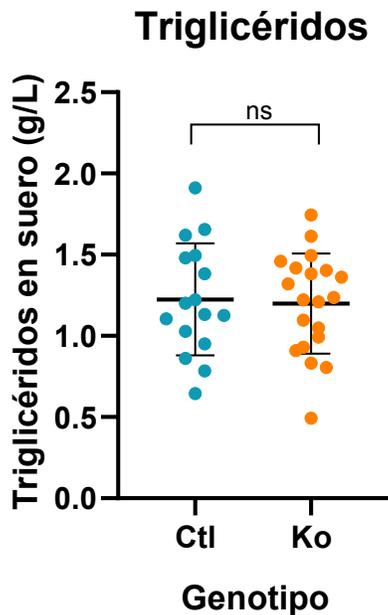


Figura 6. Determinación de triglicéridos en animales control y PVDRD2 knock-out. No se observaron diferencias significativas entre los grupos. Control $n=16$; $1,225 \pm 0.3450$ g/L. Knock-out $n=20$; $1,199 \pm 0.3087$ g/L. $p=0,8117$.

Para continuar con el análisis metabólico de los animales, analizamos los niveles de colesterol total en suero utilizando el kit comercial Colestat enzimático de Wiener Lab®. Como podemos observar en la **Figura 7**, se aprecia una reducción significativa en los niveles de colesterol total para los animales del grupo knock-out respecto del grupo control (P=0,0114)

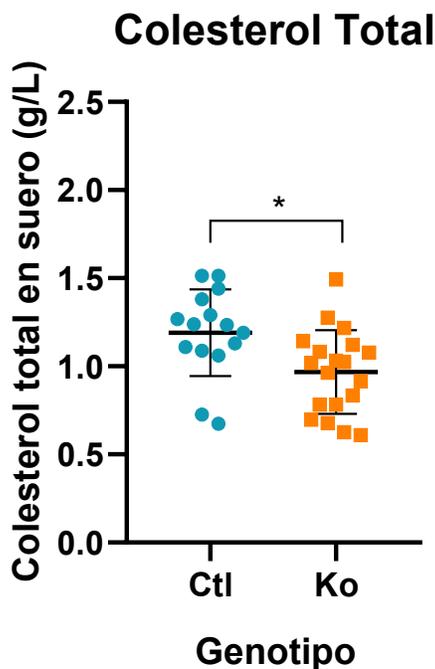


Figura 7. Determinación de niveles séricos de colesterol total en animales control y PVDRD2 knock-out. Se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=15; $1,191 \pm 0.2460$ g/L. Knock-out n=19; $0,9671 \pm 0.2373$ g/L. p=0,0114.

Posteriormente, determinamos los niveles séricos de las lipoproteínas LDL y HDL. Se utilizó el Kit comercial LDL Colesterol Reactivo Precipitante de Wiener Lab® para la determinación de HDL, mediante la separación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Luego, por diferencia entre el valor de colesterol total y el valor obtenido de HDL, se calcularon los respectivos valores de LDL para cada animal.

Observando la **Figura 8A**, podemos apreciar que los niveles de LDL se encuentran reducidos en el grupo knock-out respecto al grupo control, sin llegar a ser una diferencia significativa ($p=0,0607$). Sin embargo, en la **Figura 8B**, correspondiente a los niveles de HDL, podemos observar una reducción significativa en el valor sérico de la lipoproteína para el grupo knock-out respecto al grupo control ($p=0,0164$).

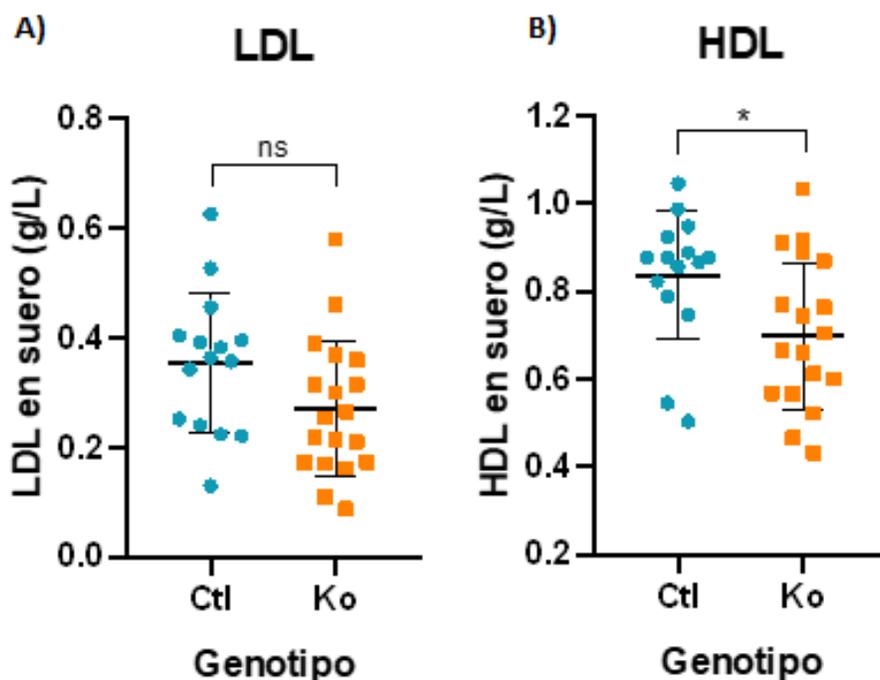


Figura 8. A) Determinación de LDL en suero de animales control y PVDRD2 knock-out. No se observa diferencia significativa entre los grupos. Control $n=15$; $0,3536 \pm 0,1277$ g/L. Knock-out $n=19$; $0,2692 \pm 0,1241$ g/L. $p=0,0607$. B) Determinación de HDL en suero de animales control y PVDRD2 knock-out. Se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control $n=15$; $0,8369 \pm 0,1470$. Knock-out $n=19$; $0,6975 \pm 0,1681$. $p=0,0164$.

Además, se calcularon los ratios entre colesterol total y HDL, conocidos como Colesterol no-HDL (Ratio CT-HDL) e índice de Castelli (Ratio CT/HDL), ya que son los mejores indicadores pronósticos para la enfermedad cardiovascular aterosclerótica (Acevedo, 2012).

En la **Figura 9**, podemos ver reflejados los resultados de los ratios calculados. En la **Figura 9A** podemos observar los valores correspondientes al Ratio CT-HDL, que se encuentra disminuido para el grupo knock-out respecto del grupo control, sin relevancia significativa ($p=0,0607$). Por otra parte, en la **Figura 9B**, observamos el Ratio CT/HDL, el cual también demuestra una disminución en el grupo Ko ($p=0,2063$).

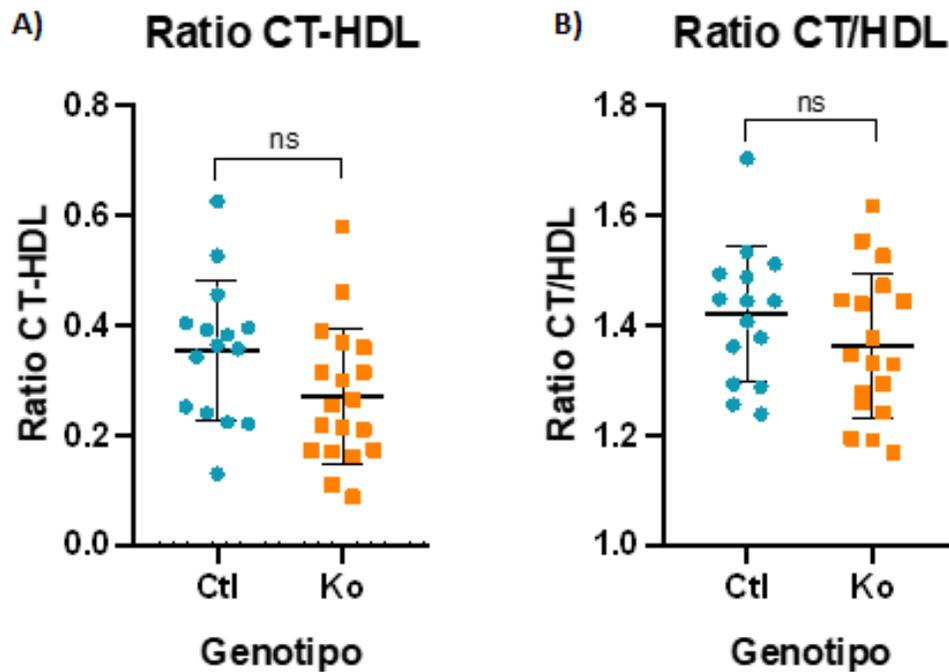


Figura 9. A) Determinación del Ratio CT-HDL en animales control y PVDRD2 knock-out. No se observa una diferencia significativa entre los grupos pero sí una tendencia a disminuir los valores en el grupo knock-out. Control n=15; $0,3536 \pm 0,1277$. Knock-out n=19; $0,2692 \pm 0,1241$. $p=0,0607$. **B) Determinación del Ratio CT/HDL en animales control y PVDRD2 knock-out.** No se observa una diferencia significativa entre los grupos pero sí una tendencia a disminuir los valores en el grupo knock-out. Control n=15; $1,419 \pm 0,1233$. Knock-out n=18; $1,361 \pm 0,1316$. $p=0,2063$.

5.1.2. Test de tolerancia a la glucosa

Con el fin de evaluar la respuesta de los animales a un shock de glucosa, se realizó una prueba de tolerancia. Para realizar el test, se inyectó de forma intraperitoneal una solución de glucosa a los animales, y se extrajeron muestras de sangre a intervalos, para determinar qué tan bien era asimilada a lo largo del tiempo.

Se registró la glucosa basal en sangre a tiempo 0 y luego se volvió a medir a los 5, 10, 15, 30, 60 y 120 minutos posteriores a la administración de glucosa. Se registraron los datos de los animales y se generó una curva con los promedios de cada tiempo (**Figura 10**). Luego se analizaron las diferencias observadas a los 30, 60 y 120 minutos y se confirmaron como diferencias significativas para los tres tiempos.

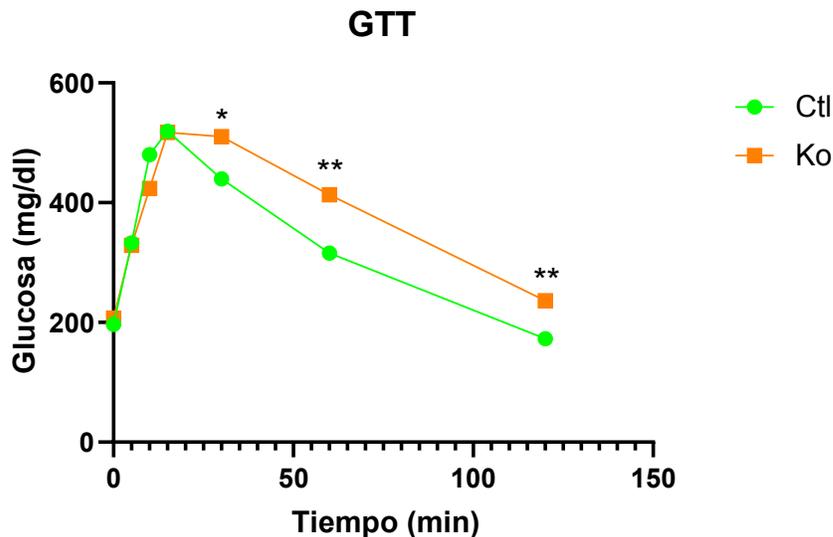


Figura 10. Test de tolerancia a la glucosa (GTT). Los datos utilizados en cada punto es un promedio de todos los animales determinados para ese tiempo. Se observan diferencias significativas en los tiempos correspondientes a 30, 60 y 120 minutos. A los 30 minutos: Ctl $439,9 \pm 101,3$, Ko $510,5 \pm 66,43$; $p=0,0421$. A los 60 minutos: Ctl $315,8 \pm 91,78$, Ko $413,3 \pm 83,28$; $p= 0,0079$. A los 120 minutos: Ctl $172,6 \pm 40,54$, Ko $236,1 \pm 39,75$; $p=0,0033$.

5.2. Caracterización inmunológica

5.2.1. Determinación de citoquinas proinflamatorias

Se evaluaron los niveles séricos de interleuquina-6 (IL-6) y proteína C reactiva (CRP) en el modelo animal en estudio, porque, como se mencionó en la introducción, los pacientes esquizofrénicos presentan niveles elevados de las citoquinas proinflamatorias mencionadas y uno de nuestros objetivos era el de evaluar si esto se replicaba en los animales.

En la **Figura 13A**, se ven reflejados niveles elevados de interleuquina-6 (IL-6) en el grupo knock-out con respecto al grupo control, aunque vale aclarar que dicha observación no presenta diferencia significativa ($p=0,0618$). Por otro lado, podemos observar en la **Figura 13B**, niveles elevados de proteína C reactiva (CRP) en los animales pertenecientes al grupo knock-out respecto a los animales que conformaban el grupo control, aunque también sin alcanzar una diferencia significativa ($p=0,3126$).

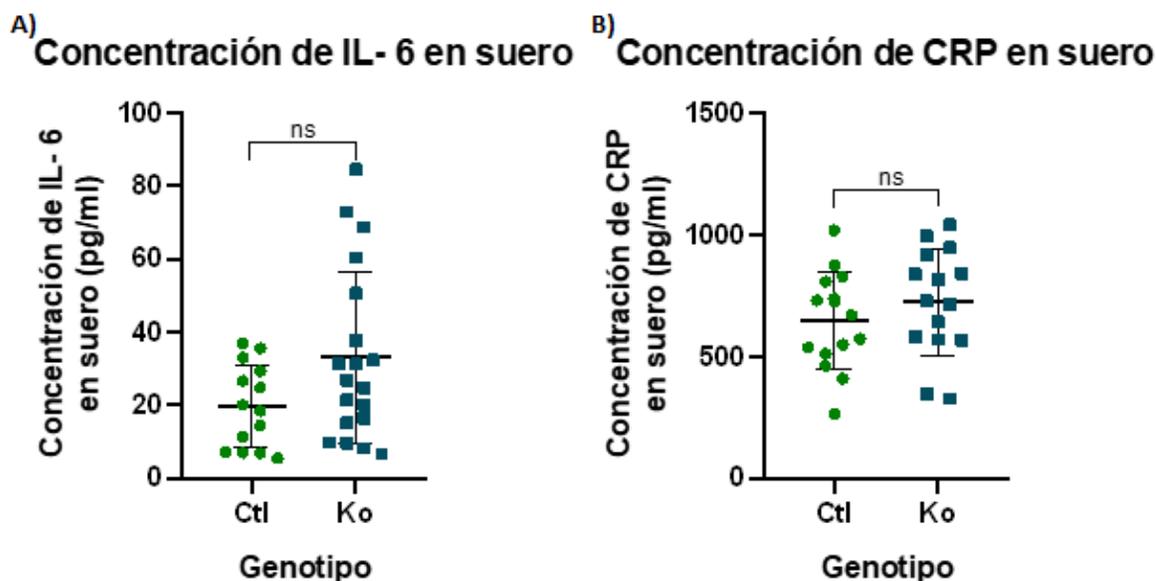


Figura 13. A) Determinación de Interleuquina-6 (IL-6) en suero de animales control y PVDRD2 knock-out. No se observa una diferencia significativa entre los grupos, pero sí una tendencia de niveles elevados en el grupo knock-out. Control n=14; 19,77 ± 11,39 pg/ml. Knock-out n=19; 33,04 ± 23,61 pg/ml. $p=0,0618$; ns, no

significativo. **B) Determinación de Proteína C Reactiva (CRP) en suero de animales control y PVDRD2 knock-out.** No se observa una diferencia significativa entre los grupos, pero sí una tendencia de niveles elevados en el grupo knock-out. Control n=15; $645,7 \pm 199,1$ pg/ml. Knock-out n=15; $724,4 \pm 219,1$ pg/ml. $p=0,3126$; ns, no significativo.

Las mediciones de las citoquinas se realizaron a partir de una muestra de suero previamente congelada. La determinación de interleuquina-6 se realizó siguiendo las descripciones del kit comercial ELISA MAX™ Deluxe Set Mouse IL-6 (Catalog Number: 431304) de Biolegend®. Para la determinación de proteína C reactiva (CRP) se utilizó el kit comercial Mouse C-Reactive Protein/CRP DuoSet® ELISA (Catalog Number: DY1829) de R&D SYSTEMS.

5.2.2. Análisis de células y parámetros inmunes a través de citometría

Para continuar con la caracterización del modelo animal, se evaluaron los parámetros inmunes de linfocitos circulantes en los animales de estudio, dado que los pacientes esquizofrénicos presentan alteraciones en estas poblaciones. Principalmente, se destaca un número aumentado de monocitos circulantes, una disminución de linfocitos T, y alteraciones en los niveles de linfocitos CD3⁺, CD4⁺, linfocitos totales y en la relación CD4/CD8.

La determinación de los parámetros inmunes se realizó a través de un ensayo de citometría para el cual se utilizaron muestras de sangre de animales control y knock-out de diversas edades, categorizados en los siguientes grupos:

- adultos mayores (animales mayores a 108 días)
- adultos jóvenes (animales entre 67 y 94 días)
- animales jóvenes (55 días de edad)

Para el análisis de los datos, los mismos van a ser presentados en 3 categorías:

- Un grupo que incluye a todos los animales estudiados
- Un grupo de adultos jóvenes
- Un grupo de adultos mayores

En los gráficos que se muestran a continuación, los datos van a ser presentados de acuerdo a dicha agrupación. El grupo referido a los animales jóvenes no pudo ser analizado como un conjunto debido a restricciones estadísticas (presentaba un n muy reducido).

El primer parámetro determinado fue el porcentaje de células CD45+, el cual es un marcador de superficie presente en todos los leucocitos: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos, con mayor expresión en los linfocitos B y T. Como podemos observar en la **Figura 14A**, correspondiente al análisis conjunto de los tres grupos, la población CD45+, es similar en ambos ($p=0,5284$). Pero analizando los datos de forma segmentada (**Fig. 14B y 14C**), observamos que despliega una tendencia a incrementarse en los animales knock-out correspondiente al grupo “adultos mayores” (**Fig. 14C**), ($p=0,0829$) y a disminuir en “adultos jóvenes” (**Fig. 14B**), ($p=0,0557$).

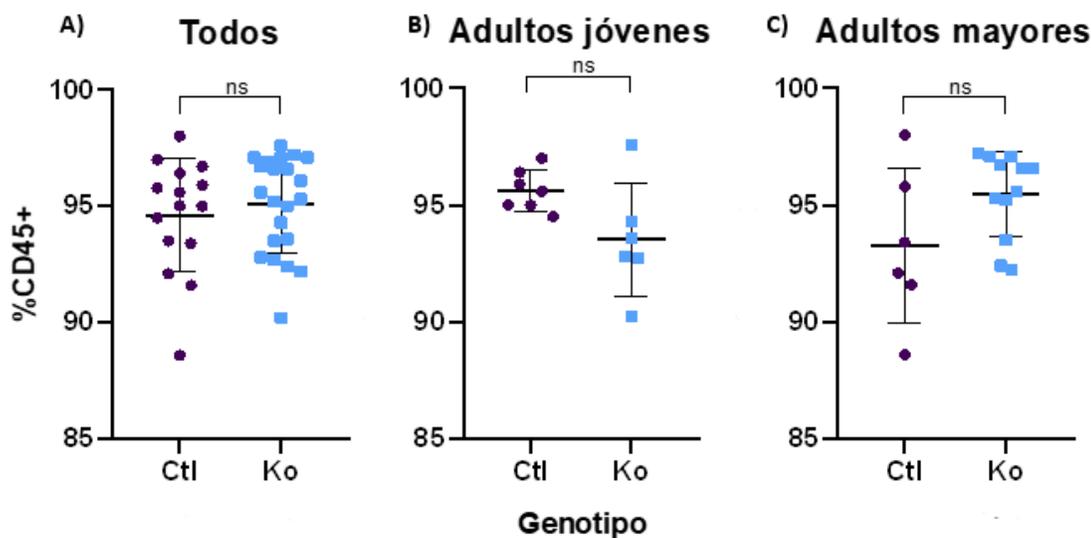


Figura 14. A) Determinación de la población CD45+ en animales control y PVDRD2 knock-out contemplando todos los datos. No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=15; $94,61 \pm 2,44$. Knock-out n=22; $95,08 \pm 2,076$. $p=0,5284$; ns, no significativo. **B) Determinación de la población CD45+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos jóvenes.** No se observa una diferencia

significativa entre los grupos, pero sí una tendencia de valores más bajos en el grupo knock-out. Control n=7; $95,63 \pm 0,877$. Knock-out n=6; $93,53 \pm 2,428$. $p=0,0557$; ns, no significativo. **C) Determinación de la población CD45+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos mayores.** No se observa una diferencia significativa entre los grupos, pero sí una tendencia de valores más altos en el grupo knock-out. Control n=6; $93,25 \pm 3,309$. Knock-out n=12; $95,46 \pm 1,821$. $p=0,0829$; ns, no significativo.

Luego, para conocer la proporción de linfocitos T dentro de la población de leucocitos, determinamos el porcentaje de células CD3+ (CD3+/CD45+). Observando el análisis conjunto de los datos (**Fig. 15A**), los niveles de células CD3+/CD45+ se ven disminuidos en el grupo knock-out ($p=0,2228$). Sin embargo, cuando analizamos los valores segmentados, la población CD3+/CD45+ se encuentra en valores similares para ambos grupos (control y knock-out) en el grupo “adultos mayores” (**Fig. 15C**). Analizando los valores en “adultos jóvenes” (**Fig. 15B**), vemos que CD3+/CD45+ también se encuentra disminuida en el grupo knock-out, con significancia estadística ($p=0,0255$).

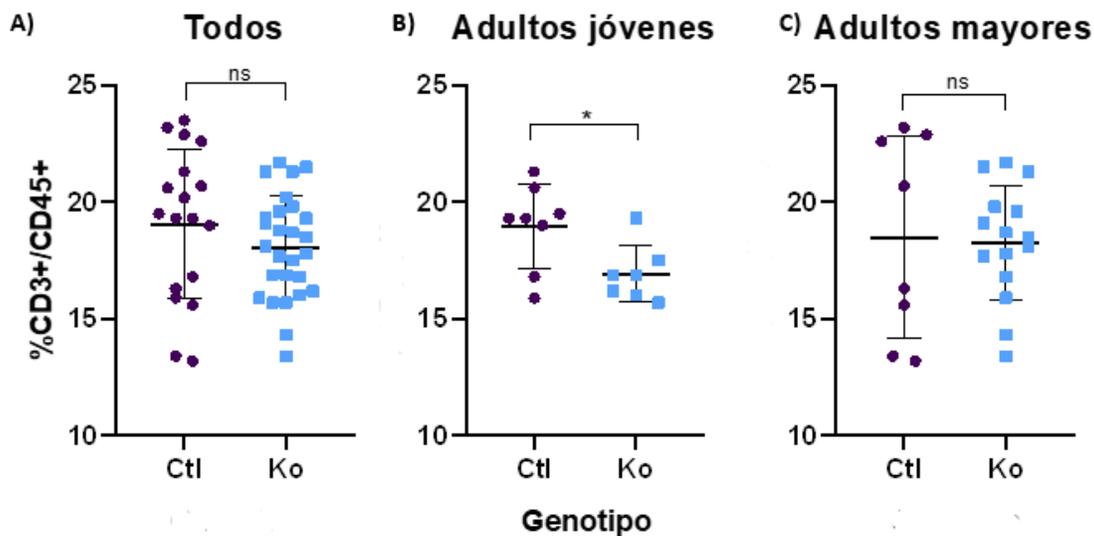


Figura 15. A) Determinación de la población CD3+/CD45+ en animales control y PVDRD2 knock-out contemplando todos los datos. No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=18; $19,07 \pm 3,226$. Knock-out n=27; $18,07 \pm 2,197$. $p=0,2228$. **B) Determinación de la población CD3+/CD45+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos jóvenes.** Se observa una diferencia

significativa entre los grupos. Control n=8; $18,96 \pm 1,802$. Knock-out n=7; $16,93 \pm 1,215$. $p=0,0255$. C)

Determinación de la población CD3+/CD45+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos mayores.

No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=8; $18,49 \pm 4,317$. Knock-out n=15; $18,28 \pm 2,453$. $p=0,8836$.

Posteriormente, para determinar la población mieloide, que abarca neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos, se determinó el porcentaje de células CD11b+/CD45+. El análisis general de los datos, podemos apreciarlo en la **Figura 16A**, donde observamos una leve tendencia en el grupo knock-out a presentar un porcentaje de la población CD11b+/CD45+ elevado ($p=0,6675$). Analizándola de manera segmentada, podemos ver en la **Figura 16C**, que el porcentaje se ve aumentado en el grupo knock-out correspondiente a “adultos mayores” ($p=0,2516$); y en la **Figura 16B** podemos ver detallado que esta población disminuye en el grupo knock-out perteneciente a “adultos jóvenes” ($p=0,3827$).

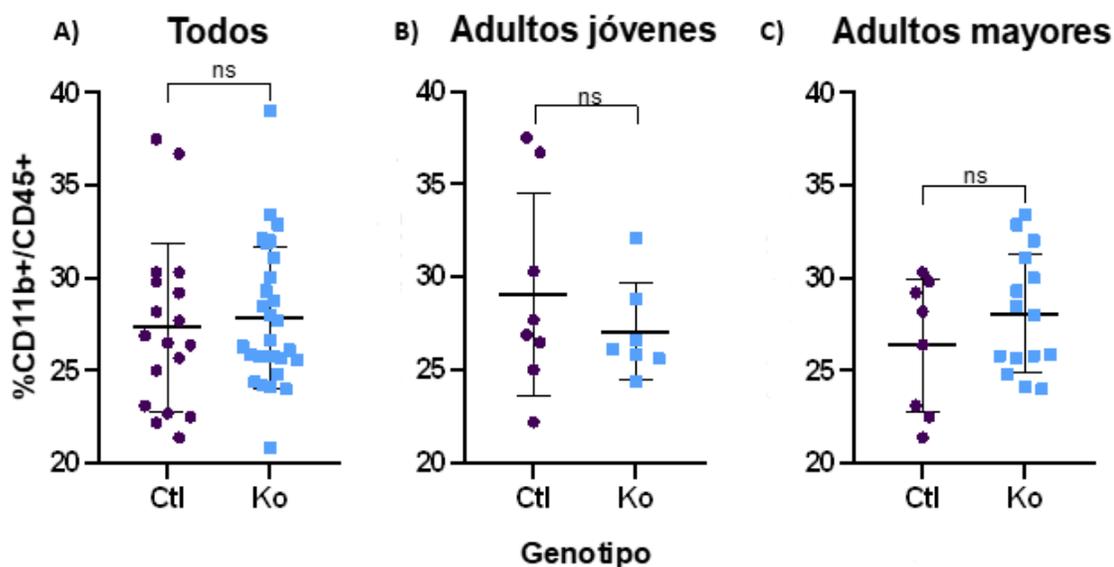


Figura 16. A) Determinación de la población CD11B+/CD45+ en animales control y PVDRD2 knock-out contemplando todos los datos. No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=18; $27,34 \pm 4,559$. Knock-out n=28; $27,88 \pm 3,835$. $p=0,6675$. **B) Determinación de la población**

CD11b+/CD45+ en adultos jóvenes. No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=8; 29,10 ± 5,448. Knock-out n=7; 27,06 ± 2,593. p=0,3827. **C) Determinación de la población CD11b+/CD45+ en adultos mayores.** No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=8; 26,36 ± 3,564. Knock-out n=15; 28,09 ± 3,223. p=0,2516.

Continuando con la caracterización, determinamos el porcentaje de la población CD4+/CD45+ la cual corresponde a los linfocitos T helper. En la **Figura 17A**, se aprecia que el porcentaje de dicha población es levemente inferior para el grupo knock-out respecto al de control (p=0,6507). Pero si observamos los datos analizados para el grupo “adultos mayores” (**Fig. 17C**), vemos que el porcentaje de la población CD4+/CD45+ se ve aumentada en el grupo de interés (p=0,1479). Ahora bien, analizando la **Figura 17B**, correspondiente al grupo “adultos jóvenes”, observamos que el porcentaje de la población se ve disminuida (p=0,3755).

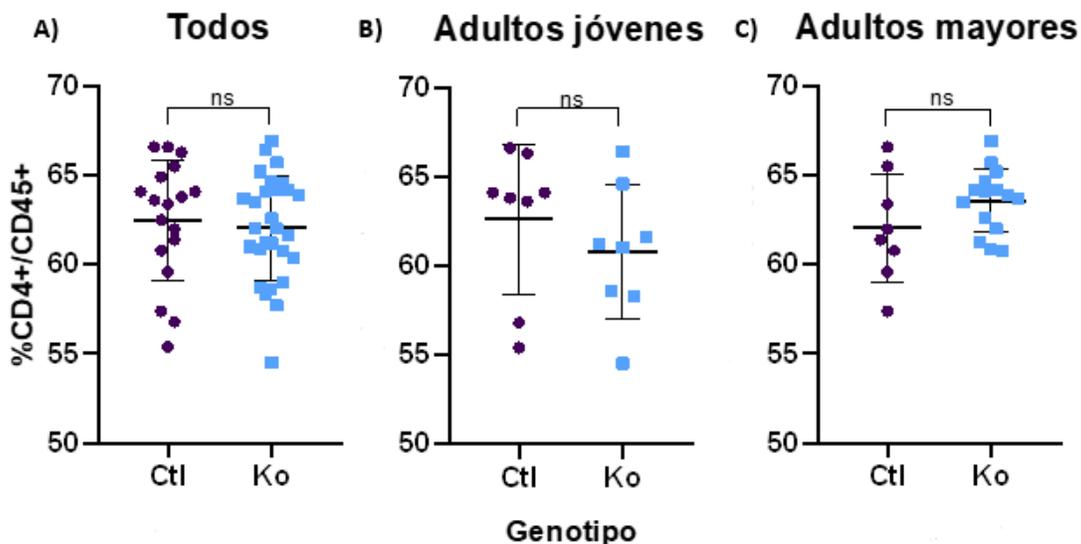


Figura 17. A) Determinación de la población CD4+/CD45+ en animales control y PVDRD2 knock-out contemplando todos los datos. No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n= 18; 62,49 ± 3,372. Knock-out n=28; 62,06 ± 2,930. p=0,6507. **B) Determinación de la población CD4+/CD45+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos jóvenes.** No se observa una diferencia

significativa entre los grupos. Control n=8; $62,59 \pm 4,177$. Knock-out n=8; $60,78 \pm 3,730$. $p=0,3755$.

Determinación de la población CD4+/CD45+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos mayores.

No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=8; $62,09 \pm 3,024$. Knock-out n=15; $63,58 \pm 1,775$. $p=0,1479$.

Luego, para conocer la población de linfocitos T citotóxicos, analizamos el porcentaje de células CD8+/CD45+. En la **Figura 18**, se aprecia una disminución a nivel general de dicha población, sin resultados significativos (**Fig. 18A**, $p=0,1537$), (**Fig. 18B**, $p=0,3088$), (**Fig. 18C**, $p=0,2874$).

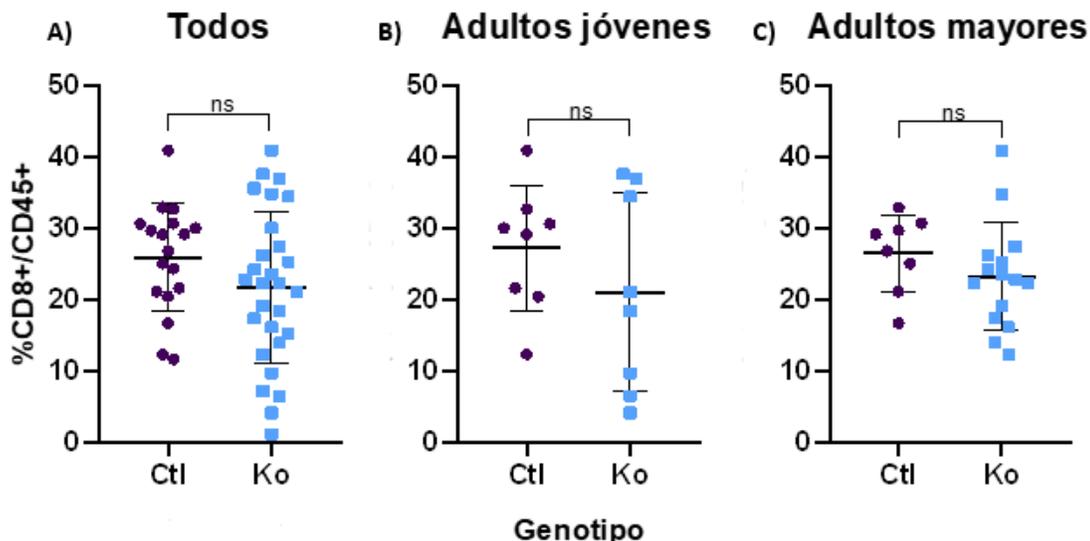


Figura 18. A) Determinación de la población CD8+/CD45+ en animales control y PVDRD2 knock-out contemplando todos los datos. No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=18; $25,87 \pm 7,545$. Knock-out n=28; $21,65 \pm 10,73$. $p=0,1537$.

B) Determinación de la población CD8+/CD45+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos jóvenes. No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=8; $27,20 \pm 8,788$. Knock-out n=8; $21,08 \pm 13,83$. $p=0,3088$.

C) Determinación de la población CD8+/CD45+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos mayores. No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=8; $26,51 \pm 5,394$. Knock-out n=15; $23,23 \pm 7,508$. $p=0,2874$.

Para conocer el ratio CD4/CD8, se calcularon los respectivos valores para cada grupo y se realizó el análisis estadístico obteniendo como resultado que, si bien no existe una diferencia significativa, el Ratio CD4/CD8 se ve levemente aumentado en el grupo Knock-out respecto del control (**Fig. 19A**, $p=0,1023$), (**Fig. 19B**, $p=0,3242$), (**Fig. 19C**, $p=0,0595$).

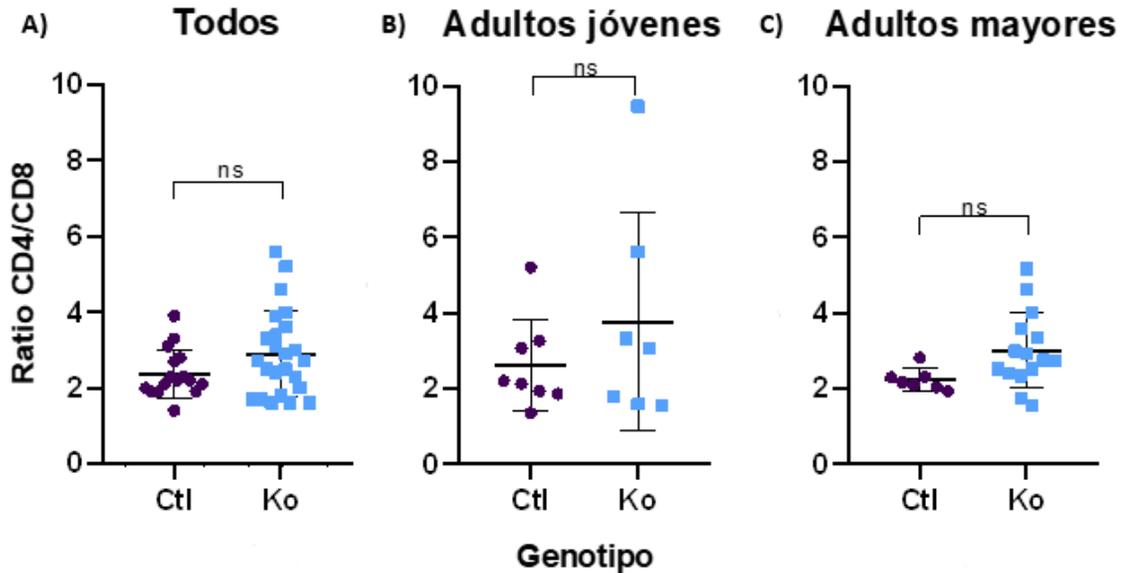


Figura 19. A) Determinación del Ratio CD4/CD8 en animales control y PVDRD2 knock-out contemplando todos los datos. No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control $n=16$; $2,381 \pm 0,6316$. Knock-out $n=24$; $2,904 \pm 1,135$. $p=0,1023$. **B) Determinación del Ratio CD4/CD8 en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos jóvenes.** No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control $n=8$; $2,628 \pm 1,218$. Knock-out $n=7$; $3,773 \pm 2,894$. $p=0,3242$. **C) Determinación del Ratio CD4/CD8 en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos mayores.** No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control $n=7$; $2,240 \pm 0,2891$. Knock-out $n=15$; $3,016 \pm 0,9964$. $p=0,0595$.

El porcentaje de neutrófilos (Neutrófilos/CD11b+), el cual forma parte de la población mieloide definida anteriormente (**Fig. 16**), se aprecia en la **Figura 20**. Por su parte, en la **Figura 20**, observamos que la población analizada es similar en las tres categorías (A, B y C) para ambos grupos: control y knock-out, apreciando un leve aumento en este último.

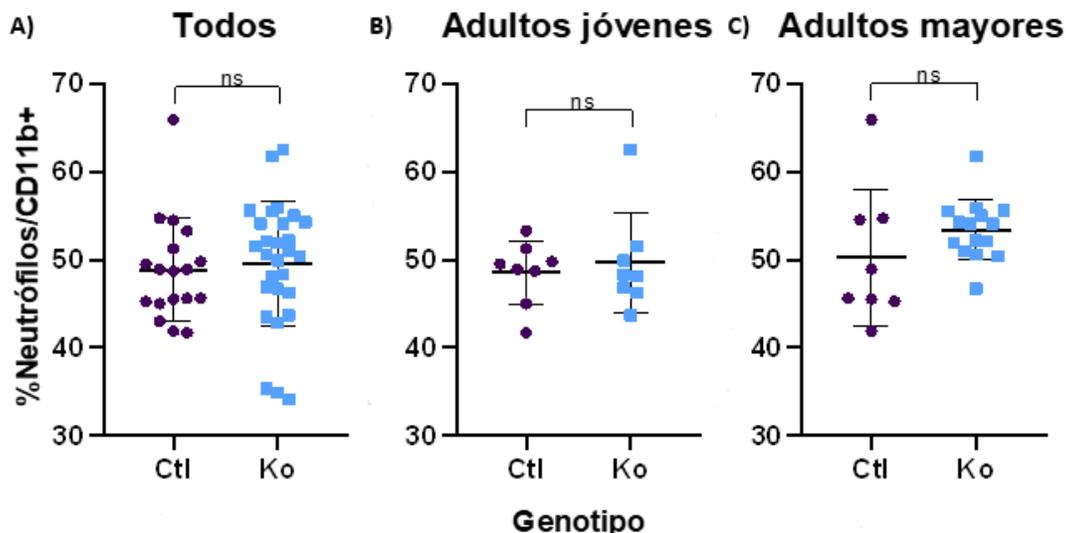


Figura 20. A) Determinación de la población Neutrófilos/CD11b+ en animales control y PVDRD2 knock-out contemplando todos los datos. No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=18; 48,84 ± 5,828. Knock-out n=28; 49,61 ± 7,069. p=0,7013. **B) Determinación de la población Neutrófilos/CD11b+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos jóvenes.** No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=8; 48,53 ± 3,630. Knock-out n=8; 49,64 ± 5,703. p=0,6488. **C) Determinación de la población Neutrófilos/CD11b+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos mayores.** No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=8; 50,29 ± 7,774. Knock-out n=15; 53,41 ± 3,415. p=0,1910.

Por último, determinamos los niveles de monocitos, los cuales son los responsables de mediar en la defensa ante patógenos infiltrándose en el sitio de infección y diferenciándose. Para ello utilizamos anticuerpos anti CD11b+ y anti Ly-6C, lo que nos permite analizar los subconjuntos de monocitos. El primero de ellos, Ly6CHi/CD11b+, representa los monocitos clásicos o inflamatorios (Hashimoto et al., 2013), el segundo subconjunto, %Ly6CMid/CD11b+, representa los monocitos que podrían diferenciarse hacia células presentadoras de antígeno (Gordon & Taylor, 2005) y el subconjunto %Ly6CNeg/CD11b+ incluye los monocitos que patrullan los vasos sanguíneos (Auffray, Sieweke, & Geissmann, 2009).

En la **Figura 21** se deja ver que la población Ly6CHi/CD11b+ está levemente disminuida para el grupo knock-out respecto del control en todos los análisis. En la **Figura 22**, podemos apreciar el análisis correspondiente a la población Ly6CMid/CD11b+, la cual se registra similar para ambos grupos en todos los análisis realizados; y, por último, en la **Figura 23**, el análisis de la población Ly6CNeg/CD11b+, se observa sin diferencias entre el grupo control y knock-out en el análisis integral de los datos. Pero al analizar los datos por grupos etarios, la población de interés se encuentra levemente aumentada en el grupo knock-out respecto al control en “adultos jóvenes” (**Fig. 23B**) y levemente aumentada en “adultos mayores” (**Fig. 23C**).

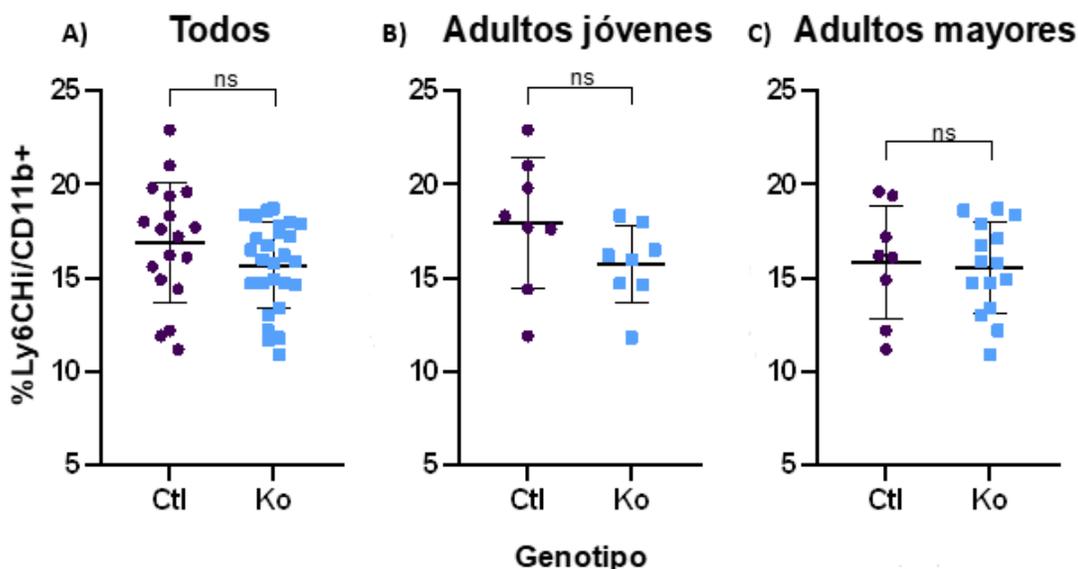


Figura 21. A) Determinación de la población Ly6CHi/CD11b+ en animales control y PVDRD2 knock-out contemplando todos los datos. No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=18; 16,89 ± 3,179. Knock-out n=27; 15,67 ± 2,312. p=0,1437. **B) Determinación de la población Ly6CHi/CD11b+ animales control y PVDRD2 knock-out en adultos jóvenes.** No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=8; 17,95 ± 3,520. Knock-out n=8; 15,76 ± 2,085. p=0,1527. **C) Determinación de la población Ly6CHi/CD11b+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos mayores.** No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=8; 15,85 ± 3,036. Knock-out n=15; 15,53 ± 2,429. p=0,7830.

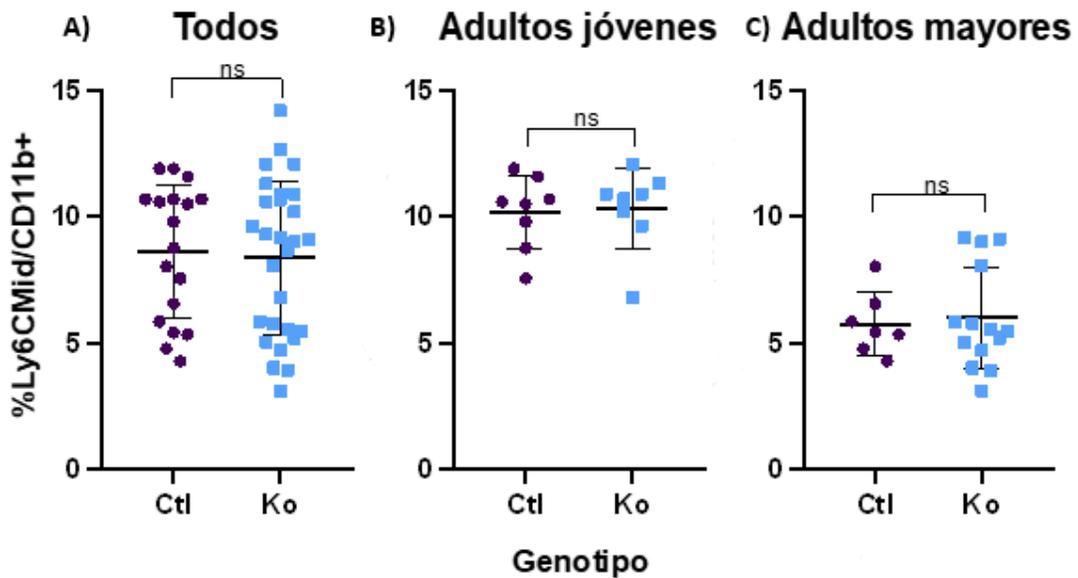


Figura 22. A) Determinación de la población Ly6CMid/CD11b+ en animales control y PVDRD2 knock-out contemplando todos los datos. No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=18; $8,608 \pm 2,663$. Knock-out n=28; $8,359 \pm 3,062$. $p=0,7785$. **B) Determinación de la población Ly6CMid/CD11b+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos jóvenes.** No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=8; $10,18 \pm 1,441$. Knock-out n=8; $10,32 \pm 1,592$. $p=0,8564$. **C) Determinación de la población Ly6CMid/CD11b+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos mayores.** No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=7; $5,744 \pm 1,245$. Knock-out n=14; $5,995 \pm 2,029$. $p=0,7691$.

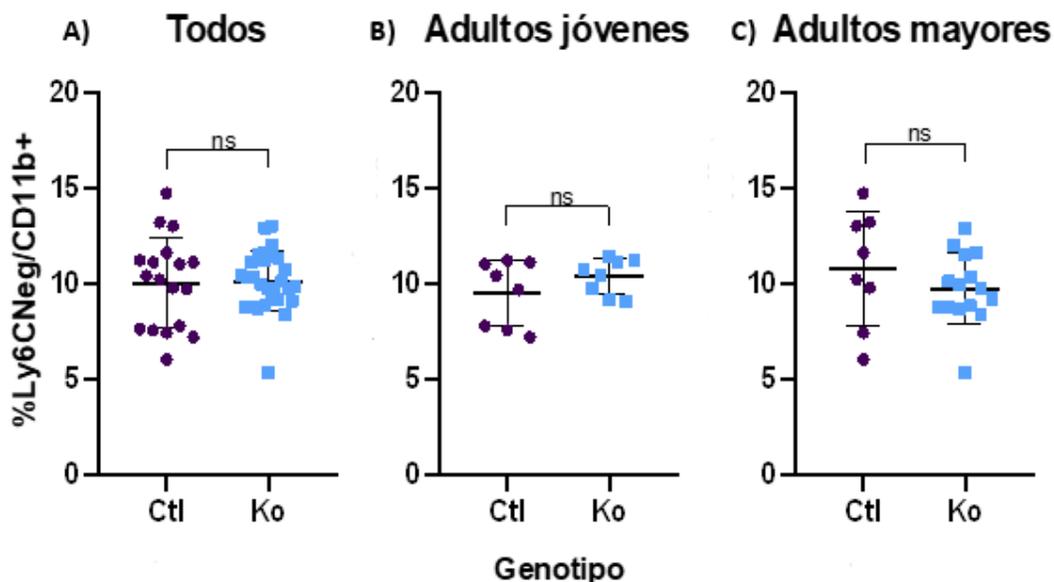


Figura 23. A) Determinación de la población Ly6CNeg/CD11b+ en animales control y PVDRD2 knock-out contemplando todos los datos. No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=18; $10,03 \pm 2,377$. Knock-out n=28; $10,11 \pm 1,563$. p=0,8979. **B) Determinación de la población Ly6CNeg/CD11b+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos jóvenes.** No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=8; $9,489 \pm 1,717$. Knock-out n=8; $10,35 \pm 0,9238$. p=0,2346. **C) Determinación de la población Ly6CNeg/CD11b+ en animales control y PVDRD2 knock-out en adultos mayores.** No se observa una diferencia significativa entre los grupos. Control n=8; $10,74 \pm 2,979$. Knock-out n=15; $9,738 \pm 1,840$. p=0,3282.

5.2.3. Caracterización y análisis de microglía a través de inmunofluorescencia

Con el propósito de estudiar la activación microglial, se llevó a cabo una inmunofluorescencia anti-Iba-1 tal como se describe en el apartado de materiales y métodos. Una vez que los tejidos fueron montados y deshidratados, se colocó el cubreobjetos y se procedió a la toma de fotografías. Para realizar las fotografías se hizo uso de un microscopio OLYMPUS BX41, provisto por la institución. Las fotos fueron tomadas con un objetivo 60X con aceite de inmersión y se realizaron stacks de las fotos.

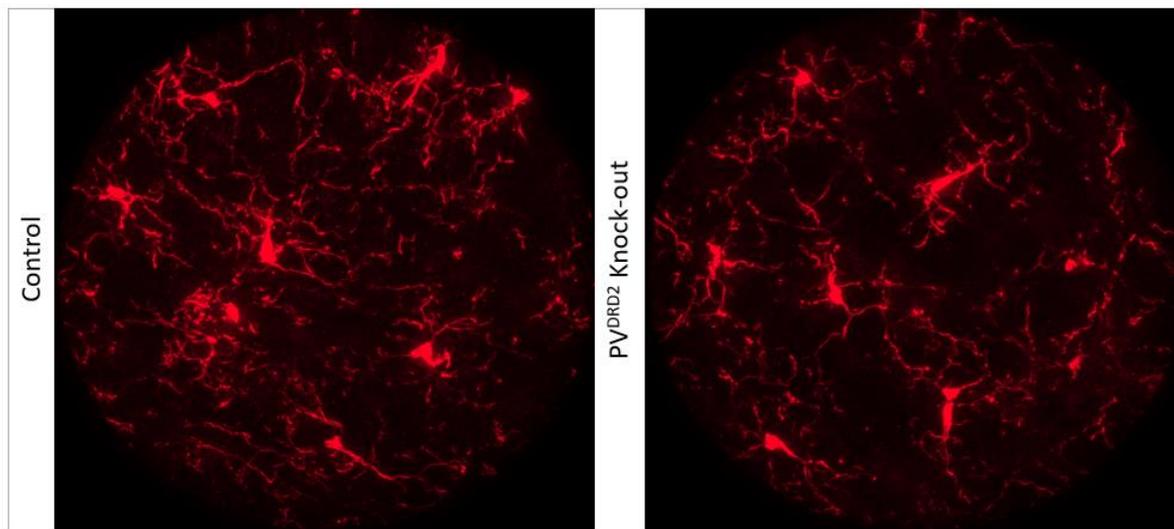


Figura 24. Inmunofluorescencia de Iba-1. Se observan las microglías presentes en tejidos cerebrales. Las fotos fueron tomadas con un objetivo 60X y se realizaron stacks. En la imagen izquierda podemos ver las microglías presentes en el tejido del animal control y en la imagen derecha las microglías presentes en el tejido del animal knock-out.

El objetivo era cuantificar la morfología de las microglías, siguiendo un protocolo que utilizaba el plug-in “Analyze Skeleton” con el programa ImageJ, tal como lo realizan en la facultad de enfermería de la Universidad de Arizona (Au - Young & Au - Morrison, 2018). Pero debido al contexto de la pandemia Sars-Cov-2, no se pudieron tomar más fotografías y se realizó un análisis preliminar de los datos.

Para realizar el estudio preliminar, se procesaron ambas fotos: control y PV^{DRD2} knock-out (**Fig. 24**), tal como se detalla en materiales y métodos, y se obtuvo el Excel esperado. A fines de brindar un análisis preliminar, se exponen en la siguiente tabla (**Tabla 1**) las primeras cinco células microgliales presentes en cada tejido y su número de ramificaciones. De todas maneras, se necesitan experimentos más contundentes y de un n mayor para poder llevar adelante estudios estadísticos.

Control		PV ^{DRD2} knock-out	
Células microgliales	N° Ramificaciones	Células microgliales	N° Ramificaciones
1	110	1	93
2	86	2	60
3	57	3	60
4	40	4	59
5	33	5	58

Tabla 1. Comparación entre el número de ramificaciones presentes en cinco células microgliales de animales control y PVDRD2 knock-out. Se consideraron sólo las primeras cinco células microgliales a fines de exhibir un análisis preliminar.

5.2.4. Inmunohistoquímica de la enzima Tirosina-Hidroxilasa

Con el fin de analizar la producción de dopamina en los animales knock-outs, se realizó una inmunohistoquímica para detectar la presencia de la enzima determinante en la producción del neurotransmisor. Para realizar la determinación, se utilizaron tejidos cerebrales de animales control y knock-out, y se realizó la técnica tal como se describe en el apartado de materiales y métodos.

Nuestros resultados se pueden observar en la **Figura 25**, donde se refleja que la expresión de Tirosina-Hidroxilasa se reduce en la región VTA de animales mutantes, pero no en la sustancia negra compacta (SN). A lo largo del eje rostro-caudal, la expresión de TH muestra una expresión reducida constante en la región VTA, incluido el núcleo pigmentado parabraquial (PBP), el núcleo paranigral del VTA (PN) y el propio VTA (**Fig. 25a-f**). Una evaluación cuantitativa de los niveles de TH muestra que la expresión se reduce significativamente en el VTA de animales mutantes, pero no en la SN (**Fig. 25g, h**).

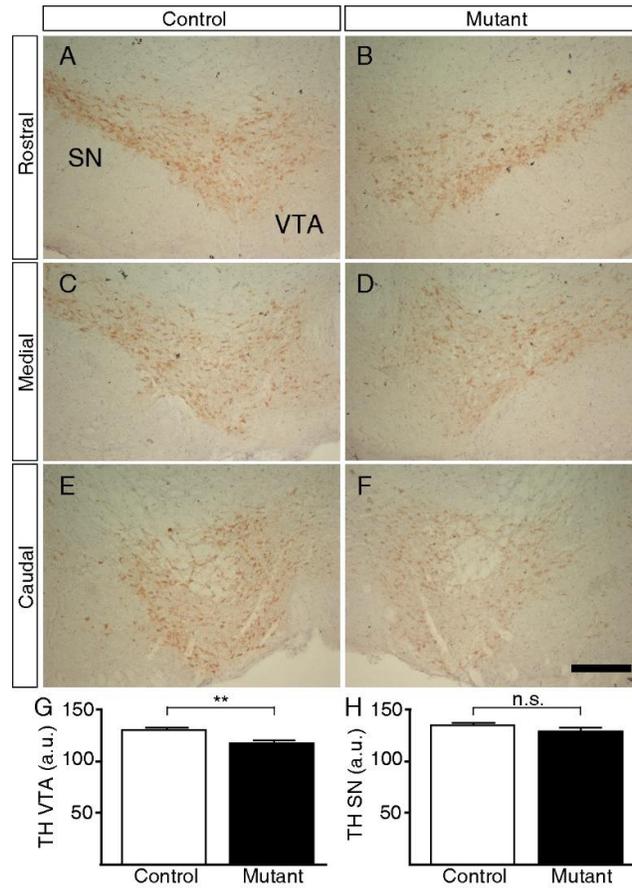


Figura 25. Detección de la enzima Tirosina-Hidroxilasa mediante inmunohistoquímica.

Evaluación del nivel de expresión de 3 TH por inmunohistoquímica. Secciones de cerebro que abarcan secciones rostral (a, b), medial (c, d) o caudal (e, f) del SN / VTA de animales de control (a, c, e) o mutantes (b, d, f). Cuantificación digital de la expresión de TH en el VTA (g) y SN (h). prueba t, ** p < 0,01. n.s. no significativo. Todas las imágenes tienen aumentos de $\times 10$. SN sustancia negra, área tegmental ventral del VTA. Barra de escala 200 μm .

6. Discusión

La esquizofrenia es una enfermedad devastadora que tiene diversas consecuencias para quienes la padecen y para sus familiares. Hasta el día de hoy, no hay un diagnóstico preventivo y tratamiento efectivo para la enfermedad, sino que el diagnóstico está dado por la visualización de signos y síntomas, imposibilitando la aplicación de algún tratamiento que pueda moderar o aplacar los síntomas que se han de desarrollar.

Los pacientes esquizofrénicos, presentan varias comorbilidades médicas asociadas, que son las causantes principales del aumento del índice de mortalidad que la enfermedad conlleva. Diversos estudios en pacientes han demostrado anomalías metabólicas y niveles alterados en parámetros inmunes como citoquinas proinflamatorias, células inmunes circulantes y activación de la microglía.

En este trabajo, se han realizado diversos estudios y determinaciones para evaluar si el modelo animal desarrollado por el laboratorio del Dr. Diego Gelman, reproduce los defectos inmunológicos y metabólicos observados en pacientes, ya que en el laboratorio tenemos la oportunidad de estudiar lo que en la clínica es imposible.

El modelo animal estudiado ya ha demostrado una mayor actividad locomotora, un mayor comportamiento de riesgo, niveles anormales de ansiedad, déficits cognitivos y una motivación reducida, en animales adultos con delección selectiva de DRD2 de interneuronas de parvalbúmina (Tomasella et al., 2018), lo que compone un conjunto de comportamientos reminiscentes a la esquizofrenia y sugiere que la modificación genética recapitula el desarrollo tardío observado en pacientes, ya que la enfermedad se desarrolla entre la adolescencia y la adultez temprana.

Sin embargo, los parámetros metabólicos e inmunológicos no habían sido estudiados. Por lo tanto, realizamos determinaciones metabólicas a partir de muestras de suero, ensayos de tolerancia a la glucosa, inmunohistoquímicas para determinar los niveles de expresión de la enzima tirosina hidroxilasa, inmunofluorescencias para detección de microglía, análisis de poblaciones inmunitarias por citometría de flujo y cuantificación de citoquinas proinflamatorias mediante ensayos ELISA a fines de comprobar si el modelo animal también exhibe un paralelismo como lo observado en pacientes.

Analizando los resultados obtenidos de los parámetros metabólicos estudiados, podemos decir que, si bien no se observan diferencias en los niveles séricos de triglicéridos, lo cual no coincide con lo observado en diversos estudios (Davison, O'Gorman, Brennan, & Cotter, 2018), sí observamos una reducción significativa en los niveles de HDL y colesterol total. Estos resultados concuerdan parcialmente con la bibliografía, ya que no hay un consenso absoluto de estas variaciones: en cuanto al colesterol total, hay discrepancias en la bibliografía ya que diversos estudios reportan niveles de colesterol elevado (Solberg, Bentsen, Refsum, & Andreassen, 2015; Xuan et al., 2011) y otros exponen resultados de colesterol reducidos (Al Awam et al., 2015). Sin embargo, en cuanto a los niveles de HDL, nuestros resultados coinciden con lo hallado en otras investigaciones (Cai et al., 2012), donde también se observan niveles inferiores de LDL que concuerdan con nuestros hallazgos.

Estudios sugirieron que niveles inferiores en el perfil lipídico se correlacionan con una mayor tendencia suicida en los pacientes esquizofrénicos, dado que los bajos niveles de HDL conducirían a una reducción del transporte inverso del colesterol, dando como resultado grandes cantidades de colesterol libre que dañarían las membranas celulares, y podría alterar la actividad de la neurotransmisión serotoninérgica, causando posteriormente depresión y alexitimia (déficit comunicativo emocional) (Sankaranarayanan, Jenkins, Castle, & Andrade, 2020). Sin embargo, otros estudios indicarían que el HDL no está relacionado con una mayor tendencia suicida en pacientes (Ainiyet & Rybakowski, 2014a, 2014b), por lo que no habría aún un consenso entre esta asociación y se requiere de mayores estudios para poder dilucidar este interrogante.

Continuando con el análisis metabólico, quisimos evaluar los indicadores pronósticos para la enfermedad aterosclerótica ya que los pacientes esquizofrénicos presentan una mayor tendencia a desarrollarla (Perry et al., 2016). Estos indicadores son los ratios CT-HDL y CT/HDL, conocidos como “Colesterol no HDL” e “índice de Castelli”. Valores elevados suponen un mayor riesgo de enfermedad coronaria, por lo que esperábamos que los valores obtenidos en el grupo knock-out fueran mayores a los del grupo control. Pero dado que esto no fue así, nuestros animales no presentarían riesgo a desarrollar la enfermedad y no replicarían en este aspecto lo observado en pacientes. Aun así, se requieren de más experimentos para determinarlo de forma certera.

Por otro lado, para terminar con la caracterización metabólica, realizamos la prueba de tolerancia a la glucosa (GTT) ya que los pacientes esquizofrénicos presentan anomalías glucémicas, y observamos diferencias significativas a los 30, 60 y 120 minutos. Nuestros resultados reflejan que los animales mutantes poseen una recuperación significativamente más lenta de los niveles de glucosa en sangre respecto a los control, lo cual coincide con lo observado en pacientes y en diversos estudios (Bushe & Holt, 2004; Kirkpatrick, Fernandez-Egea, Garcia-Rizo, & Bernardo, 2009; Ono et al., 2013) indicando que el animal estudiado en este trabajo, replica fehacientemente este aspecto observado en la clínica y podría ser utilizado para posteriores investigaciones en esta área.

En lo que respecta a la caracterización inmunológica, hemos identificado alteraciones en los niveles de las citoquinas proinflamatorias, alteraciones en poblaciones celulares y una tendencia a una mayor activación de la microglía en los animales knock-out.

En cuanto a los resultados de citoquinas circulantes, identificamos una tendencia en los animales knock-out a presentar niveles elevados de interleuquina-6 (IL-6) y de proteína C reactiva (CRP), en línea con lo observado en pacientes y en diversos estudios (Fernandes et al., 2016; G. M. Khandaker, Pearson, Zammit, Lewis, & Jones, 2014).

Dentro de los resultados obtenidos a través del ensayo de citometría, podemos resaltar que se observan alteraciones en varias poblaciones inmunitarias. Es importante aclarar que, si bien identificamos alteraciones, los datos no fueron homogéneos y esto supuso una limitación al momento del análisis. Por otra parte, esta heterogeneidad de la población de estudio nos permitió analizar tendencias en diversos rangos etarios, abriendo nuevos enfoques para abordar la comprensión de la enfermedad ya que para una misma población celular hay tendencias contrapuestas a diferentes edades. Por ejemplo, en el caso de la población CD45+, correspondiente a los leucocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos), se observó una tendencia en los “adultos jóvenes” a presentar menor proporción de la población en los animales knock-out vs el control. Pero esta tendencia se revierte cuando analizamos los datos en “adultos mayores” y no es identificada si analizamos los datos de forma general. Por ello, nuestros experimentos sin duda han sido valiosos ya que han puesto en evidencia que los niveles de poblaciones linfocitarias circulantes parecen variar a lo largo del tiempo y pueden

contribuir para el diseño de nuevos experimentos que se han de desarrollar en el laboratorio, poniendo énfasis en estos grupos de animales.

Claramente harían falta más experimentos para tener un número mayor de individuos y poder así determinar fehacientemente diferencias entre los grupos, pero con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos resaltar que en los animales mutantes, se observa una disminución significativa en la población de linfocitos T (CD3+/CD45+), una tendencia a una menor proporción en la población de linfocitos T citotóxicos (CD8+/CD45+), y una tendencia menor en la población de los monocitos clásicos o inflamatorios (Ly6Chi/CD11b+). Así como también se observa un aumento en el ratio CD4/CD8, y se observan alteraciones en los niveles de leucocitos (CD45+), en la población mielóide (CD11b+/CD45+), en los linfocitos T helper (CD4+/CD45+) y en los monocitos que patrullan los vasos sanguíneos (Ly6CNeg/CD11b+). Coincidiendo todos estos resultados con las alteraciones inmunitarias observadas previamente en pacientes dentro de las cuales se encuentran disminución de linfocitos T, alteración en los niveles de CD3+ y CD4+, alteración de linfocitos totales, aumento de monocitos circulantes y aumento del ratio CD4/CD8 (Bauer & Teixeira, 2019; Golam M. Khandaker et al., 2015).

En cuanto al estudio de la microglía, si bien no contamos con resultados contundentes, los estudios preliminares realizados, reflejarían una leve tendencia en las células microgliales del ratón PV^{DRD2} knock-out a presentar un menor número de ramificaciones, lo que sugeriría una mayor activación microglial en estos animales, coincidiendo con lo hallado en la bibliografía (Steiner et al., 2008; van Berckel et al., 2008).

Por último, analizando los resultados de la inmunohistoquímica de tirosina hidroxilasa, podemos decir que también coinciden nuestros hallazgos con lo observado en pacientes ya que se ha observado un nivel reducido de la expresión de tirosina hidroxilasa en la VTA, aportando a una deficiencia dopaminérgica en esa área (Rice, Roberts, Melendez-Ferro, & Perez-Costas, 2016).

En resumen, nuestro modelo animal de estudio replicaría varias alteraciones metabólicas e inmunológicas observadas en pacientes esquizofrénicos. Sin embargo, hace falta realizar más experimentos para aumentar el n de los estudios y poder así, determinar fehacientemente la significancia estadística de nuestros resultados.

6.1. Perspectivas a futuro

Resultaría interesante realizar en animales jóvenes y adultos todos los estudios metabólicos e inmunológicos que hemos realizado en este trabajo. Concluyendo los experimentos que han quedado truchos por la Pandemia Sars-Cov2 o por diversas limitaciones de insumos o disponibilidad. Analizando muestras más homogéneas y con mayor n para poder buscar e identificar marcadores que a futuro puedan trasladarse a la clínica y nos permitan adelantarnos a la enfermedad en los pacientes.

7. Conclusión

En el presente trabajo logramos demostrar que:

- Varios parámetros metabólicos analizados se ven modificados en los animales knock-out respecto de los animales control, y algunos de ellos con diferencias significativas, como el colesterol total y los niveles de HDL.
- Las poblaciones celulares de respuesta inmunitaria estudiadas a través de citometría se encuentran alteradas y varias de ellas con diferencias significativas, coincidiendo con lo observado en pacientes.
- Los estudios preliminares de activación microglial sugerirían una mayor activación en los animales knock-out respecto del control.
- La enzima Tirosina-Hidroxilasa se encuentra disminuida en VTA en los animales modificados y estudiados en este trabajo.
- Esta línea de animales modificados genéticamente puede ser una herramienta de gran utilidad para determinar algún marcador diferencial que sea útil para el diagnóstico objetivo de la enfermedad.
- Por medio de la utilización de esta línea de animales modificados genéticamente se pueden realizar estudios farmacológicos experimentales que puedan ser útiles para el desarrollo de algún tratamiento innovador que pueda llegar a ser efectivo en pacientes que padecen esta devastadora enfermedad.

8. Bibliografía

- Acevedo, M., Krämer, Verónica, Tagle, Rodrigo, Corbalán, Ramón, Arnaíz, Pilar, Berríos, Ximena, & Navarrete, Carlos. (2012). Total/HDL cholesterol ratio and non HDL cholesterol as predictors for increased intima media thickness. *Revista médica de Chile, 140*(8), 969-976. doi:10.4067/S0034-98872012000800001
- Ainiyet, B., & Rybakowski, J. K. (2014a). Suicidal behavior in schizophrenia may be related to low lipid levels. *Med Sci Monit, 20*, 1486-1490. doi:10.12659/msm.890884
- Ainiyet, B., & Rybakowski, J. K. (2014b). Suicidal behaviour and lipid levels in unipolar and bipolar depression. *Acta Neuropsychiatr, 26*(5), 315-320. doi:10.1017/neu.2014.18
- Al Awam, K., Haussleiter, I. S., Dudley, E., Donev, R., Brune, M., Juckel, G., & Thome, J. (2015). Multiplatform metabolome and proteome profiling identifies serum metabolite and protein signatures as prospective biomarkers for schizophrenia. *J Neural Transm (Vienna), 122 Suppl 1*, S111-122. doi:10.1007/s00702-014-1224-0
- Au - Young, K., & Au - Morrison, H. (2018). Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. *JoVE*(136), e57648. doi:doi:10.3791/57648
- Auffray, C., Sieweke, M. H., & Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol, 27*, 669-692. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557
- Bauer, M. E., & Teixeira, A. L. (2019). Inflammation in psychiatric disorders: what comes first? *Ann N Y Acad Sci, 1437*(1), 57-67. doi:10.1111/nyas.13712
- Bergink, V., Gibney, S. M., & Drexhage, H. A. (2014). Autoimmunity, inflammation, and psychosis: a search for peripheral markers. *Biol Psychiatry, 75*(4), 324-331. doi:10.1016/j.biopsych.2013.09.037
- Boksa, P. (2010). Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. *Brain, Behavior, and Immunity, 24*(6), 881-897. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.03.005>
- Bushe, C., & Holt, R. (2004). Prevalence of diabetes and impaired glucose tolerance in patients with schizophrenia. *Br J Psychiatry Suppl, 47*, S67-71. doi:10.1192/bjp.184.47.s67
- Cai, H. L., Li, H. D., Yan, X. Z., Sun, B., Zhang, Q., Yan, M., . . . Ye, H. S. (2012). Metabolomic analysis of biochemical changes in the plasma and urine of first-episode neuroleptic-naive schizophrenia patients after treatment with risperidone. *J Proteome Res, 11*(8), 4338-4350. doi:10.1021/pr300459d
- Chambers, R. A., Moore, J., McEvoy, J. P., & Levin, E. D. (1996). Cognitive effects of neonatal hippocampal lesions in a rat model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology, 15*(6), 587-594. doi:10.1016/s0893-133x(96)00132-7
- Cilia, J., Reavill, C., Hagan, J. J., & Jones, D. N. (2001). Long-term evaluation of isolation-rearing induced prepulse inhibition deficits in rats. *Psychopharmacology (Berl), 156*(2-3), 327-337. doi:10.1007/s002130100786

- Correll, C. U., & Schooler, N. R. (2020). Negative Symptoms in Schizophrenia: A Review and Clinical Guide for Recognition, Assessment, and Treatment. *Neuropsychiatr Dis Treat*, *16*, 519-534. doi:10.2147/ndt.S225643
- d'Arma, A., Isernia, S., Di Tella, S., Rovaris, M., Valle, A., Baglio, F., & Marchetti, A. (2021). Social Cognition Training for Enhancing Affective and Cognitive Theory of Mind in Schizophrenia: A Systematic Review and a Meta-Analysis. *J Psychol*, *155*(1), 26-58. doi:10.1080/00223980.2020.1818671
- Davison, J., O'Gorman, A., Brennan, L., & Cotter, D. R. (2018). A systematic review of metabolite biomarkers of schizophrenia. *Schizophr Res*, *195*, 32-50. doi:10.1016/j.schres.2017.09.021
- Del Pino, I., García-Frigola, C., Dehorter, N., Brotons-Mas, J. R., Alvarez-Salvado, E., Martínez de Lagrán, M., . . . Rico, B. (2013). Erbb4 deletion from fast-spiking interneurons causes schizophrenia-like phenotypes. *Neuron*, *79*(6), 1152-1168. doi:10.1016/j.neuron.2013.07.010
- Farah, F. (2018). Schizophrenia: An Overview. *Asian Journal of Pharmaceutics*, *12*, 77.
- Featherstone, R. E., Kapur, S., & Fletcher, P. J. (2007). The amphetamine-induced sensitized state as a model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *31*(8), 1556-1571. doi:10.1016/j.pnpbp.2007.08.025
- Fernandes, B. S., Steiner, J., Bernstein, H. G., Dodd, S., Pasco, J. A., Dean, O. M., . . . Berk, M. (2016). C-reactive protein is increased in schizophrenia but is not altered by antipsychotics: meta-analysis and implications. *Mol Psychiatry*, *21*(4), 554-564. doi:10.1038/mp.2015.87
- Galderisi, S., Mucci, A., Buchanan, R. W., & Arango, C. (2018). Negative symptoms of schizophrenia: new developments and unanswered research questions. *The Lancet Psychiatry*, *5*(8), 664-677. doi:10.1016/s2215-0366(18)30050-6
- Garcia-Rizo, C., Fernandez-Egea, E., Oliveira, C., Meseguer, A., Cabrera, B., Mezquida, G., . . . Kirkpatrick, B. (2017). Metabolic syndrome or glucose challenge in first episode of psychosis? *European Psychiatry*, *41*(1), 42-46. doi:10.1016/j.eurpsy.2016.10.001
- Gordon, S., & Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, *5*(12), 953-964. doi:10.1038/nri1733
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., . . . Merad, M. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, *38*(4), 792-804. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.004
- Howes, O. D., McCutcheon, R., Owen, M. J., & Murray, R. M. (2017). The Role of Genes, Stress, and Dopamine in the Development of Schizophrenia. *Biol Psychiatry*, *81*(1), 9-20. doi:10.1016/j.biopsych.2016.07.014
- Insel, T. R. (2010). Rethinking schizophrenia. *Nature*, *468*(7321), 187-193. doi:10.1038/nature09552

- Jones, C. A., Watson, D. J. G., & Fone, K. C. F. (2011). Animal models of schizophrenia. *British Journal of Pharmacology*, *164*(4), 1162-1194. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x
- Jongen-Rêlo, A. L., Leng, A., Lüber, M., Pothuizen, H. H., Weber, L., & Feldon, J. (2004). The prenatal methylazoxymethanol acetate treatment: a neurodevelopmental animal model for schizophrenia? *Behav Brain Res*, *149*(2), 159-181. doi:10.1016/s0166-4328(03)00228-6
- Kahn, R. S., Sommer, I. E., Murray, R. M., Meyer-Lindenberg, A., Weinberger, D. R., Cannon, T. D., . . . Insel, T. R. (2015). Schizophrenia. *Nat Rev Dis Primers*, *1*, 15067. doi:10.1038/nrdp.2015.67
- Khandaker, G. M., Cousins, L., Deakin, J., Lennox, B. R., Yolken, R., & Jones, P. B. (2015). Inflammation and immunity in schizophrenia: implications for pathophysiology and treatment. *The Lancet Psychiatry*, *2*(3), 258-270. doi:10.1016/s2215-0366(14)00122-9
- Khandaker, G. M., Pearson, R. M., Zammit, S., Lewis, G., & Jones, P. B. (2014). Association of serum interleukin 6 and C-reactive protein in childhood with depression and psychosis in young adult life: a population-based longitudinal study. *JAMA Psychiatry*, *71*(10), 1121-1128. doi:10.1001/jamapsychiatry.2014.1332
- Khokhar, J. Y., Henricks, A. M., Sullivan, E. D. K., & Green, A. I. (2018). Unique Effects of Clozapine: A Pharmacological Perspective. *Adv Pharmacol*, *82*, 137-162. doi:10.1016/bs.apha.2017.09.009
- Kirkpatrick, B., Fernandez-Egea, E., Garcia-Rizo, C., & Bernardo, M. (2009). Differences in glucose tolerance between deficit and nondeficit schizophrenia. *Schizophr Res*, *107*(2-3), 122-127. doi:10.1016/j.schres.2008.09.023
- Koszła, O., Targowska-Duda, K. M., Kędzierska, E., & Kaczor, A. A. (2020). In Vitro and In Vivo Models for the Investigation of Potential Drugs Against Schizophrenia. *Biomolecules*, *10*(1). doi:10.3390/biom10010160
- Laursen, T. M., Nordentoft, M., & Mortensen, P. B. (2014). Excess early mortality in schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol*, *10*, 425-448. doi:10.1146/annurev-clinpsy-032813-153657
- Le Pen, G., Gourevitch, R., Hazane, F., Hoareau, C., Jay, T. M., & Krebs, M. O. (2006). Peripubertal maturation after developmental disturbance: a model for psychosis onset in the rat. *Neuroscience*, *143*(2), 395-405. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.08.004
- Lodge, D. J., & Grace, A. A. (2009). Gestational methylazoxymethanol acetate administration: a developmental disruption model of schizophrenia. *Behav Brain Res*, *204*(2), 306-312. doi:10.1016/j.bbr.2009.01.031
- Meyer, U., Feldon, J., & Fatemi, S. H. (2009). In-vivo rodent models for the experimental investigation of prenatal immune activation effects in neurodevelopmental brain disorders. *Neurosci Biobehav Rev*, *33*(7), 1061-1079. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.05.001

- Miller, B. J., Gassama, B., Sebastian, D., Buckley, P., & Mellor, A. (2013). Meta-analysis of lymphocytes in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biol Psychiatry*, *73*(10), 993-999. doi:10.1016/j.biopsych.2012.09.007
- Missale, C., Nash, S. R., Robinson, S. W., Jaber, M., & Caron, M. G. (1998). Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, *78*(1), 189-225. doi:10.1152/physrev.1998.78.1.189
- Moser, P. C., Hitchcock, J. M., Lister, S., & Moran, P. M. (2000). The pharmacology of latent inhibition as an animal model of schizophrenia. *Brain Research Reviews*, *33*(2), 275-307. doi:[https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00026-6](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00026-6)
- Mouri, A., Noda, Y., Enomoto, T., & Nabeshima, T. (2007). Phencyclidine animal models of schizophrenia: approaches from abnormality of glutamatergic neurotransmission and neurodevelopment. *Neurochem Int*, *51*(2-4), 173-184. doi:10.1016/j.neuint.2007.06.019
- Nakao, K., Jeevakumar, V., Jiang, S. Z., Fujita, Y., Diaz, N. B., Pretell Annan, C. A., . . . Nakazawa, K. (2019). Schizophrenia-Like Dopamine Release Abnormalities in a Mouse Model of NMDA Receptor Hypofunction. *Schizophr Bull*, *45*(1), 138-147. doi:10.1093/schbul/sby003
- Ono, S., Suzuki, Y., Fukui, N., Sugai, T., Watanabe, J., Tsuneyama, N., . . . Someya, T. (2013). The prevalence of glucose intolerance in Japanese schizophrenic patients with a normal fasting glucose level. *J Clin Psychopharmacol*, *33*(4), 525-527. doi:10.1097/JCP.0b013e3182905775
- Perry, B. I., McIntosh, G., Weich, S., Singh, S., & Rees, K. (2016). The association between first-episode psychosis and abnormal glycaemic control: systematic review and meta-analysis. *The Lancet Psychiatry*, *3*(11), 1049-1058. doi:10.1016/s2215-0366(16)30262-0
- Reynolds, G. P., & Neill, J. C. (2016). Modelling the cognitive and neuropathological features of schizophrenia with phencyclidine. *J Psychopharmacol*, *30*(11), 1141-1144. doi:10.1177/0269881116667668
- Rice, M. W., Roberts, R. C., Melendez-Ferro, M., & Perez-Costas, E. (2016). Mapping dopaminergic deficiencies in the substantia nigra/ventral tegmental area in schizophrenia. *Brain Struct Funct*, *221*(1), 185-201. doi:10.1007/s00429-014-0901-y
- Rudy, B., Fishell, G., Lee, S., & Hjerling-Leffler, J. (2011). Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol*, *71*(1), 45-61. doi:10.1002/dneu.20853
- Sankaranarayanan, A., Jenkins, Z., Castle, D., & Andrade, C. (2020). Serum lipids and suicidality among patients with schizophrenia. *Schizophr Res*, *215*, 479-481. doi:10.1016/j.schres.2019.10.004
- Seeman, P. (1987). Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Synapse*, *1*(2), 133-152. doi:10.1002/syn.890010203

- Solberg, D. K., Bentsen, H., Refsum, H., & Andreassen, O. A. (2015). Association between serum lipids and membrane fatty acids and clinical characteristics in patients with schizophrenia. *Acta Psychiatr Scand*, *132*(4), 293-300. doi:10.1111/acps.12388
- Stedehouder, J., & Kushner, S. A. (2017). Myelination of parvalbumin interneurons: a parsimonious locus of pathophysiological convergence in schizophrenia. *Mol Psychiatry*, *22*(1), 4-12. doi:10.1038/mp.2016.147
- Steiner, J., Bernstein, H. G., Schiltz, K., Muller, U. J., Westphal, S., Drexhage, H. A., & Bogerts, B. (2014). Immune system and glucose metabolism interaction in schizophrenia: a chicken-egg dilemma. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *48*, 287-294. doi:10.1016/j.pnpbp.2012.09.016
- Steiner, J., Bielau, H., Brisch, R., Danos, P., Ullrich, O., Mawrin, C., . . . Bogerts, B. (2008). Immunological aspects in the neurobiology of suicide: elevated microglial density in schizophrenia and depression is associated with suicide. *J Psychiatr Res*, *42*(2), 151-157. doi:10.1016/j.jpsychires.2006.10.013
- Stullet, P., Cabungcal, J. H., Bukhari, S. A., Ardelt, M. I., Pantazopoulos, H., Hamati, F., . . . Berretta, S. (2018). The thalamic reticular nucleus in schizophrenia and bipolar disorder: role of parvalbumin-expressing neuron networks and oxidative stress. *Mol Psychiatry*, *23*(10), 2057-2065. doi:10.1038/mp.2017.230
- Tandon, R., Gaebel, W., Barch, D. M., Bustillo, J., Gur, R. E., Heckers, S., . . . Carpenter, W. (2013). Definition and description of schizophrenia in the DSM-5. *Schizophr Res*, *150*(1), 3-10. doi:10.1016/j.schres.2013.05.028
- Thompson, L. W. (1990). The dopamine hypothesis of schizophrenia. *Perspect Psychiatr Care*, *26*(3), 18-23. doi:10.1111/j.1744-6163.1990.tb00312.x
- Tomasella, E., Bechelli, L., Ogando, M. B., Mininni, C., Di Guilmi, M. N., De Fino, F., . . . Gelman, D. M. (2018). Deletion of dopamine D2 receptors from parvalbumin interneurons in mouse causes schizophrenia-like phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(13), 3476-3481. doi:10.1073/pnas.1719897115
- van Berckel, B. N., Bossong, M. G., Boellaard, R., Kloet, R., Schuitmaker, A., Caspers, E., . . . Kahn, R. S. (2008). Microglia activation in recent-onset schizophrenia: a quantitative (R)-[11C]PK11195 positron emission tomography study. *Biol Psychiatry*, *64*(9), 820-822. doi:10.1016/j.biopsych.2008.04.025
- Vogel Martinez, M. I., León, F., Torres, R., & Crossley, N. A. (2017). Antipsicóticos de primera y segunda generación en esquizofrenia: eficacia, efectividad y efecto de la dosis utilizada. *ARS MEDICA Revista de Ciencias Médicas*, *42*(1), 41-48. doi:10.11565/arsmed.v42i1.452
- Xuan, J., Pan, G., Qiu, Y., Yang, L., Su, M., Liu, Y., . . . He, L. (2011). Metabolomic profiling to identify potential serum biomarkers for schizophrenia and risperidone action. *J Proteome Res*, *10*(12), 5433-5443. doi:10.1021/pr2006796
- Yang, A. C., & Tsai, S. J. (2017). New Targets for Schizophrenia Treatment beyond the Dopamine Hypothesis. *Int J Mol Sci*, *18*(8). doi:10.3390/ijms18081689