

Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Alteraciones metabólicas y del sistema dopaminérgico en un modelo animal de esquizofrenia basado en la inmunización materna durante la gestación

Autor:
Alejandro Pagazaurtundua Millano

Director:
Dr. José Javier Meana Martínez

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVO	5
3. MATERIALES Y METODOS.....	5
3.1 Animales.....	5
3.2 Seguimiento.....	5
3.3 Extracción de muestras.....	6
3.4 Western Blot.....	6
3.5 Análisis estadístico	7
4. RESULTADOS	8
4.1 Estado nutricional y metabólico de animales PIC y Salino.....	8
4.2 Expresión de proteínas del sistema dopaminérgico en estriado de animales PIC y Salino	12
5. DISCUSIÓN.....	13
6. CONCLUSIONES.....	15
7. BIBLIOGRAFÍA.....	16

1. INTRODUCCIÓN

La esquizofrenia es una enfermedad crónica, discapacitante, de inicio precoz, con una prevalencia aproximada del 1%. La esperanza de vida en este tipo de enfermos se reduce unos 10 años respecto a la población normal. La esquizofrenia cursa con síntomas positivos psicóticos (alucinaciones, delirios, pensamiento desorganizado), negativos (anhedonia, alogia, retracción social) y cognitivos (dificultades de atención, memoria y funciones ejecutivas). Aunque la psicosis identifica a la esquizofrenia, las alteraciones cognitivas aparecen más precozmente, constituyen un factor de riesgo del curso de la enfermedad y son resistentes a los tratamientos actuales. Los déficits cognitivos asociados a la esquizofrenia suponen, por lo tanto, un foco de atención especial, ya que son fuente del alto grado de discapacidad (**Ibrahim & Tamminga, 2011**).

Durante la década de los 50 se encontró, de manera fortuita, que la clopromazina y otras fenotiacinas mostraban la capacidad de controlar la psicosis en pacientes de esquizofrenia. Años más tarde, en los años 70, se determinó que estos fármacos eran antagonistas de receptores de dopamina tipo 2 (D₂), un receptor acoplado a proteínas G inhibitorias (G_i). Este descubrimiento llevó a plantear que el origen de la enfermedad se encuentra en una actividad dopaminérgica alterada, la conocida como hipótesis dopaminérgica (**Seeman et al., 1975**). En relación a la sintomatología psiquiátrica hay dos vías dopaminérgicas de especial interés. En primer lugar, la vía mesolímbica, que está formada por neuronas que proyectan desde el área tagmental ventral (VTA) sobre el estriado ventral (VE), y cuya desregulación estaría relacionada con síntomas positivos. Por otro lado, en la vía mesocortical, las neuronas proyectan desde el VTA sobre la corteza prefrontal (PFC), y su desregulación está relacionada con la sintomatología negativa y cognitiva. Estudios en roedores, primates, y humanos han revelado que existe una correlación entre niveles atenuados de dopamina en PFC y un aumento en la liberación de la misma en VE (**Goto & Grace, 2007**). Por tanto, los síntomas de la esquizofrenia podrían derivar de una hipodopaminergia prefrontal asociada a una hiperdopaminergia estriatal (**Howes & Kapur, 2009**).

Aunque las hipótesis neurobiológicas que pretenden explicar la fisiopatología y psicopatología de la esquizofrenia han incidido en alteraciones de los sistemas de monoaminas, la etiología y etiopatogenia de la enfermedad siguen siendo desconocidas. Diferentes evidencias apuntan a la implicación de factores tanto genéticos como prenatales junto a otros ambientales, interaccionando entre ellos durante las fases de neurodesarrollo y maduración cerebral del individuo. El modelo general propuesto para los trastornos mentales de inicio temprano como la esquizofrenia es un modelo de diátesis-estrés (**Zubin & Spring, 1977**): la aparición de síntomas podría ser el resultado de la interacción entre una predisposición genética o vulnerabilidad (*diátesis*) y factores externos o vivencias personales (*estrés*). Entre los factores ambientales descritos se encuentran los derivados de la exposición a agentes infecciosos, estresantes o a drogas, acaecidos en períodos especialmente sensibles de maduración postnatal como la adolescencia. Progresivamente se ha ido completando la hipótesis inicial de una vulnerabilidad puramente genética con la idea de un trastorno en el neurodesarrollo, promovido también por potenciales alteraciones

prenatales surgidas durante el desarrollo fetal. Estas alteraciones del neurodesarrollo afectarían de manera prioritaria a la maduración y migración de neuronas intracorticales y de proyección GABAérgica, y a su interacción con las neuronas glutamatérgicas corticales. En ese contexto, las alteraciones dopaminérgicas descritas clásicamente estarían vinculadas a una desinhibición de las neuronas piramidales corticales. Estas hipótesis parecen tener su confirmación en hallazgos en tejido postmortem (**Lewis & Sweet, 2009**) y en estudios de resonancia magnética morfológica y funcional (**Ellison-Wright & Bullmore, 2010**) (**Olabi et al., 2011**).

Los actuales tratamientos antipsicóticos tienen importantes carencias terapéuticas. En el mejor de los casos permiten un control o incluso una desaparición de los síntomas en 2/3 de los pacientes, aunque su impacto sobre los déficits cognitivos y emocionales de la esquizofrenia es muy limitado. Los antipsicóticos son eficaces frente a los síntomas positivos y en el caso de los atípicos funcionan muy parcialmente sobre los síntomas negativos (**Lettet et al., 2014**). Uno de los efectos adversos más habituales de los tratamientos sostenidos con antipsicóticos atípicos es la aparición de síndrome metabólico. Se trata de un cuadro patológico caracterizado por la presencia de obesidad, hiperlipidemia, resistencia a la insulina y aparición de diabetes tipo II. Todo ello conlleva un incremento importante de morbilidad cardiovascular (**Laursen et al., 2014**). Además, existe la sospecha que la propia enfermedad esquizofrénica podría conllevar un cierto mayor riesgo para la presencia de enfermedades metabólicas. Esta vulnerabilidad sería determinada por los mismos factores que contribuyen a generar alteraciones del neurodesarrollo (**Emul & Kalelioglu, 2015**). Se ha podido comprobar en sujetos con primeros episodios psicóticos y que no han recibido anteriormente medicación antipsicótica la existencia de alteraciones en el metabolismo glucídico y lipídico que predisponen a estos sujetos al desarrollo del síndrome metabólico (**Malan-Müller et al., 2016**).

La esquizofrenia es un desorden psiquiátrico complejo asociado a la mente, y por tanto inherentemente relacionado al ser humano. Sin embargo, el acceso a pacientes y tejidos de origen humano para su estudio están muy limitados. Actualmente existen distintos tipos de modelos animales que pretenden reproducir las observaciones realizadas en pacientes, aunque no hay ninguno que reproduzca la totalidad de los síntomas y alteraciones propios de la esquizofrenia. Los modelos basados en modulaciones farmacológicas o manipulaciones genéticas presentan deficiencias en cuanto a validez de constructo (basar su diseño en alteraciones previamente descritas en esquizofrenia), así como discrepancias en cuanto a validez de contenido (presentar un perfil fenotípico similar al observado en esquizofrenia). Complementariamente a los modelos genéticos y farmacológicos, en los últimos años se han desarrollado diversos modelos animales de esquizofrenia basados en la idea de una agresión prenatal (exposición de la madre gestante a tóxicos, inductores de la respuesta inmune materna, deficiencias nutricionales o estrés físico materno) (**Jones et al., 2011**).

Uno de los factores ambientales que recibe especial atención en los últimos tiempos son las infecciones virales en madres gestantes durante períodos críticos del desarrollo cerebral del feto. Las infecciones

virales durante el período prenatal parecen contribuir a incrementar el riesgo de esquizofrenia, a la vista de evidencias epidemiológicas. Existen datos que indican que el riesgo de padecer esquizofrenia es cinco veces superior en los casos en los que ha habido infección materna durante la gestación (**Jones & Cannon, 1998**). Sin embargo, los posibles mecanismos por los cuales estas infecciones aumentan el riesgo de padecer enfermedad permanecen todavía sin aclarar.

En base a los conocimientos sobre infecciones virales se ha desarrollado un modelo animal de activación inmune materna con ácido poliinosínico-policitidílico (poly(I:C)), un análogo sintético del RNA de doble hebra (**Meyer, 2014**). Este modelo se basa en la hipótesis de la infección maternal por virus durante la gestación como factor de riesgo para el desarrollo de esquizofrenia (**Brown & Derkits, 2010**). En este modelo se ha descrito la presencia de déficits cognitivos importantes así como una mayor sensibilidad a presentar conductas alucinogénicas (**Holloway et al., 2013**). Sin embargo, no se conoce en profundidad el impacto de esta agresión prenatal sobre el estatus del sistema dopaminérgico de estos animales ni su posible relación con la alteración de sus condiciones metabólicas básicas.

2. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo es contribuir a la validación del modelo poly (I:C) mediante la caracterización del estado metabólico del animal y la valoración del receptor de dopamina D₂ y del transportador de dopamina (DAT), cuya función es la recaptación de dopamina al terminal nervioso.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Animales

Los ratones de la cepa Swiss Webster (SW) fueron criados en el propio laboratorio. A las hembras gestantes se les inyectó 7,5 mg/kg de ácido poliinosínico-policitidílico (poly (I:C)) (Sigma-Aldrich, España) o el vehículo (solución salina) en el día gestacional 9,5 (**Holloway et al., 2013**). Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de temperatura y humedad, en ciclos de 12 horas de luz/oscuridad (luz entre 8:00 a.m. - 8:00 p.m.) con acceso libre a comida y agua. Las crías fueron destetadas el día postnatal (PND) 22 y fueron separadas en dos grupos, poly (I:C) (PIC) y vehículo (Salino), en función del tratamiento recibido por la madre. Estos grupos a su vez se dividieron en jaulas con 3 o 4 individuos, separados por sexos. Para los procedimientos experimentales se utilizaron 17 hembras PIC, 10 hembras Salino, 10 machos PIC y 10 machos Salino. Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de bienestar animal de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) de acuerdo a la legislación europea (D2010/63/UE).

3.2 Seguimiento

Se realizó el seguimiento de las variaciones de peso, consumo de agua e ingesta de alimento mediante mediciones de peso en balanza. Se tomaron 2 medidas semanales entre los 22 y 101 días de edad.

3.3 Extracción de muestras

De cada animal se obtuvo 1 ml de sangre, el hígado (LIV), el tejido adiposo blanco gonadal (WAT), el tejido adiposo pardo dorsal (BAT) y el cerebro (BR). En primer lugar, los animales fueron anestesiados con 40 mg/kg i.p. de pentobarbital con un periodo de ayuno previo de 4 horas, para evitar alteraciones en posibles futuras medidas metabólicas. Una vez anestesiados se realizó una incisión en la región abdominal. La sangre se extrajo directamente de la vena cava del animal anestesiado con jeringuillas de puntas de 0.80 x 25 mm, a una altura ligeramente inferior a la de los riñones. Durante este procedimiento se produjo la muerte de los animales. Las muestras de sangre se dejaron reposar durante 30 minutos, tras lo cual se obtuvo el suero mediante dos centrifugaciones consecutivas. La primera de 30 minutos, a 2000G, de la que se recogió el sobrenadante y se volvió a centrifugar, a 10000G durante 10 minutos. Finalmente el suero se almacenó en arcón congelador a -80°C para futuras mediciones.

El LIV y WAT se extrajeron de la cavidad abdominal, tras lo cual fueron lavados con PBS 1% y pesados. Posteriormente fueron fragmentados, procesados y almacenados en diferentes condiciones para realizar posteriores análisis. Uno de los fragmentos de cada tejido fue almacenado a 4°C en formalina durante 24 horas y posteriormente en etanol al 50%. Otro fue congelado con nitrógeno líquido en “Optimum cutting temperature compound” (OCT) y, junto al tejido restante, almacenado en arcón congelador a -80°C. El BAT se extrajo mediante la incisión de la zona medio-dorsal, entre los hombros del animal. Posteriormente se lavó con PBS 1%, se pesó, se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó en arcón congelador a -80°C, para futuras mediciones. El cerebro se extrajo mediante la apertura del cráneo, tras lo cual se almacenó a -80°C. Para los experimentos de Western Blot se tomó el estriado (ventral y dorsal) (ST) del cerebro de machos mediante disección. Se utilizaron únicamente machos (6 Salino y 7 PIC) debido a su menor variación en los ciclos hormonales.

3.4 Western Blot

Las muestras de ST se homogenizaron en 10 volúmenes (1g/ml) de tampón de homogenización (Tris-HCl 4,42 mM, NaF 8,84 mM, Cocktail sigma inhibidor de proteasas 2,5 µl/ml, Na₃VO₄ 4,42 mM, sacarosa 0,1 g/ml; pH 7,4). Para su correcta homogenización se aplicaron 12 pulsos con el homogenizador. El contenido proteico fue determinado mediante un kit de Bio-Rad (DC Protein assay, Bio-Rad Laboratories, Winooski, EEUU). Se diluyó la muestra hasta una concentración de 2,14 µg/µl, alicuotándose posteriormente. A cada alícuota se le añadió un 20% de su propio volumen de tampón Laemmli (SDS 0,1%, Azul bromofenol 0,87 mM, Glicerol 64 mM, Tris-HCl 0,5 M; pH 6,8) y un 12% de ditiotreitól (1 M), siendo la concentración final de proteína 1,82 µg/µl. Finalmente las muestras fueron calentadas a 95°C durante 5 minutos en una placa calefactora (Biometra) y almacenadas a -20°C hasta el ensayo. La electroforesis se llevó a cabo en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS 10%) y con tampón de electroforesis (Tris-HCl 25 mM, SDS 0,1% y glicina 192 mM; pH 8,3). Se cargaron 21,4 µg de proteína por pocillo en el gel para el estudio del receptor D₂ y 32,1 µg de proteína por pocillo en el gel para el estudio de DAT. Se aplicó un voltaje de 130 V durante 1,5

horas. Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,45 μm) (GE Healthcare, Buckinghamshire, RU) en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20%; pH 8,3). En este caso se aplicó un voltaje de 110 V durante 1 hora. Tras la transferencia las membranas se lavaron con tampón PBS (NaCl 0,137 M, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 12 mM, KH_2PO_4 1,38 mM; pH 7.4). Posteriormente se incubaron con la solución de bloqueo (5% leche en polvo desnatada en PBS) durante 1 hora. A continuación, se llevó a cabo la incubación con la solución de anticuerpo primario a 4°C en agitación durante toda la noche (aproximadamente 12 horas). A la mañana siguiente se hicieron 3 lavados con tampón PBS y se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios fluorescentes conjugados correspondientes, en solución de incubación (leche en polvo desnatada 5%, tween 20 0,1% en PBS) durante 1 hora (**Tabla 1**). Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS.

Tabla 1. Anticuerpos y diluciones usados en el Western Blot para DAT, D2 y el control de carga (β -actina).

Proteína	Especie inmunizada	Anticuerpo 1°	Dilución Anticuerpo 1°	Anticuerpo 2°	Dilución Anticuerpo 2°
DAT	Rata	Rat Milipore (Mab369)	1:500	Anti-rat Alexa680	1:5000
D ₂	Ratón	Mouse Sta. Cruz (SC5303)	1:500	Anti-mouse Alexa680	1:5000
β -actina (DAT)	Ratón	Mouse Sigma Aldrich (A1978)	1:200000	Anti-mouse IRdye800	1:5000
β -actina (D ₂)	Conejo	Rabbit Abcam (ab8227)	1:10000	Anti-rabbit IRdye800	1:5000

La señal inmunorreactiva se detectó y cuantificó mediante el sistema de análisis de imagen infraroja Odyssey (LI-COR, Biosciences, Nebraska, EEUU), obteniéndose los valores integrados de intensidad. El valor de la inmunoreactividad correspondiente a la proteína β -actina, se utilizó como control de carga proteica, corrigiéndose los valores de inmunoreactividad de cada proteína de interés por el de la β -actina. No se observaron variaciones en el control de carga para ninguna de las muestras.

3.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el programa GraphPad Prism 5[®]. Se analizó el efecto del tiempo, sexo y tratamiento (PIC o Salino). Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM). La comparación estadística entre medias se realizó mediante un ANOVA de dos vías para las medidas asociadas a peso y consumo, medidas repetidas para valores tomados a lo largo del tiempo y medidas no repetidas para valores acumulados. Los pesos de los distintos tejidos (LIV, WAT y BAT) se representan como porcentaje (%) con respecto al peso corporal del animal. En este caso, la comparación estadística entre medias se realizó mediante un ANOVA de dos vías de medidas no repetidas. La comparación estadística para las medidas de inmunoreactividad se realizó mediante un test t de Student. El nivel de significancia establecido fue $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Estado nutricional y metabólico de animales PIC y Salino

Los resultados asociados al peso se presentan en la **Figura 1**. Se aprecian diferencias en el peso corporal durante los primeros PND, tanto en el caso de las hembras (**Figura 1A**) como en el de los machos (**Figura 1B**). Sin embargo, estas diferencias disminuyen con el tiempo hasta igualarse los pesos de los animales PIC y Salino alrededor del PND 35 en ambos sexos. Estas diferencias en la ganancia de peso tienen su reflejo estadístico tanto en el grupo de hembras como en el de machos al mostrarse una interacción entre tiempo y tratamiento (**Tabla 2**). Cuando se considera el incremento de peso entre PND 22 y PND 101 (**Figura 1C**) se confirman las diferencias entre el grupo PIC y Salino tanto para machos como para hembras, sin existir interacción entre los parámetros sexo y tratamiento (**Tabla 2**). El incremento de peso es mayor en el grupo PIC que en el Salino, en cuanto al tratamiento, y es mayor en machos que en hembras en lo referido al sexo (**Figura 1C**).

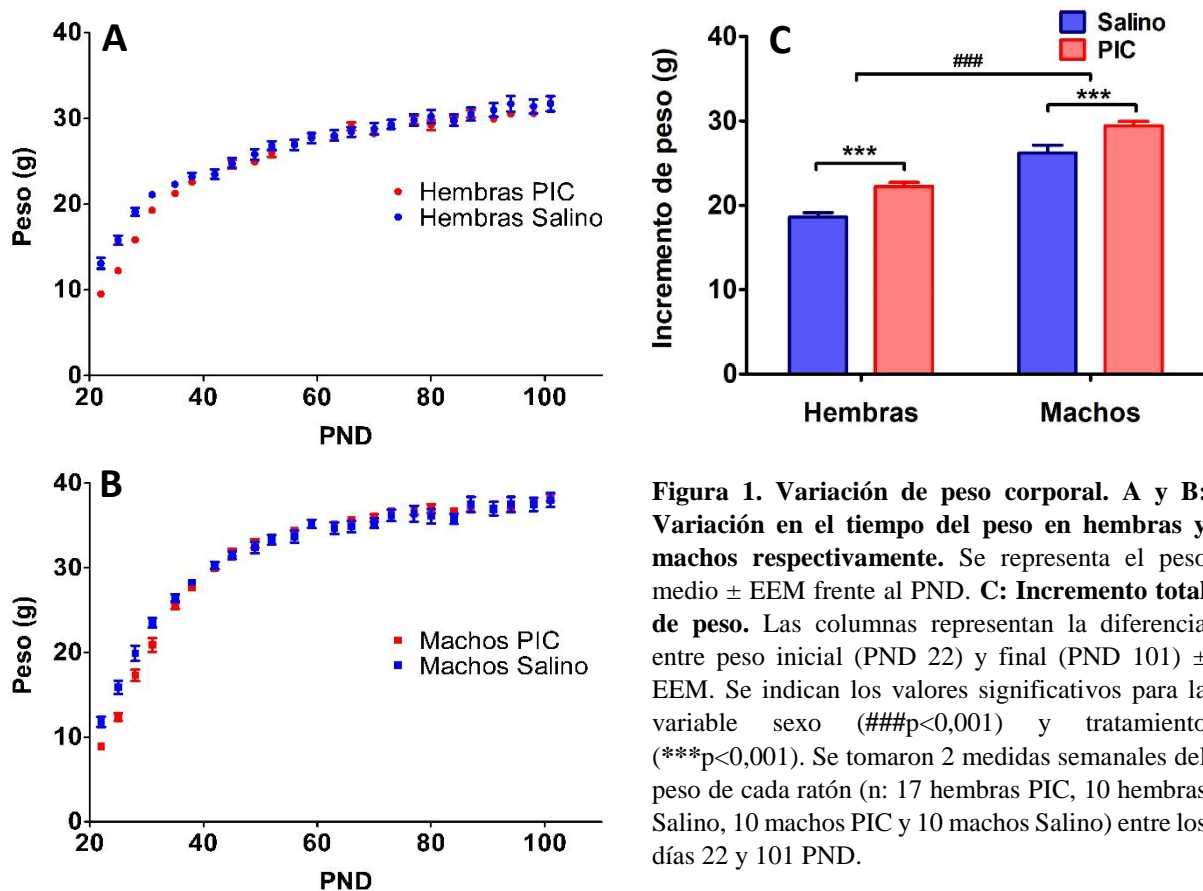


Figura 1. Variación de peso corporal. A y B: Variación en el tiempo del peso en hembras y machos respectivamente. Se representa el peso medio \pm EEM frente al PND. **C: Incremento total de peso.** Las columnas representan la diferencia entre peso inicial (PND 22) y final (PND 101) \pm EEM. Se indican los valores significativos para la variable sexo (### $p < 0,001$) y tratamiento (** $p < 0,001$). Se tomaron 2 medidas semanales del peso de cada ratón (n: 17 hembras PIC, 10 hembras Salino, 10 machos PIC y 10 machos Salino) entre los días 22 y 101 PND.

Tabla 2. Resultados del análisis ANOVA de 2 vías para el peso corporal. **A y B:** Efecto de los factores tiempo y tratamiento y su posible interacción en el peso corporal de hembras y machos respectivamente, medidas repetidas; **C:** Efecto de los factores sexo y tratamiento y su posible interacción en el incremento de peso, medidas no repetidas (gl: grados de libertad; F: valor F; p: valor p). Los valores estadísticamente significativos se muestran resaltados en negrita.

		Origen de la variación	gl	F	p
PESO/TIEMPO	(A) HEMBRAS	Tiempo	23	589,90	< 0,0001
		Tratamiento	1	2,31	0,1414
		Interacción	23	6,66	< 0,0001
	(B) MACHOS	Tiempo	23	820	< 0,0001
		Tratamiento	1	0,28	0,6004
		Interacción	23	5,46	< 0,0001
(C) INCREMENTO DE PESO	Sexo	1	0,1224	< 0,0001	
	Tratamiento	1	30,19	< 0,0001	
	Interacción	1	140,9	0,7281	

En cuanto al consumo de agua, los resultados se representan en la **Figura 2**. En el caso de las hembras (**Figura 2A**), el consumo de agua a lo largo del tiempo está significativamente asociado tanto al tiempo como al tratamiento de forma independiente (**Tabla 3**). Respecto a los machos (**Figura 2B**), únicamente el tiempo condiciona el consumo de agua (**Tabla 3**). Por su parte, las medidas de consumo acumulado entre PND 22 y PND 101 (**Figura 2C**) reflejan un consumo diferente entre sexos, siendo mayor en machos que en hembras. A pesar de no alcanzar un valor significativo, el efecto del tratamiento se encuentra muy cercano a la significancia ($p=0,054$), por lo que no se puede descartar su influencia sobre el consumo de agua (**Tabla 3**).

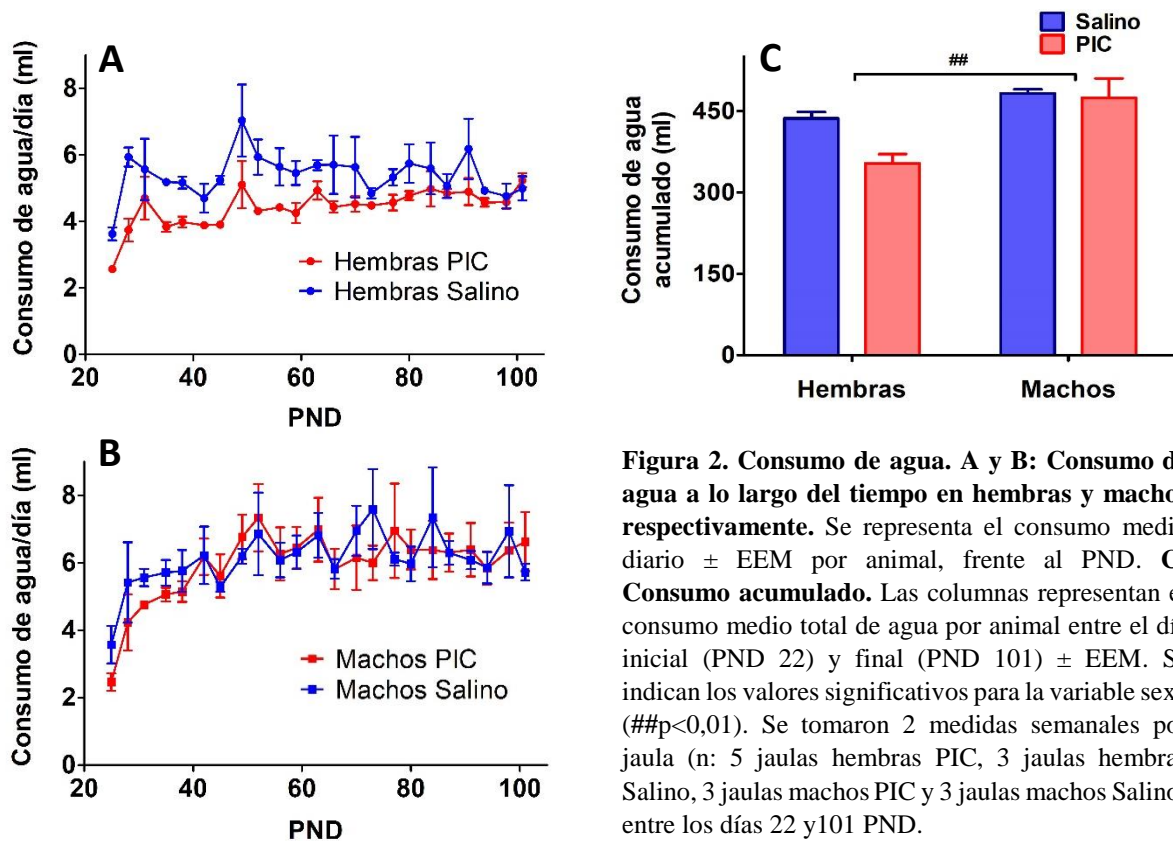


Tabla 3. Resultados del análisis ANOVA de 2 vías para el consumo de agua. **A y B:** Efecto de los factores tiempo y tratamiento y su posible interacción en el consumo de agua de hembras y machos respectivamente, medidas repetidas; **C:** Efecto de los factores sexo y tratamiento y su posible interacción en el consumo acumulado de agua, medidas no repetidas (gl: grados de libertad; F: valor F; p: valor p). Los valores estadísticamente significativos se muestran resaltados en negrita.

		Origen de la variación	gl	F	p
CONSUMO AGUA /TIEMPO	(A) HEMBRAS	Tiempo	22	4,50	< 0,0001
		Tratamiento	1	15,13	0,0081
		Interacción	22	122	0,2418
	(B) MACHOS	Tiempo	22	3,43	< 0,0001
		Tratamiento	1	0,15	0,7174
		Interacción	22	0,52	0,9587
(C) CONSUMO ACUMULADO		Sexo	1	16,21	0,0024
		Tratamiento	1	4,76	0,0540
		Interacción	1	3,26	0,1010

Del mismo modo, los resultados correspondientes a la ingesta de alimento se presentan en la **Figura 3**. En el caso de las hembras (**Figura 3A**) la ingesta de alimento es dependiente del tiempo y existe interacción entre este factor y el tratamiento de modo que la ingesta de alimento depende del grupo que se esté analizando (**Tabla 4**). Por el contrario, en el caso de los machos (**Figura 3B**) no existe interacción y la ingesta depende únicamente del tiempo (**Tabla 4**). Las medidas de ingesta de alimento acumulada (**Figura 3C**) no reflejan diferencias significativas en relación al tratamiento, aunque sí en relación al sexo, siendo mayor la ingesta de los machos que la de las hembras (**Tabla 4**).

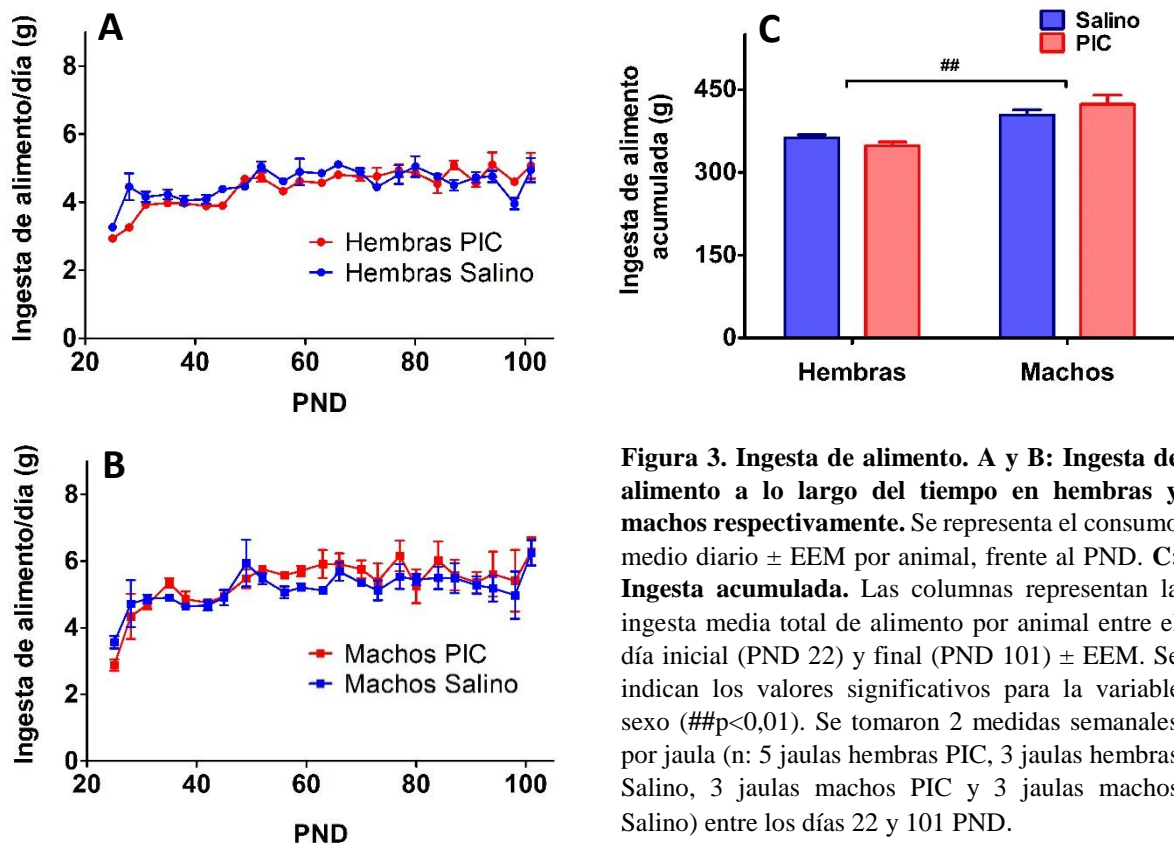


Tabla 4. Resultados del análisis ANOVA de 2 vías de la ingesta de alimento. **A y B:** Efecto de los factores tiempo y tratamiento y su posible interacción con la ingesta de comida en hembras y machos respectivamente, medidas repetidas; **C:** Efecto de los factores sexo y tratamiento y su posible interacción en la ingesta acumulada, medidas no repetidas (gl: grados de libertad; F: valor F; p: valor p). Los valores estadísticamente significativos se muestran resaltados en negrita.

		Origen de la variación	gl	F	p
INGESTA ALIMENTO /TIEMPO	(A) HEMBRAS	Tiempo	22	15,95	< 0,0001
		Tratamiento	1	0,95	0,3666
		Interacción	22	2,65	0,0003
	(B) MACHOS	Tiempo	22	5,65	< 0,0001
		Tratamiento	1	0,80	0,4213
		Interacción	22	0,51	0,9605
(C) INGESTA ACUMULADA		Sexo	1	33,81	0,0002
		Tratamiento	1	0,064	0,8054
		Interacción	1	2,68	0,1325

Por otro lado, se obtuvieron los resultados del peso del LIV, WAT y BAT en relación al peso corporal del animal (**Figura 4**). En el caso del peso relativo del LIV (**Figura 4A**), ni el tratamiento ni el sexo resultan significativos. No obstante, el sexo queda muy cercano a la significancia ($p=0,0517$), por lo que no se puede descartar su influencia (**Tabla 5**). En cuanto al peso relativo de WAT (**Figura 4B**), está significativamente condicionado por el sexo y el tratamiento, ambos de forma independiente (**Tabla 5**). El peso relativo es mayor en hembras que en machos y mayor en animales Salino que en PIC. Por último, en lo referido al peso relativo del BAT (**Figura 4C**), está condicionado por el sexo, siendo mayor en el caso de las hembras, pero no parece depender del tratamiento (**Tabla 5**).

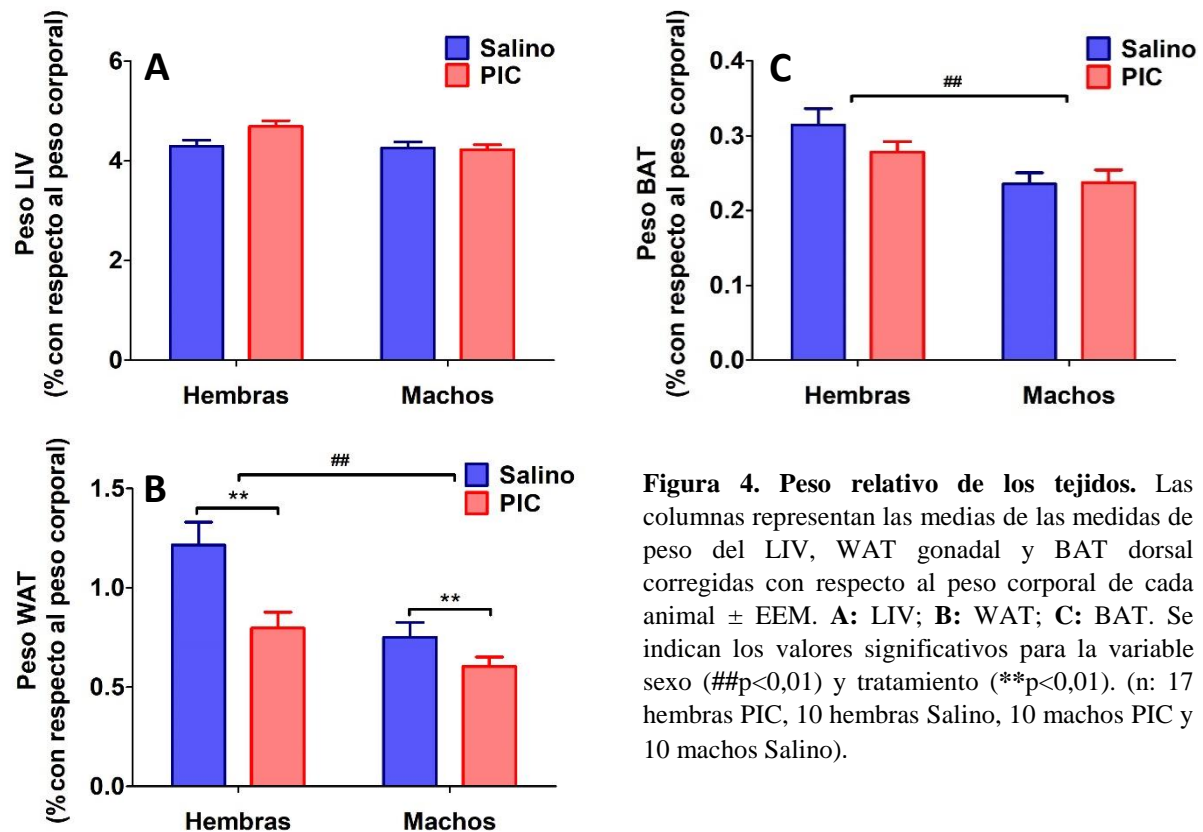


Tabla 5. Resultados del análisis ANOVA de 2 vías del efecto del sexo y el tratamiento y su posible interacción en el peso relativo del LIV, WAT y BAT, medidas no repetidas. (gl: grados de libertad; F: valor F; p: valor p). Los valores estadísticamente significativos se muestran resaltados en negrita.

	Origen de la variación	gl	F	Valor p
LIV	Sexo	1	4	0,0517
	Tratamiento	1	2,15	0,1499
	Interacción	1	2,98	0,0913
WAT	Sexo	1	13,32	0,0005
	Tratamiento	1	10,54	0,0022
	Interacción	1	3,89	0,1224
BAT	Sexo	1	12,05	0,0012
	Tratamiento	1	0,97	0,3302
	Interacción	1	1,19	0,2818

4.2 Expresión de proteínas del sistema dopaminérgico en ST de animales PIC y Salino

Los resultados correspondientes al Western Blot de la proteína del receptor dopamina D₂ se presentan en la **Figura 5**. El receptor D₂ presenta, en ST, un nivel de expresión similar en animales PIC y Salino (**Figura 5A**).

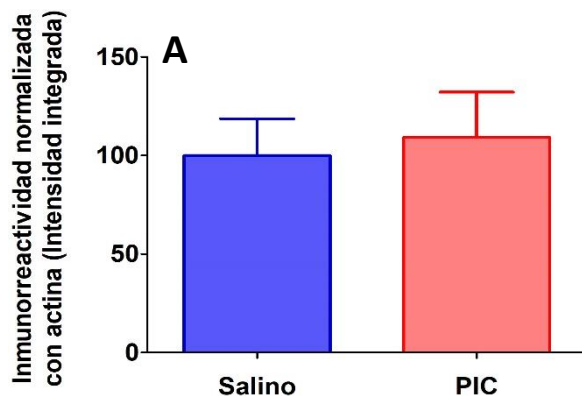
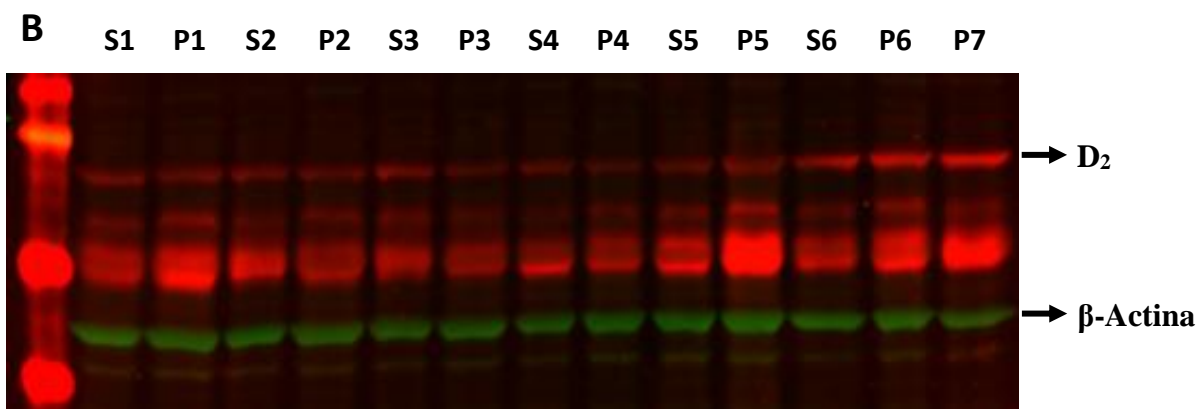


Figura 5. Western blot de receptor de dopamina D₂. **A: Inmunorreactividad corregida.** Las barras representan la media de la inmunorreactividad normalizada con respecto a la β -actina \pm EEM. El test t no reveló diferencias significativas para el tratamiento con poly (I:C) en D₂ ($p=0,7664$). **B: Imagen representativa de un gel de western blot de D₂.** Se analizó el ST de ratones macho Salino (S) ($n=6$) y ratones macho PIC (P) ($n=7$).



Por último, los resultados del transportador de dopamina DAT se presentan en la **Figura 6**. En este caso, a pesar de no alcanzar valores significativos, la expresión en animales PIC parece mostrar una tendencia a estar disminuida con respecto a animales Salino.

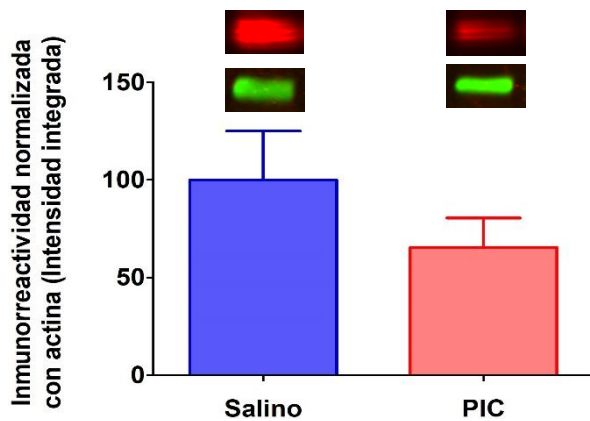


Figura 6. Western blot del transportador de dopamina DAT. Inmunorreactividad corregida. Las barras representan la media de la inmunorreactividad normalizada con respecto a la β -actina \pm EEM. Sobre las barras se muestra una imagen representativa de una banda del DAT de cada grupo (rojo) y de su respectivo control de carga β -actina (verde). El test t no reveló diferencias significativas para el tratamiento con poly (I:C) en DAT ($p=0,2295$). Se analizó el ST de ratones macho Salino ($n=6$) y ratones macho PIC ($n=7$).

5. DISCUSIÓN

El poly (I:C), es reconocido como extraño por el sistema inmune de los mamíferos a través del receptor transmembrana tipo toll 3 (TLR3). Este reconocimiento da lugar a la liberación al torrente sanguíneo de un gran número de citoquinas proinflamatorias (Meyer, 2014). En la placentación hemocorial, tipo de placentación que ocurre en mamíferos, incluyendo humanos y ratones, la placenta permite el contacto entre la sangre materna y fetal permitiendo el paso de los mediadores inflamatorios de la madre al feto (Reisinger et al., 2015). Las hipótesis imperantes sobre el mecanismo mediante el que el poly (I:C) induce síntomas que remedan algunos de los síntomas de la esquizofrenia sugieren la inducción de alteraciones en el neurodesarrollo y posiblemente en otros tejidos fetales. Las consecuencias de estas alteraciones en el desarrollo fetal se manifestarían en el animal una vez alcanzada la edad adulta.

Los resultados obtenidos reflejan diferencias en el desarrollo fetal inducidas por el tratamiento de madres gestantes con poly (I:C). En primer lugar, diferencias en el peso (Figura 1). En lo referido al sexo, las diferencias son una característica inherente a la cepa seleccionada (Biosciences, 2018). Por otro lado, los resultados asociados al tratamiento reflejan diferencias entre animales PIC y Salino. Los animales PIC presentan un peso menor que los Salino entre los PND 22 y 35. Estos resultados sugieren la presencia de posibles alteraciones en el desarrollo temprano que parecen estar condicionadas por la activación inmune materna desencadenada tras el tratamiento de las madres con poly (I:C). No obstante, el peso alcanzado en la edad adulta fue similar en ambos grupos y por tanto es el menor peso inicial descrito el responsable de un mayor incremento de peso.

La inducción de la respuesta inmune materna mediante poly (I:C) se ha relacionado con una notable reducción en el tejido placentario (Garbett et al., 2012). Uno de los principales mediadores inflamatorios relacionados tanto con alteraciones neuronales como placentarias es la IL-6. La administración de IL-6 exógena a madres gestantes es suficiente para inducir alteraciones estructurales y funcionales en el neurodesarrollo. Del mismo modo, se cree que la IL-6 es capaz de actuar sobre la interfase materno-fetal, para alterar parámetros como la transferencia de nutrientes, anoxia o permeabilidad vascular (Meyer, 2014). Se plantea que las diferencias en el peso observadas en el grupo PIC durante los primeros días postnatales se podrían deber a un menor desarrollo fetal condicionado por

alteraciones del tejido placentario, que limitarían el paso de nutrientes de la madre a los embriones. La hipótesis requeriría de confirmación por medidas de peso en el momento del nacimiento además de medidas del estado de la placenta.

No obstante, los resultados obtenidos no concuerdan con los obtenidos recientemente sobre el modelo, desarrollado en rata (**Horska et al., 2017**). En este caso, no se encontraron diferencias en el peso durante los primeros 28 PND y se observó una menor ganancia de peso en animales PIC. Aún son pocos los estudios dirigidos a determinar el efecto del poly (I:C) sobre el estado nutricional y metabólico, por lo que los resultados son todavía inconsistentes.

Por otro lado, el consumo de agua (**Figura 2**) incrementa con el tiempo en ambos sexos, siendo el consumo acumulado mayor en machos que en hembras. Estos resultados correlacionan con el crecimiento de los animales a lo largo del tiempo y con el mayor tamaño de los machos. A mayor tamaño, mayor es el requerimiento de agua del organismo. En cuanto al tratamiento con poly (I:C), éste condiciona el consumo de agua a lo largo del tiempo en el caso de las hembras pero no de los machos. Además, parece ser capaz de condicionar el consumo acumulado, aunque sin alcanzar la significancia estadística. Las diferencias entre sexos en la respuesta al tratamiento, observadas en las medidas a lo largo del tiempo, no se ven corroboradas por la interacción sexo-tratamiento en medidas de consumo acumulado. Estos resultados parecen indicar una ausencia de peso estadístico suficiente. Sería necesario replicar los procedimientos aumentando el número de animales analizados para confirmar las sospechas en torno al efecto del tratamiento e incluso la interacción sexo-tratamiento en medidas de consumo acumulado.

Los resultados de la ingesta de alimento (**Figura 3**) revelan el efecto del tiempo y el sexo, que al igual que en el consumo de agua, aumenta con el tiempo y es mayor en machos que en hembras, por su mayor envergadura. El tiempo y el tratamiento presentan interacción en medidas de ingesta a lo largo del tiempo en hembras pero no en machos, reflejando de nuevo diferencias en el efecto del tratamiento en función del sexo. Sin embargo, el tratamiento no condiciona la ingesta acumulada de alimento.

En lo referido a los tejidos obtenidos por disección, el peso relativo del hígado (expresado en % sobre el peso corporal total) (**Figura 4A**) es mayor en hembras que en machos, siendo la diferencia prácticamente significativa. La diferencia se debe esencialmente a un mayor peso relativo en el hígado de hembras PIC, mientras que el peso relativo del hígado de hembras Salino y ambos grupos de machos es muy similar. Este hecho lleva a plantear de nuevo la posible interacción sexo-tratamiento, donde el tratamiento afectaría en mayor medida a hembras. Esta interacción no se manifestaría por la ausencia de peso estadístico suficiente. Por tanto, sería necesario aumentar el número de mediciones. Continuando con los pesos relativos de los tejidos, la disminución en el peso relativo del WAT (**Figura 4B**) en el grupo PIC con respecto al Salino, en ausencia de diferencias en la ingesta acumulada de alimento, sugiere una alteración en el metabolismo energético. Estas alteraciones podrían estar causadas por cambios fisiopatológicos del propio tejido o por una desregulación derivada de posibles alteraciones

en el neurodesarrollo a nivel de eje hipotálamo-hipófisis, el cual ha demostrado ser susceptible a la activación inmune materna (Babri et al., 2014). Por el contrario, el peso relativo del BAT (Figura 4C) únicamente se ve condicionado por el sexo, donde al igual que el WAT, es mayor en hembras que en machos.

Las diferencias asociadas al sexo en esquizofrenia son apreciables en prácticamente cualquiera de los aspectos de la enfermedad, desde la incidencia o la edad media de inicio, hasta la sintomatología o la respuesta a tratamientos farmacológicos. Los resultados obtenidos parecen sugerir la presencia de estas diferencias también en el modelo. Previamente se habían descrito diferencias en la atención, cognición o habilidades sociales que parecían afectar preferentemente a uno u otro sexo en función del día post-natal en el que se produjo la exposición (Hill, 2016). Se plantea que la causa de las diferencias observadas, tanto en la enfermedad humana como en el modelo animal, se podrían deber a la interacción entre hormonas sexuales y factores asociados al estrés, aunque sería necesario estudiar en mayor profundidad el papel de las hormonas implicadas en el desarrollo sexual.

Por último, el análisis del estado dopaminérgico a nivel del ST indica alteraciones en la expresión de DAT (Figura 6) pero no del receptor D₂ (Figura 5). La expresión de DAT se ve reducida en el ST. El DAT es el principal elemento regulador de la duración e intensidad del impulso inducido por la liberación de dopamina en ST (Uhl, 2003). La disminución en la expresión de este transportador se relacionaría con un aumento en el tono dopaminérgico de esta área cerebral. El aumento de los niveles de dopamina en ST relaciona directamente el modelo con la neurofisiopatología característica de la enfermedad (Goto & Grace, 2007). Aun así, los resultados obtenidos no alcanzan la significancia. Por su parte, aumentos en los niveles de expresión de D₂ en ST han sido previamente descritos en el modelo (Eyles et al., 2012), aunque en este caso no se han observado dichas variaciones. Por tanto, es necesario replicar los procedimientos aumentando el número de mediciones y la validez estadística de los resultados obtenidos.

6. CONCLUSIONES

La inducción de la respuesta inmune materna por poly (I:C) en ratón, produce varias alteraciones sobre la descendencia, afectando de forma distinta a machos y hembras. En primer lugar, es capaz de inducir cambios en el peso de los animales en las primeras etapas de desarrollo. Además, induce cambios en la cantidad relativa de WAT, sin existir alteraciones en la ingesta de alimento, lo que podría relacionarse con alteraciones en el metabolismo energético. La activación inmune materna parece tener influencia también sobre el sistema dopaminérgico a nivel del ST, produciéndose alteraciones que encajan con lo propuesto por la hipótesis dopaminérgica en esquizofrenia. La aparición de estas variaciones sugiere que este podría ser un modelo prometedor para el estudio de la etiopatogenia de la enfermedad. No obstante, aún hay resultados no concluyentes que requieren de mayor peso estadístico para su confirmación. Por tanto, es necesario continuar caracterizando el estado del sistema dopaminérgico y del metabolismo en el modelo animal analizado.

7. BIBLIOGRAFÍA

Babri, S., Doosti, M., & Salari, A. (2014). Strain-dependent effects of prenatal maternal immune activation on anxiety and depression-like behaviors in offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, *37*, 164-176.

Biosciences, T. (2018). Swiss Webster Mice | Germ Free, SPF and SOPF. Obtenido en <https://www.taconic.com/mouse-model/swiss-webster>. 10 de Junio de 2018.

Brown, A. & Derkits, E. (2010). Prenatal Infection and Schizophrenia: A review of epidemiologic and translational studies. *American Journal of Psychiatry*, *167*(3), 261-280.

Ellison-Wright, I., & Bullmore, E. (2010). Anatomy of bipolar disorder and schizophrenia: A meta-analysis. *Schizophrenia Research*, *117*(1), 1-12.

Emul, M., & Kalelioglu, T. (2015). Etiology of cardiovascular disease in patients with schizophrenia: current perspectives. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, *11*, 2493-2503.

Eyles, D., Feldon, J., & Meyer, U. (2012). Schizophrenia: do all roads lead to dopamine or is this where they start? Evidence from two epidemiologically informed developmental rodent models. *Translational Psychiatry*, *2*(2), 81.

Garbett, K., Hsiao, E., Kálmán, S., Patterson, P., & Mirnics, K. (2012). Effects of maternal immune activation on gene expression patterns in the fetal brain. *Translational Psychiatry*, *2*(4), 98.

Goto, Y., & Grace, A. (2007). The dopamine system and the pathophysiology of schizophrenia: A basic science perspective. *International Review of Neurobiology*, *78*, 41-68.

Hill, R. (2016). Sex differences in animal models of schizophrenia shed light on the underlying pathophysiology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *67*, 41-56.

Holloway, T., Moreno, J., Umali, A., Rayannavar, V., Hodes, G., Russo, S. & Gonzalez-Maeso, J. (2013). Prenatal stress induces schizophrenia-like alterations of serotonin 2A and metabotropic glutamate 2 receptors in the adult offspring: Role of maternal immune system. *Journal of Neuroscience*, *33*(3), 1088-1098.

Horska, K., Ruda-Kucerova, J., Drazanova, E., Karpisek, M., Demlova, R., Kasperek, T., & Kotolova, H. (2017). Aripiprazole-induced adverse metabolic alterations in polyI:C neurodevelopmental model of schizophrenia in rats. *Neuropharmacology*, *123*, 148-158.

Howes, O. & Kapur, S. (2009). The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III-the final common pathway. *Schizophrenia Bulletin*, *35*(3), 549-562.

Ibrahim, H. & Tamminga, C. (2011). Schizophrenia: Treatment targets beyond monoamine systems. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *51*(1), 189-209.

Jones, C., Watson, D. & Fone, K. (2011). Animal models of schizophrenia. *British Journal of Pharmacology*, *164*(4), 1162-1194.

Jones, P. & Cannon, M. (1998). The new epidemiology of schizophrenia. *Psychiatric Clinics of North America*, *21*(1), 1-25.

- Laursen, T., Nordentoft, M., & Mortensen, P. (2014). Excess early mortality in schizophrenia. *Annual Review of Clinical Psychology*, *10*(1), 425-448.
- Lett, T., Voineskos, A., Kennedy, J., Levine, B. & Daskalakis, Z. (2014). Treating working memory deficits in schizophrenia: A review of the neurobiology. *Biological Psychiatry*, *75*(5), 361-370.
- Lewis, D., & Sweet, R. (2009). Schizophrenia from a neural circuitry perspective: Advancing toward rational pharmacological therapies. *Journal of Clinical Investigation*, *119*(4), 706-716.
- Malan-Müller, S., Kilian, S., van den Heuvel, L., Bardien, S., Asmal, L., & Warnich, L. et al. (2016). A systematic review of genetic variants associated with metabolic syndrome in patients with schizophrenia. *Schizophrenia Research*, *170*(1), 1-17.
- Meyer, U. (2014). Prenatal poly (I:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biological Psychiatry*, *75*(4), 307-315.
- Olabi, B., Ellison-Wright, I., McIntosh, A., Wood, S., Bullmore, E. & Lawrie, S. (2011). Are there progressive brain changes in schizophrenia? A meta-analysis of structural magnetic resonance imaging studies. *Biological Psychiatry*, *70*(1), 88-96.
- Reisinger, S., Khan, D., Kong, E., Berger, A., Pollak, A., & Pollak, D. (2015). The Poly (I:C) induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics*, *149*, 213-226.
- Seeman, P., Chau-Wong, M., Tedesco, J. & Wong, K. (1975). Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *72*(11), 4376-4380.
- Uhl, G. (2003). Dopamine transporter: Basic science and human variation of a key molecule for dopaminergic function, locomotion, and parkinsonism. *Movement Disorders*, *18*(7), 71-80.
- Zubin, J., & Spring, B. (1977). Vulnerability: A new view of schizophrenia. *Journal of Abnormal Psychology*, *86*(2), 103-126.