

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

TESIS DOCTORAL

Caracterización de las proteínas del complejo SNARE en esquizofrenia y su tratamiento

Eva Munarriz-Cuezva

2015

Esta Tesis doctoral se ha realizado gracias a un contrato de Técnico Especialista de Laboratorio del Centro de Investigación Biomédica En Red de Salud Mental (CIBERSAM) incluido dentro del Instituto de Salud Carlos III.



A mis aitas.

Los imposibles de hoy serán posibles mañana.
Konstantin Tsiolkovsky (1857-1935) inventor y científico ruso.

Llega la hora de escribir los agradecimientos. ¡Qué difícil!! Desde el principio he querido que llegase este momento y ahora que me toca... no sé por dónde empezar.

En primer lugar, tengo que agradecer a Javier que confiase en mí abriéndome las puertas de su laboratorio y de su grupo de investigación. Mi segunda familia. Aún recuerdo el día en el que te planteé mi propuesta, parece que fue ayer y ya han pasado casi ocho años. En todo este tiempo, he encontrado mi hueco, he crecido como científica y como persona. Mil gracias por haberme dado la oportunidad de dedicarme a lo que realmente me apasiona.

Otra de las personas de las que han hecho este proyecto realidad, eres tú, Leyre. Me has contagiado tu pasión por la ciencia y hacerme ver a lo que me quiero dedicar, haciendo que este trabajo se convierta en una aventura diaria. Has estado ahí en los buenos y malos momentos y eso nunca se olvida.

Koldo...el segundo de abordó. Eskerrik asko beti zure ikuspuntu zientifikoa nirekin elkarbanatzeagaitik. Hala ere, goizeko kafeetan kontatzen dizkiguzun kutxumutxuak gehien gustatu zaindana da, jajaja. Eskertzekoa da athletitzale bat eukitzea taldean!!! Beti zurekin...

Ane, nire bikotea. Eres como la amaxu de todos nosotros. Mi madre coraje donde las haya. Zenbat aldiz prestatu didazu sorbalda negar eiteko??? Zorionez, barre ein dogu bebai, eh!!! Que no perdamos nunca esas lágrimas que se nos caen cuando reímos hasta explotar.

RBK, mi reina rata!!! Sé que no te gusta oírlo pero tú fuiste mi “primera jefa” y la que me introdujo en el “mundo blotting”. Siempre me has prestado tu apoyo incondicional e interminable con la mejor de tus sonrisas. Gracias también a Raúl por todos los refranes, las aventuras de pueblo que ponemos en común en las comidas y mil batallitas que nunca deben acabarse.

George!!! Persona seria donde las haya...hasta que le conoces. Y te empieza vacilar como un amigo de toda la vida. Eskerrik asko zure betiko eta betirako laguntzat hartzeagaitik. Barre pila egin duгу zure hitz-jokoekin baina egia esanda batzuk kristonak dira (NuEva)

Igortxu, maitia!!! En una ocasión te dije que eras uno de mis pilares dentro de esta gran familia y lo repetiré las veces que haya falta y alzando la voz. Me has alegrado los momentos de bajón con tu humor ácido, con las clases de *toniball* en las que yo era la pelota, en todas las canciones que nos identifican, en los conciertos y en las juergas. Ilargira buelta maite zaitut!!!

Mis Lab Girls... ¿qué habría sido de mí sin vosotras??? Somos una piña!!! Trataré de agradecerlos TODO en orden de llegada al labo.

A mi Dar, le debo prácticamente todo (y más). Sabes que tú has sido mi codirectora en la sombra y aunque no se plasme en el papel siempre serás mi codirectora emocional. ¿Qué puedo decir de una persona que con sólo mirarme sabe lo que estoy pensando? Prácticamente nada!!! Que nunca te podré expresar lo que significas para mí... esos ratos de disecciones, cambios de jaulas,.. dan para desahogarse mucho. Sé que aún nos quedan miles de aventuras por vivir, dentro y fuera del labo. Te quiero.

Gracias a Carol...tus consejos científicos siempre han sido de lo más valiosos. Me encanta esa pasión por lo que haces que te rebosa y que te enciende la mirada. Esos ratitos de cotilleo en el txokito, por el viaje a Madrid, por la noche en vela en Barcelona y por millones de anécdotas más que siempre estarán en el recuerdo.

Mi rubia preferida... la más urbanita de todas. Te agradezco haberte podido "enseñar" mis conocimientos de pueblo, refranes incluidos. Todo ello a cambio de paseos al gym amenizados por las mejores crónicas de los programas de televisión. No todo ha sido ciencia, así que siempre fue un placer compartir contigo horas de bicicleta y innumerables juergas (que por cierto, espero que no hayan acabado).

Patri...me conquistaste desde el momento que fuimos a tomar algo pediste lo mismo que yo (jajaja). Nunca has perdido esa sonrisa que te caracteriza y eso es de agradecer cuando tienes un mal día. Buena persona donde las haya pero me encanta que, de vez en cuando, saques tu genio a relucir... esa es mi chica!

Airin!!! Gracias por sacarme de vez en cuando del labo a por algo de chocolate a la máquina, esos *breaks* a mitad de tarde que nos hacen salir de nuestras condiciones de hipoxia. Persona trabajadora e incansable... una vez te pregunte cuantas horas tenía tú día...pues dependiendo de lo largo que sea el experimento, no??? Los lunes de ratones son menos lunes en tu compañía.

Blanca y radiante... aún nos quedan bastante ratos con los que compartir juntas, espero que consigas soportarme y que nos riamos tanto o más de lo que lo hemos hecho hasta ahora.

Ainés!!! Mi pequeña saltamontes...no me cansaré de decirte que me identificó un montón contigo. Gracias por esa vitalidad que aportas al grupo... tu predisposición es admirable.

Guada Ruden. Chica de ida y vuelta. Asko pozten naz zure lekua Leioan aurkitzea (contigo codo con codo en la poyata empezó todo) así tienes la oportunidad de meterme caña!!! Me lo tomo como un reto porque ya sabes que de vez en cuando el aprendiz supera al maestro... *challenge accepted!!!*

Amaia, zure izaera goxoak lasaitzen nau... tesikidea ta laguna...beti irribarre batekin itxarotzen nauzu laguntzeko...hainbat eta hainbat esperimentuaz eta esperientzietaz hitz egiteagaitik hemen doaz urte askotarako eskerrak, guapa!

Coradisima!!! Qué haría yo sin tu saludo matutino??? Aunque no haya "nada reseñable" siempre me has ofrecido la mejor de tus sonrisas. Conectamos desde el primer momento y esto de pertenecer al CIBER nos ha hecho unirnos más aún (si cabe). Sin ser científica, tu apoyo es siempre muy importante porque lo ves todo desde otra perspectiva aunque a día de hoy ya podrías sacarte una carrera de ciencias (hasta he conseguido que toques a un ratón que no sea el de tu ordenador, jajaja)

No sólo en Leioa se ha forjado este proyecto. JAGS nos ofreció la oportunidad de realizar experimentos en la UIB y a Palma de Mallorca que nos fuimos. Gracias a Alfredo, María y TonyOn (mallorquines y no mallorquines) por hacer de nuestra estancia allí una gran experiencia científica y personal que nunca olvidaré.

Seguramente me dejaré gente por el camino... y es que ocho años dan para muchos. He tenido la gran suerte de compartir poyatas y experiencias con diferentes personas, científicamente y personalmente hablando. Gente a la que he enseñado y me han enseñado y es que de cada persona que ha pasado por el labo, siempre te quedas con algo. A toda esa gente que con la que he compartido sitio, comidas, juergas y, sobre todo, buenos ratos. Así que a todos aquellos que han pasado por el departamento de farma, os doy las gracias por aportar vuestro granito de arena.

Eskerrik asko a los integrantes de “Gabinete de crisis *et al.*”, Koldo y Leire. Koldo, esos consejos K para una vida mejor y los kafepintxos para soltar lastre han sido incontables...eskerrik asko zure munduaren iritzia nirekin elkarbanatzeagaitik. Leire...tú me has abierto las puertas de tu casa y de tu vida...pasaste de ser mi jefa a ser una persona fundamental en mi vida (hago participe de este agradecimiento a Iker, que al pobre entre los tres le hemos aburrido y mareado más de lo que suponíamos. A ti, gracias por darnos el punto de vista de no-científico).

A mis amigos, los viejos y los nuevos. Sin vuestro apoyo, este proyecto no hubiera salido a delante:

Gaur egungo neskak, Olatz eta Lia... me habéis oído hablar miles de veces sobre cosas del labo y, por fin, con esta tesis os puedo mostrar a lo que me dedico (que no todo son congresos). Esto me recuerda que también esa frase se la dedico a mi amigo Alex... que sin saber a lo que me dedico me ha hecho reír prácticamente a diario sin pedir nada a cambio. Te pido un favor, que nunca perdamos esos momentos. Patri, siempre sabes darme la visión sensata que a veces sabes que necesito, gracias por bajarme de vez en cuando a la Tierra. A Tanya, Ibai y demás familia por hacerme olvidar momentáneamente este historia de la tesis. Eskerrik asko a Izas, muy comprometida con este proyecto especialmente, sin tu aportación no tendría la portada más bonita que puedo imaginar.

Gracias a mi alikantina preferida. Gracias por saber sacar lo mejor de mí, dándome ánimos en el gym y hacerme ver que yo también puedo alcanzar mis metas. Gracias por hacerme tia.

¿Quién me iba a decir que las clases de inglés dan para tanto? A Vero por darme a oportunidad de de conocer a su cuadrilla, especialmente a mi Sorgintxu favorita, Leire. Gracias, de corazón, por abrirme vuestro maravilloso interior. A Itsas, por compartir esa versión tan especial que tiene de ver el mundo.

Por supuesto, no puedo olvidarme de agradecer a mi grupo de dantzas Trabudu todas las horas invertidas en bailar, cotillear, reír y llorar. Desde la directiva, pasando por los “Kroketalari” hasta los “autentikos pelikanos” os habéis convertido en una de mis válvulas de escape. Muy especialmente tengo que dar las gracias a mis Tronkis, Lore, Encarni y Verogüei porque sois vosotras las que más cerca habéis estado de este proyecto, con lo que ello conlleva. Lo que me habeis sufrido.

Finalmente, quiero dar las gracias a mi familia. Tanto a los Munarriz como a los Cuezva, sé que por muchas veces que os lo explique, vais a seguir pensando que soy una matarratas y que sólo viajo. Aquí os muestro un poquito de eso a lo que yo llamo trabajo.

A mi hermana. Inma, sabes que eres mi ejemplo a seguir y que nunca podré estar a la altura de la gran persona que eres. Son tantas las cosas por las que te tengo que estar agradecida que necesitaría otra tesis para plasmarlo. Siempre has estado, estás y estarás en un pedacito de mi corazón. No solamente por hacerte sonreír a ti sino también a mí, mi Kuñau Jorge, ya se merece un premio.

Aita eta ama. Vuestro turno. Incapaz de decir con palabras lo agradecida que estoy por enseñarme lo que es la vida, en ocasiones compleja. A saber tirar para adelante cuando las condiciones no son las ideales. Por ayudarme a ser mejor persona y a seguir mis sueños por muy inalcanzables que parezcan.

Por todas las conversaciones.

Evita

ABREVIATURAS

2-AG	2- Araquidonoil Glicerol
5HT_{2A}	Receptor de serotonina tipo 2A
AC	Adenilil Ciclasa
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	Ácido desoxiribonucleico complementario
AEA	Araquidonoiletanolamina
AMP	Adenosina monofosfato (del inglés <i>Adenosine Mono Phosphate</i>)
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico (del inglés <i>cyclic Adenosine Mono Phosphate</i>)
AMPA	Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropiónico (del inglés <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>)
ANOVA	Análisis de la varianza
APS	Persulfato amónico (del inglés <i>Ammonium Persulfate</i>)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosina trifosfato (del inglés <i>Adenosine Tri Phosphate</i>)
BA	Área de Brodmann (del inglés <i>Brodman Area</i>)
Bp	Pares de bases (del inglés <i>Base Pair</i>)
BSA	Albumina Sérica Bovina (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>)
C	Individuos control (en el estudio en humano) y animales control (en el estudio en animales)
Ca²⁺	Calcio
CB1	Receptor cannabinoide tipo 1
CB2	Receptor cannabinoide tipo 2
Cdk5	Ciclina dependiente de kinasa 5 (del inglés <i>Cyclin-dependant- kinase 5</i>)
CEBA	Comisión Ética de Bienestar Animal
CEIAB	Comisión Ética de Investigación con Agentes Biológicos
CLZ	Clozapina
COMT	Catecol- O- Metil Transferasa
Ct	Ciclo umbral (del inglés <i>Threshold Cycle</i>)
D₂	Receptor dopaminérgico de tipo 2
DAH	Déficit de Atención e Hiperactividad
DISC-1	(del inglés <i>Disrupted In Schizophrenia-1</i>)
dNTP	deoxiribonucleótido
DDT	Ditiotreitol
EAAT3	Transportador de aminoácidos excitatorios (del inglés <i>Excitatory Amino Acid Transporter</i>)
EC	Estímulo condicionado
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de crecimiento epitelial (del inglés <i>Epithelial Growth Factor</i>)
ErbB4	Receptor tirosin kinasa 4
ERK	Kinasas reguladas por señales extracelulares (del inglés <i>Extracellular Regulated Kinase</i>)
FADD	(del inglés <i>Fas- Associated protein with Death Domain</i>)
Fas-L	Ligando del receptor Fas (del inglés <i>Fas Ligand</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (del inglés <i>Fluorescein IsoThioCyanate</i>)
GABA	Ácido gamma-aminobutírico (del inglés <i>Gamma Amino Butyric Acid</i>)
GADPH	(del inglés <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>)
GCPR	Receptor acoplado a proteína G (del inglés <i>G-protein coupled receptor</i>)

GFAP	(del inglés <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>)
IOD	Densidad óptica integrada (del inglés <i>Integrated Optical Density</i>)
INIA	Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias
i.p.	Intraperitoneal
IPM	Intervalo <i>postmortem</i>
K⁺	Potasio
kDa	Kilodalton
KO	(del inglés <i>Knock Out</i>)
LD	Desequilibrio de ligamiento (del inglés <i>Linkage Disequilibrium</i>)
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
M	Mujer
MAPK	(del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MD	Individuos con depresión mayor
MD(-)	Individuos con depresión mayor no tratados con fármacos antidepresivos
MD(+)	Individuos con depresión mayor tratados con fármacos antidepresivos
Met	Metionina
MRI	Imágenes de resonancia magnética (del inglés <i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
MW	Marcador de peso molecular (del inglés <i>Molecular Weight</i>)
NF-L	Neurofilamento- L
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NMJ	Conexiones neuromusculares (del inglés <i>NeuroMuscular Junctions</i>)
NR2A	Subunidad del receptor NMDA-2A
NR2B	Subunidad del receptor NMDA-2B
NRG-1	Neuregulina-1
PAR-4	(del inglés <i>Prostate Apoptosis Response-4</i>)
PARP	Poli (ADP-ribosa) polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCP	Fenciclidina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFC	Corteza prefrontal (del inglés <i>PreFrontal Cortex</i>)
PIP2	Fosfatidil-inositol bifosfato
PIP3	Fosfatidil-inositol-3,4,5- trifosfato
PKC	Protein Kinasa C
PPI	Inhibición prepulso (del inglés <i>Pre Pulse Inhibition</i>)
PSD-95	(del inglés <i>Post-Synaptic Density- 95</i>)
q-RT-PCR	PCR cuantitativa a tiempo real (del inglés <i>quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)
RIN	Número de integridad del ARN (del inglés <i>RNA Integrity Number</i>)
RQ	Cantidad relativa (del inglés <i>Relative Quantity</i>)
RSP29	Proteína ribosómica S29 (del inglés <i>Ribosomal protein S29</i>)
RT	Temperatura ambiente (del inglés <i>Room Temperature</i>)
SD	Individuos suicidas no-esquizofrénicos
SDS	Dodecil sulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>)
SDS-PAGE	(del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrilamide Gel Electrophoresis</i>)
SEM	Error estándar de la media (del inglés <i>Standard Error of the Mean</i>)
SM	Sec/Munc
SNAP	(del inglés <i>SyNaptosomal-Associated Protein</i>)

SNARE	(del inglés <i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor</i>)
SNP	(del inglés <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SSB	(del inglés <i>Single Strand DNA Break</i>)
st	Muestra estándar
STX	Sintaxina
STXBP	(del inglés <i>Syntaxin Binding Protein</i>)
SZ	Individuos con esquizofrenia
SZ(-)	Individuos con esquizofrenia no tratados con fármacos antipsicóticos
SZ(+)	Individuos con esquizofrenia tratados con fármacos antipsicóticos
TEMED	N, N, N, N'- tetrametilediamina
Tg	Animales transgénicos
THC	Tetrahidrocannabinol
TNRF	Receptor del factor necrótico tumoral (del inglés <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>)
TST	Test de suspensión de la cola (del inglés <i>Tail Suspension Test</i>)
V	Varón
Val	Valina
VAMP	(del inglés <i>Vesicle- Associated Membrane Protein</i>)
VTA	Área tegmental ventral (del inglés <i>Ventral Tegmental Area</i>)

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1. ESQUIZOFRENIA	3
1.1.1. Aspectos generales	4
1.1.1.1. Sintomatología	4
1.1.1.1.1. <i>Síntomas positivos</i>	4
1.1.1.1.2. <i>Síntomas negativos</i>	5
1.1.1.1.3. <i>Trastornos cognitivos</i>	6
1.1.1.2. Tipos de esquizofrenia	6
1.1.2. Bases biológicas de la esquizofrenia	7
1.1.2.1. Genes y ambiente	7
1.1.2.2. Hipótesis dopaminérgica	10
1.1.2.3. Hipótesis glutamatérgica	11
1.1.3. Fármacos utilizados en el tratamiento de la esquizofrenia	12
1.2. LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES	13
1.2.1. Proteínas presinápticas	14
1.2.1.1. Proteínas SNARE	15
1.2.1.1.1. <i>Sintaxina-1A</i>	15
1.2.1.1.2. <i>SNAP-25</i>	18
1.2.1.1.3. <i>Sinaptobrevina</i>	18
1.2.1.2. Proteínas pertenecientes a la familia de las SM (Sec/Munc)	19
1.2.1.2.1. <i>Munc18-1</i>	20
1.2.1.2.1.1. <i>Fosforilación de munc18-1</i>	22
1.2.1.3. Otras proteínas presinápticas: sensores de calcio	22
1.2.1.3.1. <i>Sinaptotagmina</i>	22
1.2.1.3.2. <i>Sinaptofisina</i>	24
1.2.2. Formación del complejo SNARE	25
1.2.3. Proteínas presinápticas y esquizofrenia	28
1.3. PROTEÍNAS RELACIONADAS CON ESQUIZOFRENIA	29
1.3.1. DISC-1	30
1.3.2. Neuregulina-1 y proteínas del dominio PDZ: Receptor ErbB4 y PSD- 95	32
1.3.2.1. Neuregulina-1	33
1.3.2.1.1. <i>Neuregulina-1 y esquizofrenia</i>	35
1.3.2.2. Receptor ErbB4	35
1.3.2.3. Proteína PSD-95	37
1.4. SISTEMA CANNABINOIDE	37
1.4.1. Receptor CB1	38
1.4.2. Receptor CB2	39
1.4.3. Consumo de cannabis y esquizofrenia	40
1.5. PROTEÍNAS DE LAS VÍAS APOPTÓTICAS	41
1.5.1. Receptor Fas	43

1.5.2. Proteínas FADD y p-FADD	43
1.5.3. Mecanismo efector de muerte neuronal: PARP-1	45
1.5.4. Apoptosis y esquizofrenia	47
1.6. MODELOS ANIMALES	47
1.6.1. Modelos animales utilizados para el estudio de esquizofrenia	48
1.6.1.1. Modelos animales farmacológicos	48
1.6.1.2. Modelos animales genéticos	50
1.6.1.3. Limitaciones de los modelos animales	51
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	53
2.1. Evaluación de las proteínas presinápticas en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia y el efecto del tratamiento antipsicótico	55
2.2. Caracterización neuroquímica y comportamental del modelo animal Munc18-OE	57
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	59
3.1. MUESTRAS CEREBRALES <i>POSTMORTEM</i>	61
3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	67
3.2.1. Generación del modelo animal Munc18-OE	67
3.2.2. Evaluación genética de los animales	70
3.2.2.1. Extracción de ADN	70
3.2.2.2. Genotipado	70
3.2.2.3. Electroforesis en gel de agarosa	72
3.2.3. Administración aguda de fármacos	73
3.3. MATERIALES	74
3.3.1. Reactivos	74
3.3.2. Sondas	75
3.3.3. Anticuerpos	75
3.3.3.1. Inmunofluorescencia	75
3.3.3.2. Western Blot	76
3.4. MÉTODOS	78
3.4.1. Evaluación cuantitativa de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	78
3.4.1.1. Extracción de ARN	78
3.4.1.2. Transcripción reversa	79
3.4.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa	79
3.4.1.4. Análisis matemático	80
3.4.2. Localización anatómica y cuantificación de munc18-1a mediante técnicas de inmunohistoquímica	81
3.4.2.1. Fijación del tejido cerebral mediante perfusión de paraformaldehído	82
3.4.2.2. Obtención de secciones de cerebro	82
3.4.2.3. Inmunofluorescencia	82
3.4.2.4. Cuantificación de la fluorescencia	83

3.4.3. Evaluación de la expresión proteica mediante western blot	83
3.4.3.1. Localización de las proteínas diana	84
3.4.3.2. Preparación de las muestras de cerebro <i>postmortem</i>	84
3.4.3.3. Preparación de las muestras cerebrales del modelo animal Munc18-OE	85
3.4.3.4. Electroforesis	85
3.4.3.5. Transferencia	88
3.4.3.6. Bloqueo de la membrana	89
3.4.3.7. Inmunodetección de las muestras de cerebro <i>postmortem</i> ...	89
3.4.3.8. Cuantificación de las proteínas diana en cerebro <i>postmortem</i>	91
3.4.3.9. Inmunodetección de las muestras de corteza del modelo animal Munc18-OE	91
3.4.3.10. Cuantificación de las proteínas diana en corteza cerebral del Modelo Munc18-OE	92
3.4.4. Evaluación del fenotipo comportamental del modelo animal Munc18-OE	93
3.4.4.1. Evaluación de la actividad motora	93
3.4.4.1.1. Actividad motora espontánea. Actímetro	93
3.4.4.1.2. Coordinación motora. Rotarod	93
3.4.4.2. Evaluación de la actividad exploratoria mediante la caja con agujeros	94
3.4.4.3. Evaluación del estado de ansiedad	95
3.4.4.3.1. Laberinto elevado en cruz	95
3.4.4.3.2. Interacción social	96
3.4.4.4. Evaluación del estado de depresión mediante la prueba de natación forzada	96
3.4.5. Análisis estadístico	97
4.- RESULTADOS	99
4.1. EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PRESINÁPTICAS EN CORTEZA PREFRONTAL DE INDIVIDUOS CON ESQUIZOFRENIA	101
4.1.1. Caracterización de la expresión proteica de munc18-1a y munc18-1b en corteza prefrontal de cerebro humano <i>postmortem</i>	101
4.1.2. Distribución subcelular de las isoformas munc18-1a/b en corteza prefrontal de cerebro humano <i>postmortem</i>	102
4.1.3. Evaluación del efecto del intervalo <i>postmortem</i> sobre la expresión	103
4.1.4. Evaluación de la expresión proteica de munc18-1, sintaxina-1A y otras proteínas presinápticas en corteza prefrontal de cerebro humano <i>postmortem</i> de individuos con esquizofrenia y sus controles ...	105
4.1.4.1. Evaluación de la expresión proteica de munc18-1	105
4.1.4.2. Evaluación de la expresión proteica de sintaxina-1A	106

4.1.4.3. Evaluación de la expresión proteica de sinaptobrevina	107
4.1.4.4. Evaluación de la expresión proteica de SNAP-25	108
4.1.4.5. Evaluación de la expresión proteica de sinaptotagmina	108
4.1.4.6. Evaluación de la expresión proteica de sinaptofisina	109
4.1.5. Efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión proteica de munc18-1, syntaxina-1A y otras proteínas presinápticas	110
4.1.5.1. Evaluación del efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión proteica de munc18-1 en corteza prefrontal	110
4.1.5.2. Evaluación del efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión proteica de syntaxina-1A en corteza	111
4.1.5.3. Evaluación del efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión proteica de sinaptobrevina en corteza prefrontal	112
4.1.5.4. Evaluación del efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión proteica de SNAP-25 en corteza prefrontal	113
4.1.5.5. Evaluación del efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión proteica de sinaptotagmina en corteza prefrontal	114
4.1.5.6. Evaluación del efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión proteica de sinaptofisina en corteza prefrontal	114
4.1.6. Evaluación de la relación entre la expresión de munc18-1a y otras proteínas presinápticas en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia y sus controles	115
4.1.7. Evaluación de la expresión proteica de munc18-1, syntaxina-1A y otras proteínas presinápticas en corteza prefrontal de individuos con depresión mayor y sus respectivos controles	118
4.1.8. Evaluación del complejo SNARE: degradación postmortem y distribución en sustancia gris y blanca	119
4.1.8.1. Evaluación del complejo SNARE: degradación <i>postmortem</i>	120
4.1.8.2. Evaluación del complejo SNARE: distribución subcelular	122
4.1.9. Evaluación del complejo SNARE de ~75 kDa en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia e individuos con depresión mayor. Efecto del tratamiento antipsicótico y antidepresivo	123
4.2. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL MUNC18-OE	126
4.2.1. Evaluación de la expresión génica de munc18-1 mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)	126
4.2.2. Evaluación de la expresión proteica munc18-1a	128
4.2.2.1. Localización anatómica y cuantificación de munc18-1a mediante inmunofluorescencia	128
4.2.2.2. Cuantificación de la expresión de la proteína munc18-1	129
4.2.2.3. Cuantificación de la expresión génica y proteica de munc18-1 tras la administración aguda de clozapina	131
4.2.3. Evaluación de la expresión de las proteínas presinápticas en el modelo animal Munc18-OE	134

4.2.3.1. Proteínas del complejo SNARE	134
4.2.3.2. Proteínas sinaptotagmina y sinaptofisina	136
4.2.4. Evaluación de la expresión proteica de las proteínas que fosforilan munc18-1	138
4.2.5. Evaluación de la expresión proteica de proteínas relacionadas con esquizofrenia	140
4.2.5.1. Disrupted In Schizophrenia-1 (DISC-1)	141
4.2.5.2. Neuregulina-1	142
4.2.5.3. Receptor ErbB4	143
4.2.5.4. Proteína PSD-95	144
4.2.5.5. Cuantificación de la expresión de proteínas relacionadas con esquizofrenia tras la administración aguda de clozapina	146
4.2.5.5.1. <i>Disrupted In Schizophrenia (DISC)</i>	146
4.2.5.5.2. <i>Neuregulina-1</i>	147
4.2.5.5.3. <i>Receptor ErbB4</i>	148
4.2.5.5.4. <i>Proteína PSD-95</i>	149
4.2.6. Evaluación de la expresión proteica de los receptores cannabinoides	150
4.2.7. Evaluación de la expresión de las proteínas de las vías apoptóticas	151
4.2.8. Evaluación del fenotipo comportamental del modelo animal Munc18-OE	153
4.2.8.1. Evaluación de la actividad motora	153
4.2.8.2. Evaluación de la coordinación motora	153
4.2.8.2. Evaluación de la actividad exploratoria	154
4.2.8.3. Evaluación del estado de ansiedad	155
4.2.8.4. Evaluación del fenotipo depresivo mediante la prueba de natación forzada	156
5.- DISCUSIÓN	159
5.1. EVALUACIÓN PROTEICA DE PROTEÍNAS PRESINÁPTICAS EN CORTEZA PREFRONTAL DE INDIVIDUOS CON ESQUIZOFRENIA	161
5.1.1. Evaluación de la expresión proteica de munc18-1 y sintaxina-1A	164
5.1.2. Evaluación de la relación entre la expresión de munc18-1 y sintaxina-1A	162
5.1.3. Evaluación proteica del resto de proteínas presinápticas	165
5.1.4. Evaluación del complejo SNARE	166
5.1.5. Otras poblaciones	168
5.1.6. Consideraciones generales	168
5.2. CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DEL MODELO ANIMAL MUNC18-OE	170
5.2.1. Evaluación de la expresión génica y proteica de munc18-1a y munc18-1a/b	170

5.2.1.1. Cuantificación de la expresión proteica de munc18-1a y munc18-1b tras la administración aguda del antipsicótico clozapina ...	172
5.2.2. Cuantificación de las proteínas presinápticas en corteza cerebral del modelo animal Munc18-OE	174
5.2.3. Cuantificación de las proteínas relacionadas con esquizofrenia en corteza cerebral del modelo animal Munc18-OE	177
5.2.3.1. DISC-1	178
5.2.3.2. NRG1, receptor ErbB4 y PSD-95	179
5.2.3.3. Cuantificación de la expresión proteica de las proteínas relacionadas con esquizofrenia tras la administración aguda del antipsicótico clozapina	182
5.2.3.3.1. <i>DISC-1</i>	182
5.2.3.3.2. <i>NRG1, receptor ErbB4 y PSD-95</i>	183
5.2.4. Cuantificación de los receptores cannabinoides en corteza del modelo animal Munc18-OE	185
5.2.5. Cuantificación de las proteínas de las vías apoptóticas en corteza del modelo animal Munc18-OE	186
5.2.6. Evaluación funcional del modelo animal Munc18-OE	188
5.3. FUTURO	189
6.- CONCLUSIONES	191
7.- BIBLIOGRAFÍA	197
8.- PUBLICACIONES	221

1.INTRODUCCIÓN

1.1. ESQUIZOFRENIA

La esquizofrenia es una enfermedad mental crónica, incapacitante y heterogénea que afecta al 1% de la población mundial (Jablensky, 2000). Se inicia en un patrón de edad que va desde el final de la adolescencia hasta la edad adulta (de 15 a 40 años) y afecta por igual a hombres y mujeres. Debido al alto coste económico y social la esquizofrenia se ha convertido en un problema de salud pública.

Según el DSM-IV (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*), la esquizofrenia constituye una categoría psiquiátrica cuyos síntomas característicos implican una variedad de disfunciones cognitivas y emocionales. Estas alteraciones incluyen efectos en la percepción, estado del ánimo y el movimiento como por ejemplo alucinaciones, pensamientos distorsionados, desorden en el lenguaje y problemas cognitivos que afectan a la memoria. El individuo con esquizofrenia posee un trastorno notable del funcionamiento social y una desorganización grave de la personalidad, siendo incapaz de distinguir entre experiencias reales de otras imaginarias, además de tener dificultades para reflexionar de manera lógica. Ningún síntoma es exclusivo de esta enfermedad. Además, estas alteraciones no se observan de igual forma en todos los individuos con esquizofrenia, tratándose de un trastorno polimorfo y heterogéneo en cuanto a expresión y evolución.

La enfermedad se caracteriza por episodios psicóticos que son estados mentales a menudo reversibles, en los que alguno de los procesos del pensamiento del paciente no es capaz de examinar la realidad correctamente. Los primeros episodios pueden iniciarse de manera aguda o insidiosa, en un contexto de evolución inespecífica de síntomas prodrómicos (síntomas que preceden al desarrollo total de la enfermedad) y con distintas combinaciones en la sintomatología clínica de ideas delirantes, alucinaciones, alteración de conducta y desorganización del pensamiento. Después del primer episodio, la evolución de la enfermedad varía considerablemente de un individuo a otro. Se dan casos en los que el paciente se recupera por completo, otros que sufren recaídas y en otros casos, los pacientes experimentan una progresividad severa de la enfermedad.

1.1.1. Aspectos generales

1.1.1.1. Sintomatología

Los síntomas de la esquizofrenia se clasifican en tres categorías: positivos, negativos y déficits cognitivos. Los síntomas positivos reflejan la presencia de pensamientos y conductas anormales como delirios, alucinaciones o habla desorganizada. Los síntomas negativos se refieren a la ausencia de las respuestas que suelen estar presentes, entre los que se encuentran una disminución de la expresión de la emoción, pobreza verbal y alteración de la memoria, dando lugar a un déficit del funcionamiento social de individuo. Por último, estos síntomas se acompañan con déficits cognitivos como pueden ser problemas de atención y aprendizaje, funciones ejecutivas y de memoria.

Los síntomas positivos y negativos, en la mayoría de los casos, no son coincidentes en el tiempo y difieren en presencia, frecuencia e intensidad con el que se manifiestan en cada paciente. Esto da lugar a una variabilidad individual alta, lo que dificulta el conocimiento de la etiología de la enfermedad y su tratamiento (Bowie y Havey, 2006).

Los síntomas positivos se reconocen con relativa facilidad, responden mejor al tratamiento y suponen un menor deterioro en la calidad de vida del paciente. Por el contrario, los síntomas negativos pueden pasar desapercibidos si se manifiestan de una forma leve, incluso confundándose con síntomas de pereza o mal comportamiento.

1.1.1.1.1. Síntomas positivos

Los síntomas positivos se caracterizan porque el individuo sufre una distorsión de la realidad incluyendo alucinaciones, delirios y alteraciones del pensamiento.

Las alucinaciones son percepciones sensoriales que ocurren en ausencia de estimulación del órgano sensorial específico y pueden ser de tipo auditivo, visual, de movimiento o cinestéticas, táctil, olfatoria o gustativa. Son clave para diagnosticar la enfermedad y pueden ser muy debilitantes para el paciente. Las alucinaciones

auditivas, falsas percepciones de sonidos, son las más comunes durante las cuales los individuos con esquizofrenia oyen generalmente voces.

Dentro de los síntomas positivos se encuentran también las ideas delirantes que son falsas creencias que se basan en evidencias que no son ciertas o inexistentes. Estas ideas se clasifican en delirios primarios que surgen de manera brusca y los delirios secundarios que surgen después de una experiencia anormal previa. Los delirios que aparecen con mayor frecuencia son: delirios de control (el paciente cree que sus acciones están controladas por una fuerza exterior), delirios nihilistas (el paciente piensa que ha perdido todos sus bienes), celotípicos (el paciente cree que su pareja le es infiel), delirios de culpa, delirios persecutorios, religiosos, de grandeza,...

Por último, las alteraciones del pensamiento normal también se consideran síntomas positivos de la esquizofrenia. Estas alteraciones son cambios en los procesos mentales normales y se caracterizan por la pérdida de la capacidad de asociación y de desarrollo de un pensamiento coherente y lógico.

1.1.1.1.2. Síntomas negativos

Las alteraciones asociadas a la esquizofrenia conocidas como síntomas negativos constituyen un dominio propio dentro del curso de la enfermedad, con diferente etiología y distintas implicaciones neurobiológicas y terapéuticas (Stahl, 2006).

Actualmente, y según los criterios del DSM-IV los síntomas negativos de la esquizofrenia son la alogia, el embotamiento afectivo, la anhedonia, la pérdida de motivación o apatía y el retraimiento social.

La alogia se caracteriza por la pobreza en el habla, es decir sin hablar de manera espontánea y contestando con frases cortas.

El embotamiento afectivo se relaciona con una reducción de la percepción, experimentación y expresión de las emociones. Este fenómeno deriva en un estado emocional aplanado considerándose tres componentes: disminución del nivel de expresión facial, disminución del lenguaje corporal y gestual y una disminución de la velocidad en el habla.

Otros síntomas negativos son la anhedonia que está caracterizada por una disminución o reducción de la capacidad de disfrute; y la apatía o pérdida de motivación en la cual el paciente muestra una completa indiferencia ante todo, poca motivación y persistencia. Estos dos síntomas están relacionados ya que la disminución de la capacidad de disfrute de futuros acontecimientos es en parte responsable de la ausencia de un comportamiento dirigido y motivado hacia el cumplimiento de objetivos que pueden tener una recompensa.

El retraimiento social también está considerado como un síntoma negativo de la esquizofrenia. Algunos pacientes apenas establecen contacto con otras personas pasando poco tiempo en compañía.

1.1.1.1.3. Trastornos cognitivos

En individuos con esquizofrenia existe un déficit cognitivo que comprende la capacidad de atención y procesamiento de la información, varios tipos de memoria (como la memoria de trabajo), la capacidad de aprendizaje y la función ejecutiva. Además, estos pacientes presentan también dificultades a la hora de distinguir información fundamental e irrelevante y tienen alterada la memoria a corto plazo a nivel verbal y visual.

La función ejecutiva consiste en planear una acción y llevarla a cabo. Los individuos con esquizofrenia poseen una reducción en los aspectos relacionados con esta función en comparación con la población general.

1.1.1.2. Tipos de esquizofrenia

La clasificación de los distintos tipos de esquizofrenia se puede realizar a partir del Manual Diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM) o a partir de la clasificación internacional de las enfermedades (CIE) de la organización Mundial de la Salud (OMS).

Según otros criterios para el diagnóstico, la esquizofrenia se clasifica en varios tipos, dependiendo de los síntomas principales que se manifiesten en el momento de la evaluación y cual sea la sintomatología predominante.

La *esquizofrenia paranoide* se caracteriza por una preocupación con delirios que se organizan alrededor de un tema. Suele ir acompañada de alucinaciones auditivas, como escuchar voces imaginarias, relacionadas con el mismo tema delirante. Este subtipo de esquizofrenia es el más frecuente y el que mejor pronóstico tiene. Está caracterizado por un primer brote más agudo y una tendencia a aparecer más tarde en el tiempo. Suelen ser pacientes tensos, desconfiados, cautelosos y reservados presentando comportamientos hostiles o agresivos.

En los casos de *esquizofrenia desorganizada*, cuyas características son la falta de expresión emocional junto con una conducta desorganizada y verbo incoherente. Esta forma de esquizofrenia empeora progresivamente, sin que se observen remisiones significativas. Se caracteriza por un lenguaje y comportamiento desorganizado, siendo su inicio temprano y predominando los síntomas negativos de la enfermedad. Apenas existe un contacto con la realidad teniendo una alteración notable del pensamiento. En general, esta clase de pacientes descuidan su apariencia personal y su conducta social y sus respuestas, a menudo, son inapropiadas.

Un tercer tipo frecuente es la *esquizofrenia catatónica*, caracterizada por particularidades del movimiento voluntario, como inmovilidad y estupor (catatonía), muecas y posturas extrañas, y repetición sin sentido de palabras o frases. Es bastante raro encontrarla y está marcada por una alteración de las funciones motoras que puede traducirse en periodos de estupor, negativismo, rigidez o agitación.

Los pacientes que no cumplen los criterios para los subtipos de esquizofrenia anteriores se engloban en el tipo indiferenciado.

1.1.2. Bases biológicas de la esquizofrenia

1.1.2.1. Genes y ambiente

La identificación de las causas de la esquizofrenia es uno de los mayores desafíos que se le plantean en la actualidad a la investigación psiquiátrica.

La esquizofrenia posee un alto componente genético. Son diversos los estudios que han demostrado un carácter hereditario de la esquizofrenia, como por ejemplo el publicado por Sullivan y colaboradores en 2003 que concluye que este factor tiene un

peso del 80%. En general, los familiares de primer grado de pacientes con esquizofrenia tienen un 3-7% de probabilidades de sufrir la enfermedad, un 5-10% más que los familiares de la población general.

La primera prueba directa de que los genes son importantes en el desarrollo de la esquizofrenia la proporcionó en 1930 Franz Kallmann al descubrir que la incidencia de la enfermedad era constantemente del 1%, incluso cuando los factores sociales y ambientales variaban de manera considerable. Observó, sin embargo, que la incidencia entre padres, hijos y hermanos de los pacientes era de un 15%, lo que apoya que la enfermedad tenía un carácter familiar (Figura 1.1).

Este trastorno está caracterizado por su heterogeneidad genética, herencia no-mendeliana y penetrancia incompleta, es decir, que la proporción de individuos que presentan un genotipo causante de la enfermedad y que expresan el fenotipo patológico es inferior al 100% (Pulver, 2000).

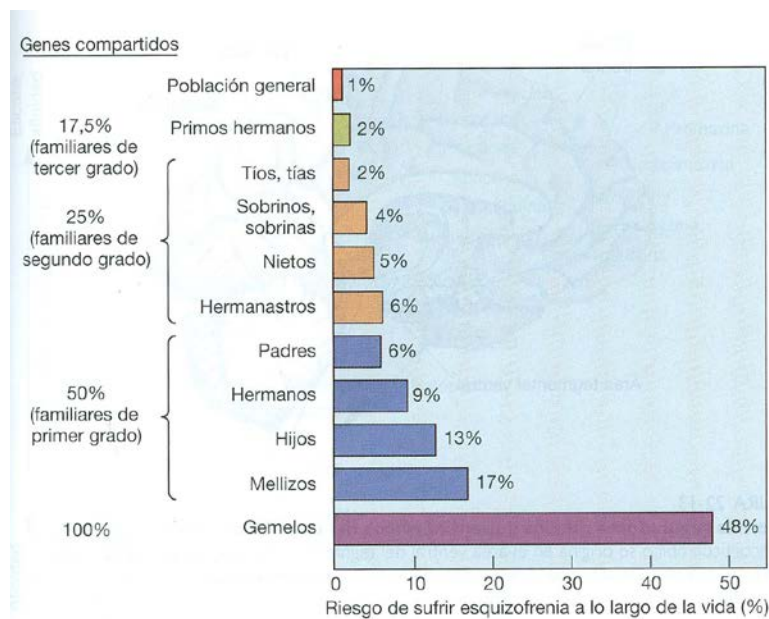


Figura 1.1. Naturaleza familiar de la esquizofrenia. El riesgo de sufrir la enfermedad aumenta con el número de genes compartidos, lo que sugiere una base genética para la enfermedad (Modificado de Gottesman, 1991).

La búsqueda de genes candidatos es difícil debido a la heterogeneidad clínica y genética de los enfermos. Actualmente, para tratar de comprender el peso del componente genético de la esquizofrenia se plantean dos modelos diferentes. El modelo enfermedad común-variante común (*Common disease-common variant* ó CD-

CV) se basa en estudios de asociación del genoma entero (más conocidos como GWAS: *genome-wide association studies*) de cientos de miles de polimorfismos de nucleótido único o SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) y propone que la enfermedad es causada por un gran número de variantes y que cada una de ellas sólo causa un efecto muy pequeño. Por el contrario, el modelo enfermedad común-variante rara (*common disease-rare variant* ó CD-RV) postula que un número copias de variantes (CNVs ó *Copy Number Variatons*: segmentos de ADN con duplicaciones o deleciones) raras pero penetrantes juega un papel primordial en la susceptibilidad de padecer esquizofrenia.

Uno de los genes que en más ocasiones se ha asociado a la esquizofrenia en estudios de GWAS es el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC o *major histocompatibility complex*). Este complejo lo componen una familia de genes que están involucrados en la presentación de antígenos del sistema inmune y se ha llegado a estudiar a nivel de sinaptosomas, en sinapsis de la corteza visual y en ratones en etapa prenatal (Chacon y Boulanger, 2013). Otras asociaciones interesantes que han sido fruto de esta clase de estudios son las del receptor de dopamina D2, que es una de las dianas de los fármacos antipsicóticos, y diversos genes involucrados en la neurotransmisión glutamatérgica y plasticidad sináptica, como el receptor metabotrópico de glutamato 3 y las subunidades 1A y 2A del receptor ionotrópico NMDA.

Los estudios genéticos que trabajan con el modelo CD-RV han relacionado varios genes con la esquizofrenia. El primer cambio observado es una traslocación entre el cromosoma 1 y 11 en población escocesa (Millar y cols., 2000) y que da lugar a una disrupción en un gen del cromosoma 1, conocido como *Disrupted in Schizophrenia-1* (DISC-1). Posteriormente, este gen se ha estudiado más a fondo observando los alelos de sus diferentes SNPs y se ha sugerido que la proteína DISC-1 actúa como andamio en el desarrollo cerebral, la neurogénesis, la migración neuronal y las sinapsis (Brandon y Sawa, 2011). También se han asociado con la esquizofrenia genes que forman parte del citoesqueleto como son las proteínas PSD-95 (*Post Synaptic Density 95*) y ARC (*cytoskeleton-associated scaffold*) y los canales de calcio dependientes de voltaje.

Además de estas mutaciones puntuales, son numerosas las duplicaciones y deleciones de regiones cromosómicas (CNVs) que se han asociado a la esquizofrenia, algunas de ellas relacionadas con los receptores NMDA (Escudero y Johnstone, 2014).

Sin embargo, no se puede inferir una base genética de la esquizofrenia solamente por el aumento de su incidencia dentro de las familias. No todos los trastornos que tienen un carácter familiar son necesariamente genéticos; también la riqueza y la pobreza, los hábitos y los valores, presentan este carácter familiar.

Algunos modelos sugieren que al menos el 20-30% de la variabilidad observada en la esquizofrenia puede ser atribuible a los factores no-genéticos, ya que el entorno puede afectar a las experiencias de los pacientes, a su estado mental o a su calidad de vida.

1.1.2.2. Hipótesis dopaminérgica

El sistema dopaminérgico participa en procesos relacionados con la motivación, la recompensa y la capacidad de atención. Se divide en cuatro vías principales: vía nigrostriatal, tuberoinfundibular, mesolímbica y mesocortical. La vía mesolímbica, que establece conexión entre el área tegmental ventral (VTA) y el núcleo accumbens, está hiperactivada en la esquizofrenia y se ha relacionado con los síntomas positivos. La otra vía implicada en esta patología es la mesocortical, relacionada con la aparición de los síntomas negativos (Kandel y cols., 2000).

Según esta hipótesis, el origen de la enfermedad sería una alteración del sistema dopaminérgico, siendo los síntomas positivos provocados por una hiperactivación de este sistema, a diferencia de los negativos cuya etiología es una hipoactivación del sistema.

La hiperactivación del sistema dopaminérgico y su implicación en el desarrollo de los síntomas positivos de la esquizofrenia se han relacionado durante décadas gracias a evidencias farmacológicas indirectas (Carlsson y cols., 2001). Las anfetaminas, la cocaína o la L-DOPA (L-dihidroxifenilalanina) son sustancias que incrementan los niveles de dopamina en el cerebro y son capaces de inducir episodios psicóticos similares a los que ocurren en la esquizofrenia. Además, los fármacos antipsicóticos

disminuyen la actividad de este sistema, siendo efectivos en el tratamiento de los síntomas positivos. Por otro lado, estudios *in vivo* han demostrado que existen alteraciones en la corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia, pudiendo estar relacionadas con deficiencias en el sistema dopaminérgico (Lewis y González-Burgos, 2000; Abi-Dargham y cols., 2002).

1.1.2.3. Hipótesis glutamatérgica

Durante décadas la hipótesis dopaminérgica ha explicado la fisiopatología de los trastornos psicóticos pero posteriormente ha retomado importancia la llamada hipótesis glutamatérgica. Es bien conocido que el bloqueo de los receptores glutamatérgicos NMDA (N-Metil-D-Aspartato) por sustancias como la fenciclidina o la ketamina produce síntomas psicóticos (Javitt y Zukin, 1991). La fenciclidina (PCP) se empleaba como anestésico pero los ensayos en humanos fracasaron porque ciertos pacientes sufrieron efectos adversos postoperatorios, como alucinaciones o paranoias semejantes a los que se producen en esquizofrenia (Krystal y cols., 1994; Lathi y cols., 2001).

La PCP es un antagonista de los receptores de glutamato NMDA, que son los encargados de regular la entrada de calcio y de otros cationes a la neurona. Tras la administración de PCP, se desarrollan síntomas similares a los observados en la esquizofrenia y una sola administración incrementa la liberación de dopamina en el sistema mesolímbico y en la corteza prefrontal. Tras la administración crónica del fármaco durante tres semanas, los niveles de dopamina siguen siendo elevados en áreas mesolímbicas, como el núcleo accumbens, mientras que descienden en la corteza, a la vez que aparecen los síntomas negativos y la disfunción cognitiva características de la esquizofrenia. Se ha propuesto que este fenómeno puede deberse a la conexión funcional existente entre los sistema glutamatérgico y dopaminérgico. Una disminución de la actividad del sistema glutamatérgico en la corteza provocaría un incremento de los niveles de dopamina en zonas límbicas dando lugar a los síntomas positivos de la esquizofrenia. Al mismo tiempo en la corteza prefrontal disminuirían los niveles de dopamina asociados a los síntomas negativos (Erhardt y cols., 2007).

Esta hipótesis ha dado lugar a un gran número de estudios con modelos animales. Los más utilizados son que han observado que la administración de antagonistas del receptor glutamatérgico NMDA induce fenotipos asociados a la esquizofrenia como por ejemplo hiperlocomoción, discapacidades sensomotoras, cognitivas y sociales (Hu y cols., 2015).

1.1.3. Fármacos utilizados en el tratamiento de la esquizofrenia

El desarrollo de fármacos para el tratamiento de la esquizofrenia ha mejorado en gran medida la calidad de vida de los pacientes. Además, también ha aportado conocimiento sobre la etiología de la enfermedad (Kane y McGlakashan, 1995). No obstante, un alto porcentaje que casi alcanza el 80% de los pacientes abandonan el tratamiento antes de finalizarlo y tres cuartas partes de este grupo sufre recaídas que requieren hospitalización (Gianfrancesco y cols., 2006). Los pacientes mejoran considerablemente cuando existe una combinación de terapias farmacológicas junto con otro tipo de aproximaciones de carácter social y emocional.

En la actualidad se distinguen dos grandes grupos de fármacos antipsicóticos. Los antipsicóticos típicos donde se incluye la clorpromazina y el haloperidol y los antipsicóticos atípicos o de segunda generación, de desarrollo más reciente.

Los neurolépticos convencionales (antipsicóticos típicos), como la clorpromazina y el haloperidol, actúan sobre los receptores dopaminérgicos D₂. Estos fármacos reducen los síntomas positivos de la esquizofrenia en la mayoría de los pacientes. Sin embargo, tienen numerosos efectos adversos que se relacionan con sus acciones en las aferencias dopaminérgicas que van desde la sustancia negra al estriado (vía nigrostriatal). Los efectos del bloqueo de los receptores dopaminérgicos en estriado son similares a algunos síntomas de la enfermedad de Parkinson, como la rigidez, el temblor y la dificultad para iniciar los movimientos, conocidos como síntomas extrapiramidales. El tratamiento crónico con neurolépticos convencionales también puede causar la aparición de discinesia tardía, que son movimientos involuntarios de labios y mandíbula. Muchos de estos efectos secundarios se evitan utilizando antipsicóticos atípicos como la clozapina o la risperidona, ya que no actúan exclusivamente sobre los receptores dopaminérgicos del estriado. Estos fármacos,

actúan sobre receptores D₂ y serotoninérgicos, siendo más eficaces frente a los síntomas negativos de la esquizofrenia.

La clozapina, al ser un antipsicótico atípico de amplio espectro, actúa sobre los receptores dopaminérgicos y, fundamentalmente, los serotoninérgicos. A dosis terapéuticas presenta un 80% de ocupación de los receptores de serotonina 5-HT_{2A} y entre un 30 y 50% de los receptores dopaminérgicos D₂. Este fármaco es capaz de mejorar los síntomas negativos y aspectos importantes de la vida cotidiana de los pacientes, mejorando ciertos aspectos cognitivos como la fluidez verbal (Flórez, 2009).

1.2. LIBERACIÓN DE NEUROTRANSMISORES

La comunicación entre las neuronas del sistema nervioso central se basa en la transmisión sináptica mediante los neurotransmisores. Estos se sintetizan y almacenan en las vesículas, para ser liberados al espacio extracelular.

Cuando un potencial de acción alcanza la terminación de una neurona, se estimula la liberación de un transmisor químico por la célula. Para descargar el neurotransmisor que contienen, las vesículas se desplazan hacia la membrana plasmática de la neurona, un proceso conocido como exocitosis (Kandel y cols., 2000).

La exocitosis o liberación de neurotransmisores se divide en cinco pasos diferentes. En primer lugar, las vesículas se dirigen al botón sináptico en una fase llamada acoplamiento. Después, las vesículas maduran y se inicia la fusión de la membrana de la vesícula sináptica con la membrana plasmática (cebado o *priming*). La fusión o exocitosis requiere la deformación de ambas membranas permitiendo la liberación del contenido de la vesícula a la hendidura sináptica. Tras estos pasos, la membrana vesicular se recicla (endocitosis) y se regenera (reciclado) (Südhof y Rizo, 2011).

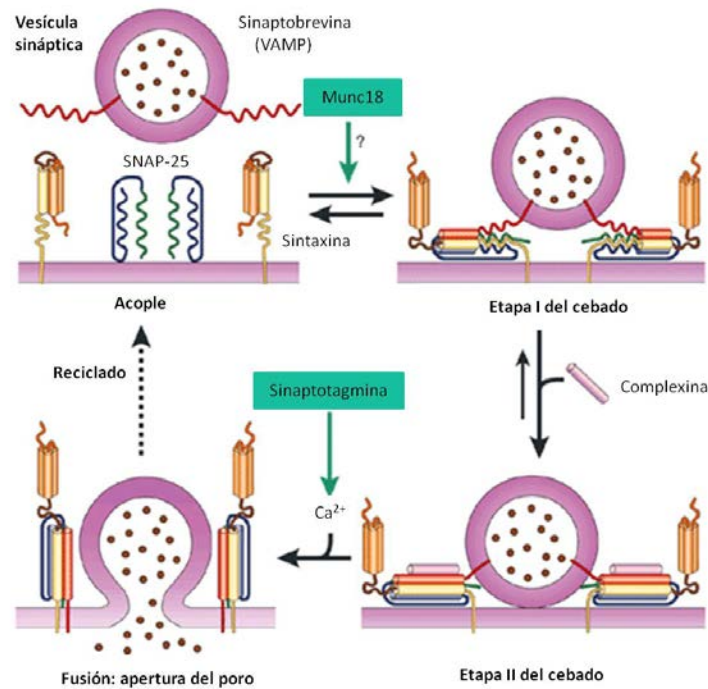


Figura 1.2. Modelo de liberación de neurotransmisores (modificado de Rizo y Südhof, 2002).

La aproximación de las membranas lipídicas de la vesícula y de la célula requiere del acercamiento forzado mediante una serie de proteínas, para que sea posible el intercambio de las moléculas de fosfolípidos (Figura 1.2). Dentro de estas proteínas presinápticas que permiten la fusión se encuentran las proteínas de la familia SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor*) y las proteínas SM (Sec/Munc). El descubrimiento de estos motores moleculares dio origen a una hipótesis para tratar de explicar el proceso de regulación de la liberación de neurotransmisores a la hendidura sináptica (Söllner y cols., 1993).

1.2.1. Proteínas presinápticas

Las proteínas presinápticas participan en la exocitosis, convirtiéndola en un proceso de fusión de membranas ampliamente regulado y realizan las siguientes funciones: inmovilizar las vesículas, dirigir las vesículas liberadas hacia la zona activa, contener las vesículas dirigidas hacia dicha zona y propiciar la fusión y exocitosis (Kandel y cols., 1997).

Entre las muchas proteínas que tienen un papel en la liberación de neurotransmisores se encuentran las proteínas que forman el complejo SNARE, las que pertenecen a la familia de las SM (Sec/Munc) y las proteínas sensores del calcio.

Tras el desplazamiento de una vesícula hasta su lugar de liberación se produce un complejo grupo de interacciones entre las proteínas de la membrana de la vesícula sináptica y las proteínas de la membrana presináptica. Estas interacciones parecen completar el acoplamiento de las vesículas y su preparación para fusionarse en respuesta a la entrada de Ca^{2+} .

1.2.1.1. Proteínas SNARE

Las proteínas SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*) gobiernan la mayoría de los procesos de tráfico en las membranas y su principal característica es que poseen secuencias conocidas como motivos SNARE (Rizo y Rosenmund, 2008). Estas moléculas son componentes esenciales de la maquinaria molecular que dirige la fusión de membranas en la exocitosis. La fusión de membranas, sin embargo, está sujeta a una regulación meticulosa por varias proteínas presinápticas.

James Rothman propuso una hipótesis para explicar el mecanismo por el cual las vesículas sinápticas se acoplan a la membrana plásmica pudiendo, así, liberar los neurotransmisores. Según esta hipótesis las diversas proteínas integrales específicas de la membrana vesicular (v-SNARE) se unen a proteínas receptoras específicas localizadas en la membrana de actuación (t-SNARE) (Rothman, 1994).

En el cerebro se han identificado dos tipos de proteínas t-SNAREs: la syntaxina, una proteína integral de la membrana terminal, y la SNAP-25, una proteína de la membrana periférica de 25 kDa. En la vesícula sináptica, la proteína integral de membrana VAMP (o sinaptobrevina) ha sido identificada como v-SNARE (Kandel y cols, 2000).

1.2.1.2.1. Syntaxina-1A

La syntaxina-1 es una proteína de membrana que pesa aproximadamente 34 kDa y posee 3 dominios: el dominio H_{abc} que es el que interacciona con la munc18-1, el

dominio C-terminal que se divide a su vez en tres (H3a, H3b y H3c) siendo el H3a el que interacciona con SNAP-25 y sinaptobrevina para la formación del complejo SNARE y un dominio que une los otros dos llamado enlace (Figura 1.3).

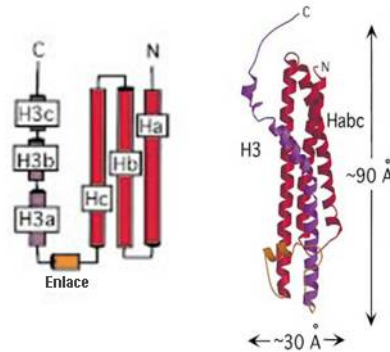


Figura 1.3. Topología (izquierda) y representación tridimensional de la estructura (derecha) de sintaxina-1A (modificado de Misura y cols., 2000).

Esta proteína es capaz de plegarse a nivel del motivo SNARE. Dependiendo de la posición de su dominio H_{abc} la sintaxina-1A varía su conformación entre abierta y cerrada (Fernández y cols., 1998) (Figura 1.4).

El extremo amino terminal de sintaxina-1 que interacciona con munc18-1 es esencial para que se pueda llevar a cabo la fusión de las tres proteínas que conforman el complejo SNARE *in vivo* (Rizo y Südhof, 2012).

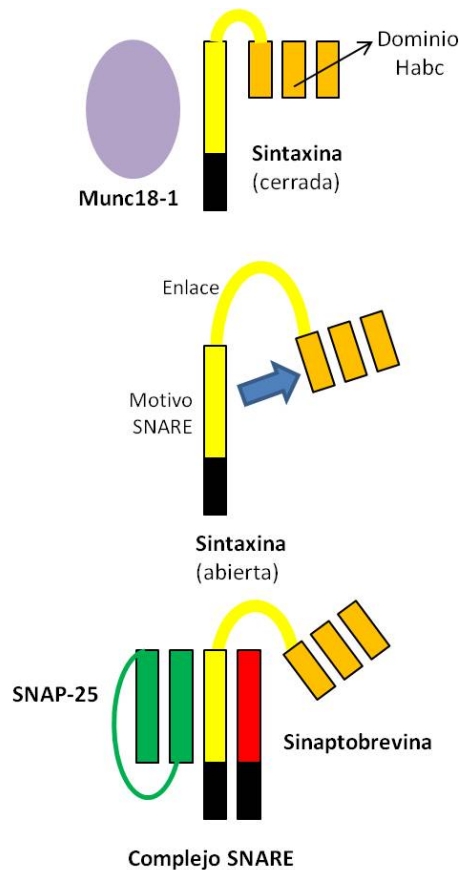


Figura 1.4. Esquema de las distintas conformaciones de la proteína sintaxina-1A: cerrada interactuando con munc18-1 (arriba), abierta (medio) y formando el complejo SNARE (abajo).

En estudios realizados con cultivos celulares de ratones *knock-out* de sintaxina-1A, se observó que dichas neuronas poseían una transmisión sináptica normal. Además, los animales que carecen de esta proteína presentaron una transmisión sináptica normal (Mishima y cols., 2012) lo que sugiere que la sintaxina-1A no es una proteína esencial en la transmisión sináptica. En dicho estudio, el contenido proteico de la isoforma B de sintaxina no varió y tampoco la expresión de otras proteínas presinápticas analizadas, por lo que se sugirió que sintaxina-1B compensaba las funciones en ausencia de la isoforma A (Fujiwara y cols., 2006).

El grupo de Gerber en 2008, también creó unos ratones que carecían de sintaxina-1A y observó que no había diferencias en cuanto a la supervivencia frente a sus controles homónimos. En estos animales, se producía una disminución en los niveles de munc18-1 pero no en otras proteínas presinápticas.

1.2.1.2.2. SNAP-25

La proteína SNAP-25 (*SyNaptosomal-Associated Protein-25*), de un tamaño de 25 kDa, es uno de los componentes del complejo SNARE, y se ha propuesto como marcador de especificidad de la fusión de las membranas. Ejecuta directamente la formación del complejo SNARE que atrae la vesícula sináptica a la membrana plasmática (Rizo y Südhof, 2002).

SNAP-25 es una proteína anclada a la cara citosólica de la membrana plasmática a través de cadenas laterales palmitoil del centro de la molécula. Esta proteína proporciona dos hélices α a la formación del complejo SNARE, que se forma con cuatro de estas secuencias; interactúa con el dominio C2B de la proteína sinaptotagmina y en las sinapsis glutamatérgicas disminuye la respuesta al calcio (Verderio y cols., 2004).

La delección heterocigota del gen que codifica la proteína SNAP-25 en animales da lugar a un fenotipo similar al trastorno de déficit de atención con hiperactividad (TDAH). En estos roedores, se observó una disminución de la hiperactividad tras el tratamiento con dextroanfetamina. La delección completa del gen es letal. Estudios posteriores han sugerido que algunas mutaciones en el gen de SNAP-25 pueden predisponer a sufrir TDAH (Brophy y cols., 2002; Mill y cols., 2002).

1.2.1.2.3. Sinaptobrevina

Las sinaptobrevinas son pequeñas proteínas plasmáticas con un peso aproximando de 18 kDa y que forman parte de la familia VAMP (*Vesicle-Associated Membrane Protein*) (Baumert y cols., 1989; Bock y Scheller, 1999; Ernst y Brunger, 2003). La proteína sinaptobrevina contiene 166 aminoácidos. De las tres proteínas que forman el complejo SNARE, es la única que está situada en la vesícula, por lo que es una v-SNARE (Bonifacino y Glick, 2004). Se han encontrado 8 subtipos de esta proteína, siendo VAMP-1 y VAMP-2 los únicos subtipos descritos en el cerebro de mamíferos.

Las isoformas homólogas de sinaptobrevina, 1 y 2, exhiben patrones de expresión diferentes en neuronas adultas: la sinaptobrevina-1 se expresa en médula espinal, especialmente en las motoneuronas y los terminales nerviosos motores de la

transmisión neuromuscular, mientras que la expresión de sinaptobrevina-2 se centra en las sinapsis cerebrales.

La sinaptobrevina-1 juega un papel crucial en la transmisión sináptica neuromuscular. Una ausencia completa de esta proteína es letal ya que los animales carentes de ella mueren a las tres semanas de nacer, indicando que sinaptobrevina-1 es esencial para la supervivencia. Además estos animales, denominados *Syb1^{lew/lew}*, muestran un fenotipo “debilitado” ya que sufren problemas motores e inmovilidad (Nystuen y cols., 2007). La actividad espontánea de estos ratones es más reducida, así como la transmisión sináptica y la probabilidad de liberación en las uniones neuromusculares. La pérdida de sinaptobrevina-1 induce una desincronización en la liberación de neurotransmisores, demostrando lo que sugiere que es una proteína esencial para una transmisión sináptica dependiente de calcio en las sinapsis neuromusculares (Liu y cols., 2011).

1.2.1.2. Proteínas pertenecientes a la familia de las SM (Sec/Munc)

Las proteínas SM se descubrieron en organismos como la levadura y el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*). Estas proteínas citosólicas conservadas son esenciales para que las proteínas SNARE puedan formar el complejo; sin una u otra, la fusión no ocurre fisiológicamente dando lugar a un fenotipo letal (revisado de Toonen y Verhage, 2003). Esta familia está compuesta por proteínas citosólicas altamente conservadas de aproximadamente 600 residuos aminoacídicos y se componen de tres lóbulos que forman una estructura parecida a un arco. Aunque en sus estudios iniciales con *munc18-1*, Hata y cols en 1993 ya sugirieron que estas proteínas eran fundamentales para la exocitosis, la importancia de las proteínas SM fue cuestionada durante más de una década.

Se sabe que las proteínas pertenecientes a esta familia regulan el ensamblaje del complejo SNARE pero que también poseen un papel en el acoplamiento de las vesículas a la membrana (Voets y cols., 2001). Son variadas las funciones que se les han atribuido a estas proteínas pero, a día de hoy, todavía no están claras.

Dos circunstancias contribuyen al desconocimiento de la función de las proteínas SM. En primer lugar, las proteínas SNARE pueden inducir la fusión de liposomas sin ayuda de las proteínas SM; y en segundo lugar, la bioquímica de la interacción entre ambos grupos de proteínas es difícil de esclarecer.

1.2.1.2.1. *Munc18-1*

La proteína *munc18-1* forma parte de la familia de las proteínas SM y, al igual que las proteínas SNARE, es crucial para el tráfico vesicular (Südhof, 2004; Verhage y Toonen, 2007; Rizo y Rosenmund, 2008). *Munc18-1* (acrónimo de *Mammalian UNCoordinated-18*) es una proteína homóloga a la *unc-18* de *C.elegans*. Esta proteína ha sido identificada como un componente esencial para la fusión de vesículas y su papel es crucial para la exocitosis de neurotransmisores en neuronas y en células neuroendocrinas (Zilly y cols., 2006; Han y cols., 2010; Rickman y Duncan, 2010). Está formada por 20 hélices α y 13 hojas β (Figura 1.5). Presenta dos isoformas (*munc18-1a* y *munc18-1b*) debido a un proceso de *splicing* alternativo de un único gen.

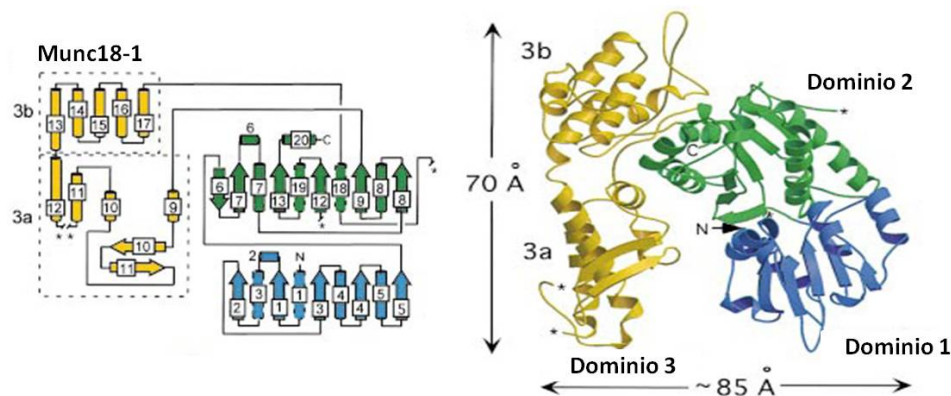


Figura 1.5. Topología (izquierda) y representación tridimensional de la estructura (derecha) de *munc18-1* (modificado de Misura y cols., 2000).

La isoforma *munc18-1a* está formada por 603 aminoácidos mientras que la isoforma *munc18-1b* tiene 594 aminoácidos presentando gran similitud entre ambas. Estas dos isoformas se han identificado en tejido tanto de rata como de humano a un peso de ~ 75 kDa mediante la técnica de Western Blot. La isoforma *munc18-1a* está

presente en retina y cerebro mientras que la isoforma munc18-1b posee una expresión ubicua (García y cols., 1995; Swanson y cols., 1998).

La proteína munc18-1 interacciona con syntaxina y forma un complejo llamado syntaxina/munc18. Se ha demostrado que este complejo regula la formación del anclaje de la vesícula a la membrana plasmática, proceso mediado por sinaptobrevina, SNAP-25 y syntaxina (Pevsner y cols., 1994). La munc18-1 tiene multitud de funciones en el proceso excitotóxico (Burgoyne y cols., 2009): promueve directamente la estabilidad de la syntaxina y controla espacialmente el correcto plegado de los complejos SNARE, actuando, así, como un componente directo de la maquinaria de exocitosis interaccionando con las proteínas SNARE (Diao y cols., 2010). El hecho de que la munc18-1 se una estrechamente a syntaxina-1 sugiere que munc18-1 está funcionalmente acoplada a las proteínas SNARE y forma parte de la maquinaria de fusión de manera esencial (Hata y cols., 1993; Poirier y cols., 1998). Esta interacción sólo tiene lugar cuando syntaxina-1 está en su conformación cerrada (Dulubova y cols., 1999) dificultando la formación del complejo SNARE. Se ha postulado que si syntaxina-1 está interaccionando con munc18-1 se inhibe la formación del complejo y la consecuente liberación de neurotransmisores, ya que munc18-1 estabiliza la conformación cerrada de syntaxina-1A (Chen y cols., 2008) y dificulta la formación del complejo SNARE (Burkhart y cols., 2008; Ma y cols., 2011). No obstante, el mecanismo que subyace a la interacción entre munc18-1 y syntaxina-1 todavía no está claro (Han y cols., 2010; Rathore y cols., 2010; Hu y cols., 2011).

La delección de munc18-1 conduce a un defecto en el anclaje de las vesículas a la membrana (Toonen y cols., 2005). Además, la ausencia de esta proteína es letal, ya que los ratones *knock-out* de munc18-1 presentan una pérdida total de transmisión sináptica y mueren inmediatamente después de nacer. No obstante, estos animales presentan un desarrollo morfológico del cerebro y unas conexiones sinápticas aparentemente normales (Verhage y cols., 2000). También se observa que estos animales presentan una reducción a nivel de las células cromafines (Voets y cols., 2001). Además, la proteína syntaxina-1A, pero no sinaptobrevina ni SNAP-25, está disminuida, demostrando una relevancia del complejo syntaxina/munc18 (Toonen y cols., 2005).

Recientemente se ha descrito que la ausencia de munc18-1 en neuronas serotoninérgicas implica una menor supervivencia de los animales muriendo la mayoría de ellos en los primeros días de vida. En los ratones heterocigotos para la proteína munc18-1 (Munc18-1^{+/-}) se ha observado una degeneración rápida del sistema serotoninérgico sugiriendo que este sistema es importante en la supervivencia postnatal (Dudok y cols., 2011).

1.2.1.2.1.1. Fosforilación de munc18-1a

La quinasa dependiente de ciclina-5 (*Cyclin-dependent kinase-5*, Cdk5) es capaz de fosforilar munc18-1 y regular la interacción con sintaxina-1A (Fletcher y cols., 1999). Esta quinasa serina/treonina es esencial para muchos procesos celulares, entre los que se encuentran la plasticidad sináptica (Barnett y Bibb, 2011) y la liberación de neurotransmisores (Kim y Ryan, 2010).

Otra proteína capaz de fosforilar munc18-1a es la proteína quinasa C (*Protein Kinase C*, PKC). Después de la llegada del potencial de acción al botón sináptico, los niveles de munc18-1 son altos y dispersos. Se requiere tanto la actividad de PKC como una entrada de calcio para volver al estado normal de la neurona (Cijssouw y cols., 2014).

1.2.1.3. Otras proteínas presinápticas: sensores de calcio

1.2.1.3.1. Sinaptotagmina

La sinaptotagmina (o p65) es una proteína integral de membrana de la vesícula sináptica. Contiene dos regiones (las regiones C2) homólogas a la región reguladora de la proteína quinasa C. Las regiones C2 se unen a fosfolípidos mediante un mecanismo dependiente de calcio (Figura 1.6). Esta propiedad sugiere que la sinaptotagmina se podría insertar en la bicapa fosfolipídica presináptica en respuesta a la entrada de Ca²⁺, actuando así como sensor de calcio para la exocitosis (Kandel y cols., 2000).

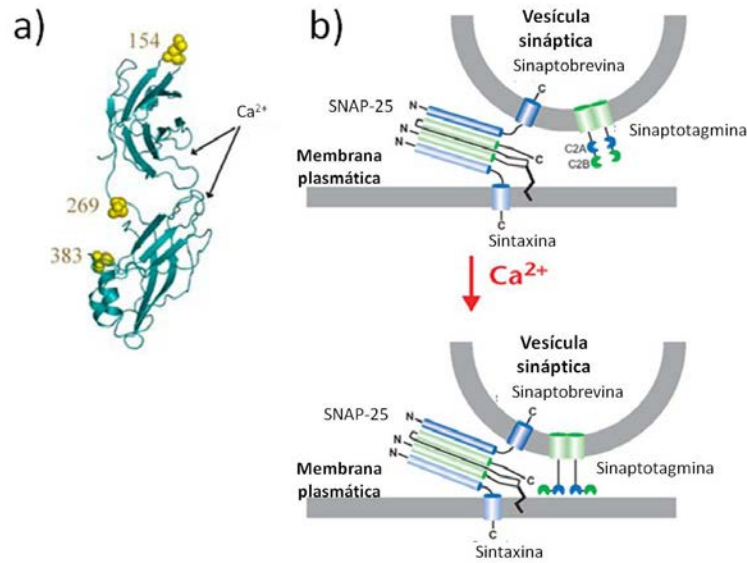


Figura 1.6. a) Representación tridimensional de la estructura de sinaptotagmina indicando lugares de unión al calcio. b) Papel que juega la sinaptotagmina en el anclaje de la vesícula a la membrana plasmática.

En base a su distribución cerebral y endocrina y a sus propiedades bioquímicas, los dominios C2 de algunas sinaptotagminas se unen al calcio. Entre las funciones que se han propuesto para estas proteínas están las de ser sensores de calcio en la regulación de la liberación de neurotransmisores y hormonas (Lang y Jahn, 2008). Aunque estas proteínas comparten una estructura similar de dominios y una alta homología entre sus dominios C2, no todas las sinaptotagminas se unen a calcio. De hecho, sólo 8 de las 15 existentes son capaces de hacerlo, y ello se debe a la falta de residuos de fijación de calcio o la orientación espacial de los residuos. Las sinaptotagminas que actúan como sensores de calcio están involucradas en el anclaje de la vesícula sináptica a través de SNAP-25 (Schiavo y cols., 1997) y la fusión con la membrana plasmática (O'Connor y Lee, 2002; Maximov y Südhof, 2005).

El dominio C2 está altamente conservado en diferentes especies y se divide en C2A y C2B. El primer dominio regula el proceso de fusión de la exocitosis (Fernández-Chacón y cols., 2001; Zimmerberg y cols., 2006). El otro dominio, C2B, se une a fosfatidil- inositol-3, 4, 5- trifosfato (PIP3) en ausencia de iones calcio y en su presencia lo hace a fosfatidilinositol bifosfato (PIP2). La interacción entre C2B y SNAP-25 es independiente de Ca^{2+} pero la fusión de las dos membranas no (Chapman, 2008).

Se han creado varios animales mutantes que carecen de sinaptotagmina para comprobar la función que desempeña esta proteína en la transmisión sináptica. Se han propuesto dos modelos para la función de esta proteína: de acuerdo con uno de los modelos, la sinaptotagmina actúa como una pinza de fusión o regulador negativo de la fusión (impidiendo la exocitosis en ausencia de Ca^{2+}). Según, esta hipótesis, la entrada de Ca^{2+} deshace rápidamente esta pinza y permite la liberación. Esta propuesta es atractiva porque los mismos mecanismos implicados en la fusión de la vesícula también actúan en la liberación constitutiva independiente de calcio externo. Este modelo está basado en resultados obtenidos en experimentos realizados con *Drosophila melanogaster* y con mutantes de nematodos que carecen de sinaptotagmina, en los que se observa una importante alteración de la transmisión sináptica en respuesta a un potencial de acción en el terminal presináptico (Koh y Bellen, 2003).

La segunda hipótesis es que la sinaptotagmina actúa como un regulador positivo de la liberación, facilitando de manera activa la fusión de la vesícula. Esta hipótesis está basada en la observación de que en el ratón mutante que carece de la sinaptotagmina se bloquea la transmisión sináptica rápida sin incremento en la liberación espontánea. Como en los mamíferos existen varias isoformas de sinaptotagmina, pero en los invertebrados sólo hay una isoforma, es posible que las diferentes isoformas de los mamíferos tengan funciones distintas: una puede mediar la liberación rápida regulada y otra puede controlar la liberación constitutiva (Kandel y cols., 2000).

1.2.1.3.2. Sinaptofisina

La sinaptofisina, también conocida como p38, es una glicoproteína de 38 kDa con cuatro dominios transmembrana. Está presente en las células neuroendocrinas y prácticamente en todos los tipos neuronales del cerebro y la médula espinal que participan en la transmisión sináptica. La sinaptofisina actúa como marcador de los tumores neuroendocrinos, y su ubicuidad en la sinapsis ha permitido su uso para la cuantificación de estos (Calhoun y cols., 1996).

La función exacta de la sinaptofisina es desconocida pero se sabe que interactúa con la proteína vesicular sinaptobrevina, la cual es esencial para la secreción de neurotransmisores, aunque en animales *knock-out* de sinaptobrevina, la sinaptofisina se sigue produciendo y funciona normalmente (McMahon y cols., 1996). Estudios recientes demuestran, sin embargo, que los ratones *knock-out* de sinaptofisina presentan un incremento en la actividad exploratoria, un deterioro en el reconocimiento de objetos y un aprendizaje espacial reducido (Schmitt y cols., 2009).

1.2.2. Formación del complejo SNARE

La fusión de membranas vesicular y plasmática en las neuronas se produce gracias a la formación del complejo SNARE, un complejo heterotrimérico altamente estable formado por la proteína vesicular sinaptobrevina y las proteínas de membrana SNAP-25 y syntaxina-1A (Söllner y cols., 1993; Rizo y Südhof, 2002; Südhof y Rothmand, 2009) (Figura 1.7).

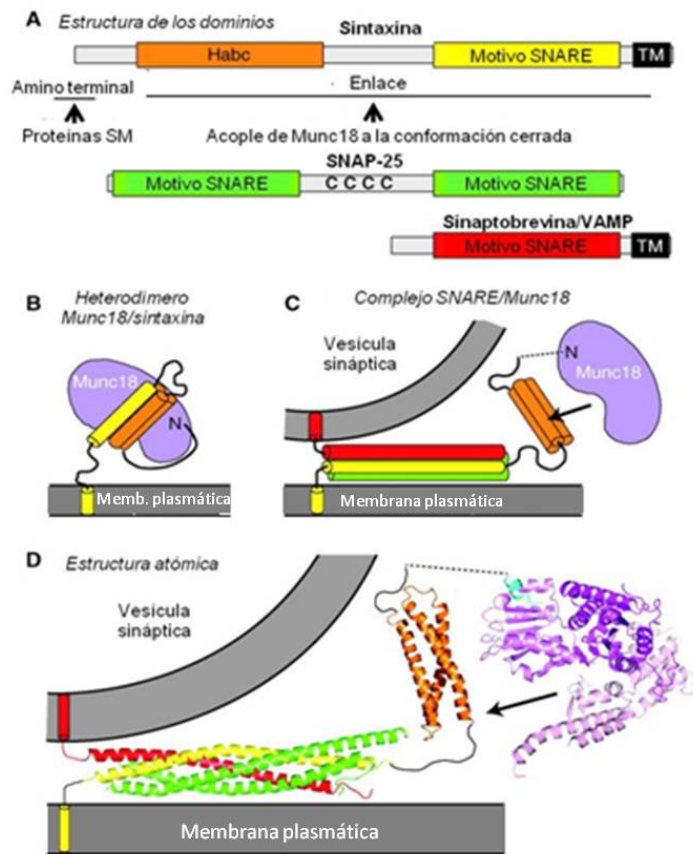


Figura 1.7. Estructuras de las proteínas SNARE y proteínas SM. A. Diagrama esquemático de la estructura de dominios de sintaxina, SNAP-25 y sinaptobrevina/VAMP (Habc, dominio Habc; TM: región transmembrana). B, C. Imagen de dos modos de interacción de la proteína de la familia SM Munc18 con las proteínas SNARE durante la exocitosis: Acople de Munc18 con la conformación cerrada de sintaxina-1 que oculta el motivo SNARE (B), y acople de Munc18 el montaje del complejo SNARE que depende del amino terminal de sintaxina-1 (C). La manera precisa del acople de Munc18 al complejo SNARE es desconocido, aparte del hecho de que el extremo amino terminal de sintaxina (Indicado con una N) está interactuando con Munc18; la flecha indica una interacción atómica de este enlace, que puede involucrar que Munc18 este envolviendo el bucle SNARE de manera análoga a cómo lo hace a la conformación cerrada de sintaxina (modificado de Südhof y Rothman, 2009). D. Estructuras atómicas del complejo SNARE completamente formado, el dominio H_{abc} de sintaxina y Munc18 delimitado por el amino terminal de sintaxina (azul), dibujado a escala. (Los datos de la estructuras provienen de Sutton y cols., 1998; Fernández y cols., 1998 y Hu y cols., 2011, respectivamente).

Las proteínas SNARE contienen una secuencia característica, el motivo SNARE, que contiene 60-70 residuos compuestos de 8 grupos de 7 repeticiones. La mayoría de estas proteínas poseen un solo motivo SNARE mientras que SNAP-25 y sus homólogas (SNAP-23, -29 y -47) incluyen dos motivos SNARE. Los cuatro motivos SNARE de las

proteínas que conforman el complejo se ensamblan en una estructura de cuatro hélices para formar el complejo.

La hipótesis SNARE surgió en 1994 de la mano de Rothmann y colaboradores como el primer modelo para explicar el proceso de fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática, diferenciando entre proteínas v-SNARE (las que están ancladas en la vesícula) y t-SNARE (proteínas ancladas a la membrana plasmática). En neuronas, la proteínas syntaxina-1 y SNAP-25 se identificaron como t-SNAREs y sinaptobrevina como v-SNARE (Rothmann y cols., 1994).

La evidencia de que las proteínas SNARE son esenciales para la fusión de membranas se basa en que estas proteínas se identificaron como diana de la toxina tetánica y de la toxina botulínica. Estas toxinas actúan como proteasas en el terminal sináptico, hidrolizando los enlaces peptídicos y bloqueando la fusión de membranas. La primera proteína identificada como diana de estas toxinas fue la sinaptobrevina (Link y cols., 1992; Schiavo y cols., 1992) y después las proteínas syntaxina-1 y SNAP-25. Posteriormente, se observó que estas tres proteínas formaban un complejo que se disociaba por acción del factor NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) al presentar actividad ATPasa, asignando así el nombre de proteínas SNARE (*Soluble NSF-Attachment protein Receptor*) (Toonen y Verhage, 2003).

El complejo SNARE consiste en un “paquete” de cuatro hélices paralelas que se forma gracias a los motivos SNARE de las tres proteínas. Ya que los motivos SNARE de syntaxina-1 y sinaptobrevina están adyacentes a sus regiones transmembrana, la posición paralela de las hélices indica que el complejo SNARE podría acercar la vesícula a la membrana plasmática (Sutton y cols., 1998; Rizo y Rosenmund, 2008).

Para el control de la formación del complejo SNARE es importante una región de syntaxina-1 llamada H_{abc}. En una proteína syntaxina aislada, este dominio se dobla hacia el motivo SNARE, teniendo una “conformación cerrada” que dificulta la formación del complejo SNARE. La unión de syntaxina-1A con munc18-1 impide que ésta participe en la formación del complejo SNARE (Hata y cols., 1993; Lang y Jahn, 1998). Por este motivo, se ha sugerido que la proteína munc18 es un inhibidor de la fusión de membranas (Wu y cols., 2001) (ver Figura 1.4).

1.2.3. Proteínas presinápticas y esquizofrenia

Como se ha comentado anteriormente, los aspectos que se consideran alterados a nivel del funcionamiento cerebral en la esquizofrenia son muy diversos pero muchos de ellos están relacionados con la liberación de neurotransmisores. Por ello se ha intensificado la investigación en este campo estableciéndose un mínimo de proteínas fundamentales para el anclaje, cebado (proceso activo también denominado *priming*) y fusión de las vesículas sinápticas a la membrana plasmática (Rizo y Südhof, 2002; Murthy y De Camilli, 2003; Südhof, 2004; Malsam y cols., 2008; Rizo y Rosenmund, 2008; de Wit, 2010).

Debido a que en los últimos años han aumentado los estudios que relacionan las proteínas presinápticas y la esquizofrenia (Honer y cols., 2002.; Harrison y Weinberger, 2005), se ha postulado la hipótesis de que la esquizofrenia podría ser una enfermedad de la propia maquinaria de liberación de neurotransmisores.

Entre los varios estudios que apoyan esta hipótesis están el del grupo de Sokolov y cols. en 2000 en el que observaron un aumento del ARNm que codifica proteínas presinápticas en individuos con esquizofrenia, lo que podría reflejar una actividad sináptica aumentada, mientras la disminución puede representar una reducción en función sináptica o conexiones neuronales.

Por otro lado, se ha propuesto una implicación de la munc18-1 en la patología esquizofrénica. Han sido varios grupos de investigación los que han observado un aumento de los niveles de expresión de dicha proteína en individuos con esquizofrenia. Concretamente, Behan y cols. publicaron un estudio de proteómica en 2009 en el que observaron un aumento significativo en los niveles de munc18-1 en muestras de tejido cerebral *postmortem* de individuos con esquizofrenia. Los autores sugieren que este incremento de munc18-1 podría disminuir la disponibilidad de sintaxina-1 para formar el complejo SNARE .

Las alteraciones en la munc18-1 y/o en las proteínas SNARE que conducen a una disfunción en la exocitosis, podrían contribuir a la patogénesis de la esquizofrenia, a través de las disfunciones del sistema dopaminérgico y glutamatérgico, la aberrante plasticidad sináptica (incluyendo los defectos del desarrollo del cerebro), y la

discapacidad de las funciones cognitivas (Goldman-Rakic y Selemon, 1997; Honea y cols., 2005; Eisenberg y Berman, 2010; Marek y cols., 2010). Se han obtenido resultados contradictorios sobre la expresión de las proteínas presinápticas en cerebros *postmortem* de individuos con esquizofrenia (revisado en Johnson y cols., 2008). Por ejemplo, tanto el ARNm como la expresión proteica de munc18-1 se observó incrementada (Gabriel y cols., 1997; Sokolov y cols., 2000), sin cambios (Gabriel y cols., 1997; Honer y cols., 2002; Halim y cols., 2003; Castillo y cols., 2010) o disminuida (Barakauskas y cols., 2010) en corteza y estriado de individuos con esquizofrenia. En el caudado ventromedial, la cantidad de syntaxina interaccionando con SNAP-25 fue superior, sugiriendo un incremento del complejo SNARE (Barakauskas y cols., 2010). Sin embargo, una menor cantidad de complejo SNARE se ha asociado con un déficit de la fosforilación de syntaxina-1 en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia ya que de esta forma no podría formarse el complejo (Castillo y cols., 2010). Además, estudios recientes realizados en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia han demostrado un incremento de munc18-1 (STXBP1, *syntaxin binding protein 1*) en microdominios de membrana de la sustancia gris (Behan y cols., 2009) y otros estudios han descrito una disminución de dicha proteína coinmunoprecipitada con syntaxina-1 (Castillo y cols., 2010). Por otro lado, la hipótesis sináptica de la esquizofrenia podría aportar información a los mecanismos de acción de los fármacos antipsicóticos (Marek y cols., 2010).

1.3. PROTEÍNAS RELACIONADAS CON ESQUIZOFRENIA

La esquizofrenia es una enfermedad compleja, también a nivel genético. Como se ha descrito anteriormente, este trastorno está caracterizado por tener heterogeneidad genética, herencia no mendeliana y penetrancia incompleta, es decir, que la proporción de individuos que presentan un genotipo causante de la enfermedad y que expresen el fenotipo patológico es inferior al 100% (Pulver, 2000). Por ello, los investigadores encuentran muchos impedimentos para definir su fenotipo, ya que el síndrome clínico conocido como esquizofrenia puede ser un proceso de enfermedad unitario con un rango de severidad y manifestaciones clínicas variable de un paciente a otro.

Las investigaciones a nivel familiar, gemelar o de adopción han establecido que existe un factor genético asociado con la susceptibilidad a padecer esquizofrenia (Pulver, 2000). El riesgo de padecer la enfermedad en familiares se correlaciona con el grado de genes compartidos (Lewis y González-Burgos, 2000). Con los estudios de ligamiento se han podido identificar varios *loci* para la susceptibilidad de la esquizofrenia y han concluido que aproximadamente diez regiones del genoma es probable que tengan genes susceptibles para padecer este trastorno. Estos esfuerzos se están dirigiendo al genotipo de un gran número de marcadores, incluyendo los ensayos de los polimorfismos de un único nucleótido (SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*) y desequilibrio de asociación (LD: *Linkage Disequilibrium*) basados en familiares ó muestras caso-control, y que han permitido identificar genes con alta probabilidad de ser candidatos involucrados en esquizofrenia (Gogos y Gerber, 2006).

1.3.1. DISC-1

La asociación entre el gen DISC-1 (*Disrupted In Schizophrenia-1*) y la esquizofrenia se ha observado en varios estudios (Millar y cols., 2000; Bellon, 2007) aunque también ha habido estudios negativos (Hodgkinson y cols., 2004; Legallic y cols., 2009). Aparte de ser un gen complejo, su participación en el desarrollo y en la plasticidad sináptica no está demasiado clara. La proteína DISC-1 está asociada con numerosas proteínas citoesqueléticas y podría estar involucrada en funciones como migración celular, crecimiento de neuritas, tráfico de receptores de membrana, funciones mitocondriales y, posiblemente, funciones de fosfodiesterasas (Gil-Pisa y cols., 2010).

La secuencia completa de DISC-1 consiste en dos regiones: un dominio N-terminal que abarca los aminoácidos 1-350 y una región C-terminal con los 350-854 aminoácidos que muestra una alta conservación (Figura 1.8). Esta proteína carece de estructura cristalizada y de actividad enzimática (Soares y cols., 2011).

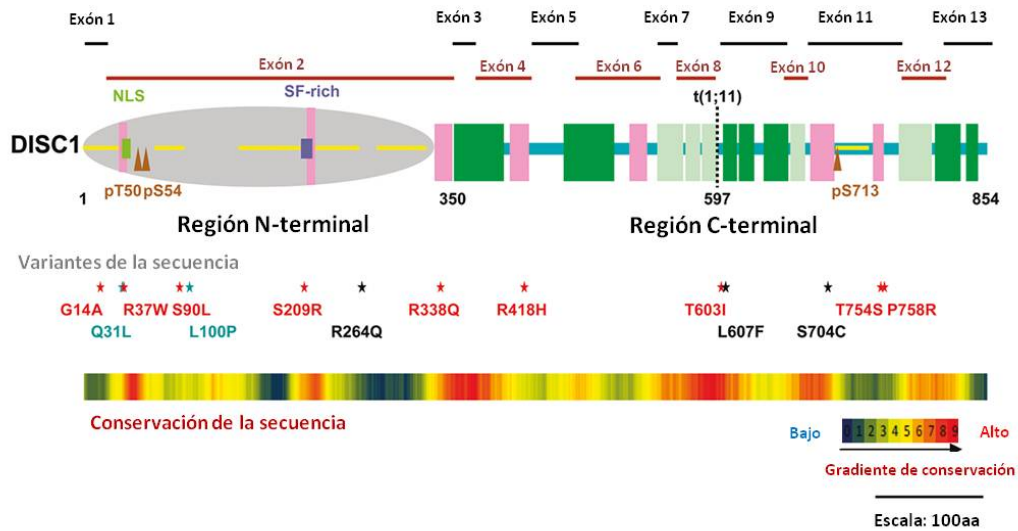


Figura 1.8. Esquema representativo de la estructura secundaria de la proteína DISC-1 (rosa, hélices α regulares; verde, hélices enrolladas; verde claro, hélices ambiguas, pueden ser regulares o enrolladas). Se indican mutaciones sin sentido en ratón (estrella azul), variantes comunes en humano (estrella negra) y mutaciones ultrararas en humano (estrella roja). En la parte inferior se muestra el grado de conservación entre secuencias ortólogas (Figura modificada de Soares y cols., 2011).

Las funciones biológicas atribuidas a la proteína DISC-1 son complejas y diversas (Steinecke y cols., 2012). Por ejemplo, se ha sugerido que esta proteína tiene un papel importante en la proliferación y diferenciación neuronal, el crecimiento de las neuritas y la formación de sinapsis, así como en la integración de nuevas neuronas en el hipocampo adulto (Brandon y cols., 2009). Existen también diversos estudios que apuntan a DISC-1 como un componente necesario para el correcto posicionamiento de las neuronas corticales (Young-Pearse y cols., 2010.; Balu y Coyle, 2011).

DISC-1 está involucrada en varias de las vías del neurodesarrollo, algunas de las cuales están alteradas en trastornos mentales (Figura 1.9). La red de proteínas que interactúan con DISC-1 es una posible diana para el estudio de futuros fármacos. Por ejemplo, se ha observado una alteración de los niveles de ARNm de DISC-1 tras tratar animales con los antipsicóticos atípicos olanzapina y risperidona. Además, el fenotipo depresivo y esquizofrénico de ratones mutantes de DISC-1 se revertía tras el tratamiento con bupropion o con antipsicóticos como haloperidol y clozapina, respectivamente (Clapcote y cols., 2007).

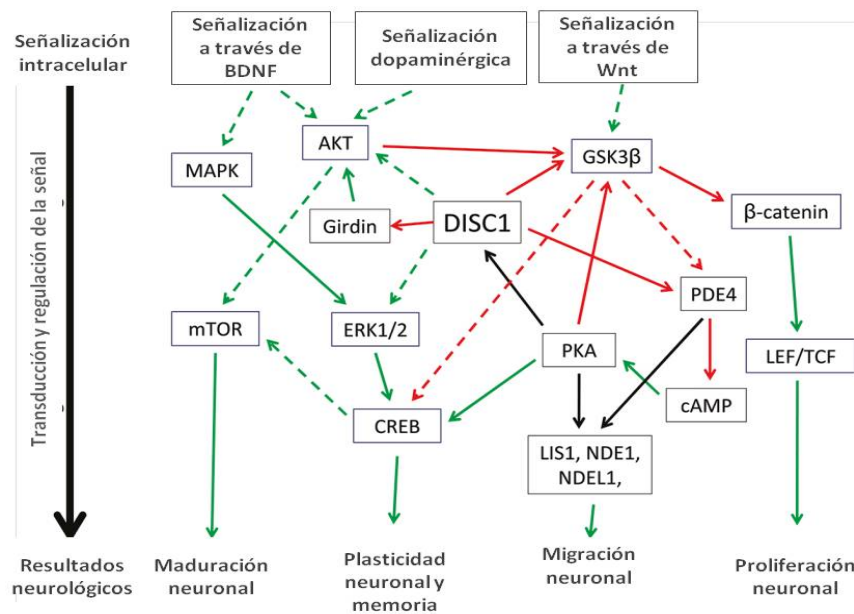


Figura 1.9. Vías de señalización neurológicamente relevantes influenciadas por la proteína DISC-1. Las flechas verdes representan activación de enzimas, o aumento de las funciones y en rojo se representa la inhibición o regulación a la baja. Las flechas negras representan las vías poco entendidas. Las flechas con línea discontinua indican efectos indirectos (Figura modificada de Soares y cols., 2011).

El grupo de Clapcote y colaboradores generó una mutación en el exón 2 de DISC-1 en ratón e identificó y caracterizó dos mutaciones sin sentido: Q31L y L100P (ver Figura 1.8) que se asociaban con comportamientos depresivo y esquizofrénico, respectivamente. Los animales que expresaban alguna de estas dos mutaciones poseían una disminución de la proliferación neuronal, una migración aberrante, una disminución de la densidad de espinas dendríticas y un menor volumen cerebral. Además, ambas mutaciones reducían la interacción de DISC-1 con proteínas como PDE4B y GSK3 (Clapcote y cols., 2007).

1.3.2. Neuregulina-1 y proteínas del dominio PDZ: Receptor ErbB4 y PSD-95

La señalización de neuregulina-1 y su receptor ErbB4 (NRG1-ErbB4) es un regulador esencial de la migración de las interneuronas corticales GABAérgicas durante el desarrollo del cerebro. Tanto en animales adultos que carecen de estas proteínas

como en los heterocigotos se ha observado una disminución de esta población de interneuronas (Flames y cols., 2004).

Esta señalización también afecta a diferentes niveles en la transmisión glutamatérgica. Es importante para la migración radial de las neuronas piramidales que se están diferenciando como proyecciones glutamatérgicas desde el tálamo dorsal a la corteza (López-Benito y cols., 2006).

El grupo de Tamalge alteró la señalización NRG1-ErbB4 generando un ratón heterocigoto para NRG1 y observó cambios en la plasticidad sináptica. Estos efectos provocaron alteraciones en los niveles de receptores NMDA y en el tráfico a través de los receptores AMPA. Por todas estas razones, esta señalización debe ser controlada finamente para no interferir en la plasticidad sináptica y no alterar los circuitos cerebrales (Tamalge, 2008).

1.3.2.1. Neuregulina-1

La neuregulina-1 (NRG1) es uno de los 20 genes que codifican ligandos para los receptores ErbB, siendo su principal diana el ErbB4. NRG1 es un gen largo y complejo que codifica 15-20 proteínas diferentes, que son generadas mediante procesos de *splicing* alternativo. Hasta la fecha, se han descrito tres familias (tipo I, II y III) presentes en todos los vertebrados y tres familias más pequeñas (tipo IV, V, VI) que sólo aparecen en primates (Tamalge, 2008).

Todas las variantes funcionales de NRG1 contienen un dominio EGF esencial para interactuar con los receptores ErbB. La variabilidad de este dominio tiene implicaciones funcionales pudiendo afectar a la afinidad de NRG1 por el receptor o a la eficiencia con la que los precursores transmembranales son procesados.

Debido a la amplia gama de isoformas de NRG1, esta proteína posee multitud de funciones (Figura 1.10) tanto durante el desarrollo como en la edad adulta. Se expresan en muchos tejidos, incluido el sistema nervioso central, y tienen efecto sobre la gliogénesis y la migración neuronal durante el desarrollo del cerebro y el sistema

nervioso adulto, teniendo un impacto en la expresión y activación de receptores entre los que se encuentran los receptores NMDA (Ibrahim y cols., 2000).

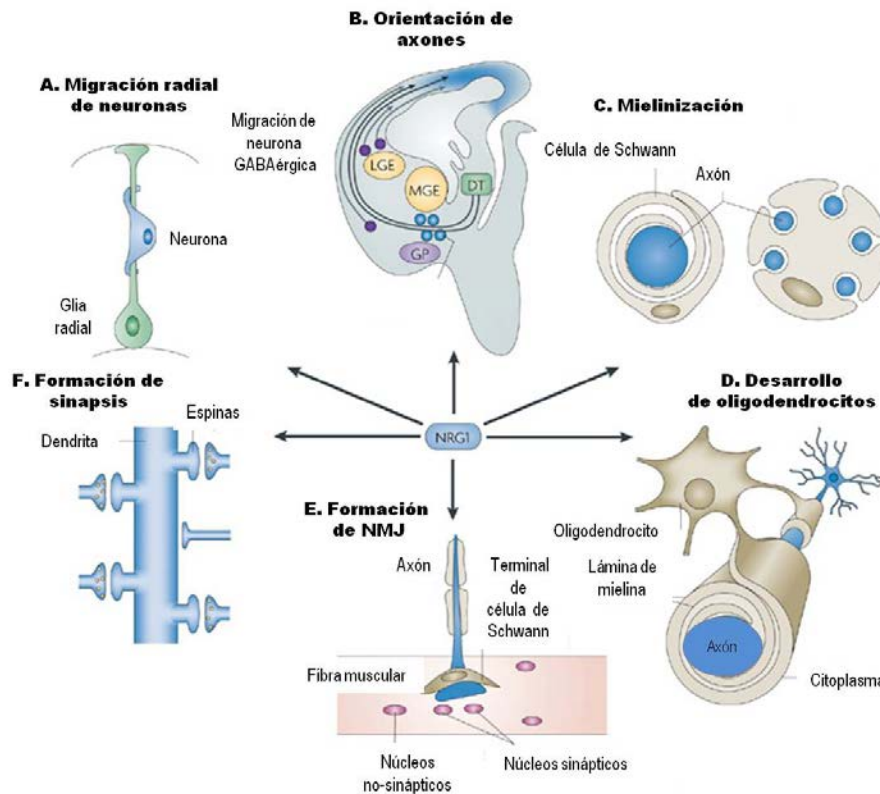


Figura 1.10. A. La neuregulina-1 es liberada por las neuronas para promover la formación y el mantenimiento de las células gliales radiales, que son necesarias para la migración radial de las neuronas desde las zonas ventriculares hasta la superficie del cerebro. B. La migración tangencial de interneuronas GABAérgicas requiere NRG1 en regiones corticales (DT, tálamo dorsal; GP, globo pálido; LGE, eminencia ganglionar lateral; MGE, eminencia ganglionar medial). C. La mielinización de los nervios periféricos están controlados por NGR1 que producen los axones. D. La NRG1 de los axones puede regular el desarrollo de oligodendrocitos y la mielinización de los axones en el sistema nervioso central. E. La NRG1 es necesaria para la formación de conexiones neuromusculares (*neuromuscular junctions* ó NMJs), probablemente a través de efectos sobre la diferenciación terminal de células de Schwann y la supervivencia. F. La NRG1 estimula la formación de sinapsis en el sistema nervioso central. Esta figura muestra sinapsis excitatorias típicas, formadas entre terminales glutamatérgicos y espinas (modificado de Mei y Xiong, 2008).

Tras estudiar 33 familias de Islandia, se identificó el gen de la proteína neuregulina 1, que se encuentra en el cromosoma 8p, como gen candidato para la susceptibilidad de sufrir esquizofrenia (Stefansson y cols., 2002). Las consecuencias funcionales de las variantes de este gen son todavía desconocidas. El gen de NRG1 codifica proteínas que están involucradas en varias funciones neuronales, desde la

supervivencia neuronal hasta la mielinización y la plasticidad sináptica (Gogos y Gerber, 2006).

1.3.2.1.1. Neuregulina-1 y esquizofrenia

Se ha propuesto que el gen NRG-1 tiene un papel importante en la patogénesis de la esquizofrenia. Se ha observado un vínculo entre la enfermedad y el cromosoma 8p en familias islandesas, mostrando también una conexión en otras poblaciones (Pulver y cols., 1995; Gurling y cols., 2001). Esta prueba se sostiene gracias a la asociación significativa de haplotipos coincidentes que contienen un único gen conocido, el NRG1.

La neuregulina-1 y sus receptores son proteínas esenciales para el desarrollo (Gassmann y cols., 1995). Los embriones que carecen de estas proteínas mueren en los días 10,5-11 de gestación o nada más nacer. Por el contrario, los animales heterocigotos (NRG1^{+/-}) son viables y viven hasta la edad adulta (Gerlai y cols., 2000) mostrando una hiperactividad en pruebas comportamentales como son el campo abierto o el laberinto en Y. Además, el tratamiento con el antipsicótico clozapina revierte este fenotipo, aunque no los déficits observados en la inhibición prepulso (PPI) (Stefansson y cols., 2002). También el número de receptores NMDA en ratones NRG1^{+/-} es menor, al igual que ocurre en cerebros de pacientes con esquizofrenia (Balu y Coyle, 2015). De este modo, estos resultados sugieren que las variantes del gen NRG1 podrían contribuir a la patogénesis en algunos pacientes con esquizofrenia, probablemente mediante una disminución de la señalización a través de NRG1. A pesar de todos estos datos, a día de hoy, se desconoce cómo contribuye la proteína NRG1 a la susceptibilidad de padecer esquizofrenia (Stefansson y cols., 2002).

1.3.2.2. Receptor ErbB4

El receptor ErbB4 es el principal receptor de NRG1 en neuronas del sistema nervioso central y colocaliza con los receptores glutamatérgicos NMDA formando complejos postsinápticos (García y cols., 2000) (Figura 1.11). En el sistema nervioso central las subunidades de NMDA, NR2A y NR2B se activan por fosforilación y esta modificación postranscripcional aumenta la actividad del receptor alterando las

propiedades cinéticas del canal. García y sus colaboradores en 2000 apuntaban la posibilidad de que la activación dependiente de los receptores ErbB4 y su activación por NRG1 podía regular la plasticidad sináptica reclutando tirosina quinasas que regulan la función del receptor NMDA. Así, la proteína NRG1 podría actuar sobre la expresión, localización y fosforilación de las subunidades de los receptores NMDA facilitando la transmisión glutamatérgica. Por tanto, los efectos dependientes de actividad de NRG1 y ErbB4 en la eficiencia de la transmisión glutamatérgica pueden ser un mecanismo de plasticidad sináptica.

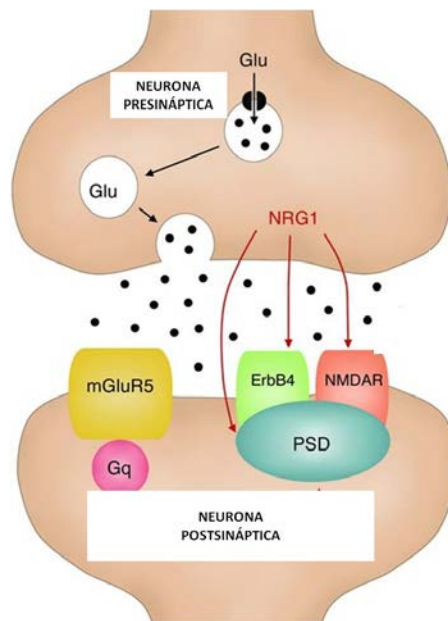


Figura 1.11. Representación esquemática de una sinapsis glutamatérgica. La NRG1 está presente en vesículas sinápticas glutamatérgicas, regulando la expresión de receptores NMDA, activando los receptores ErbB4 e interactuando con PSD (Figura modificada de Owen y cols., 2004).

El receptor ErbB4 no sólo se expresa en el sistema nervioso durante el desarrollo, sino que también lo hace en el cerebro adulto donde forma parte del complejo PSD. Estos datos sugieren que la señalización por NRG1 podría estar limitada a la sinapsis y/o que NRG1 podría tener un papel en el mantenimiento y/o regulación de la función y estructura sináptica (Huang y cols., 2000).

1.3.2.3. Proteína PSD-95

La proteína PSD-95, también conocida como SAP90, contiene tres dominios PDZ, un dominio homólogo a Scr (SH₃), un dominio guanilato quinasa y una secuencia de 190 aminoácidos. Parece ser una proteína importante en la organización molecular postsináptica en neuronas (Kornau y cols., 1995).

Esta proteína interactúa con el extremo C-terminal intracelular de los receptores glutamatérgicos NMDA y canales de K⁺, siendo también importante en las conexiones intercelulares entre distintas neuronas (Irie y cols., 1997).

Existen varias evidencias que sugieren que las proteínas del complejo PDZ, como la PSD-95, sirven como andamio que estructura los canales iónicos y moléculas de señalización en las sinapsis (Kennedy, 1993; Kennedy, 1998), habiendo una asociación entre los receptores ErbB4 y NMDA gracias a su interacción con proteínas que poseen el dominio PDZ. Además, se cree que pueden facilitar o restringir la señalización por neurotransmisores en las sinapsis. De hecho, los resultados de Huang y colaboradores en el año 2000 sugieren que la proteína PSD-95 podría acercar los receptores ErbB4 para su dimerización aumentando la señal de NRG1.

1.4. SISTEMA CANNABINOIDE

Los receptores cannabinoides, sus ligandos endógenos y sus enzimas de biosíntesis y degradación, constituyen el sistema de neuromodulación endocannabinoide. El sistema endocannabinoide no está localizado en vías específicas, sino que está distribuido de manera difusa por todo el cerebro y sus funciones están empezando a ser comprendidas en la actualidad (Ashton y Moore, 2011).

Hasta la fecha se han identificado dos tipos de receptores cannabinoides, los receptores CB1 y CB2 (Figura 1.12) que se diferencian en el modo de transmitir la señal y en su distribución en los diferentes tejidos. La activación de los receptores cannabinoides da lugar a una inhibición de la adenilil ciclasa (AC), lo que impide la conversión del ATP a AMP cíclico (AMPc). También se han observado una interacción con ciertos canales de iones.

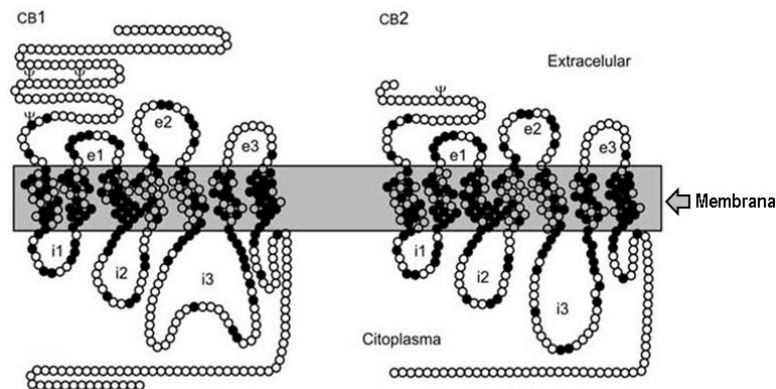


Figura 1.12. Esquema representativo de los receptores CB1 (izquierda) y CB2 (derecha). La letra e representa los dominios extracelulares y la letra i los dominios intracelulares.

1.4.1. Receptor CB1

El receptor CB1 fue el primer receptor cannabinoide en caracterizarse, su estructura se ha descrito en rata (Hajos y cols., 2001), en humano (Shire y cols., 1995) y ratón (Chakrabarti y cols., 1995). Este receptor se expresa ampliamente en cerebro, donde participa en la regulación de la liberación de neurotransmisores, siendo el receptor acoplado a proteína G (GPCR) más abundante en el cerebro de los mamíferos (Wilson y Nicoll, 2002).

Los mecanismos intracelulares por los que principalmente actúa el receptor CB1 incluyen la inhibición del adenilil ciclasa (AC). Además, también inhiben los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y activan los canales K^+ (Mackie y cols., 1995). De manera similar, la activación de los receptores CB1 permite la activación de MAP quinasas (Bouaboula y cols., 1995), particularmente las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK).

Los animales que carecen del receptor CB1 exhiben unas respuestas emocionales alteradas bajo condiciones ambientales adversas, y se ha propuesto recientemente como un modelo útil para evaluar los trastornos depresivos (Valverde y Torrens, 2012).

Existen varias evidencias que apoyan una relación entre un sistema endocannabinoide alterado y la esquizofrenia. En estudios clínicos, se ha descrito una

regulación al alza del receptor CB1 en regiones corticales (Dean y cols., 2001; Zavitsanou y cols., 2004; Newell y cols., 2006) como la corteza cingulada anterior y posterior (Rapp y cols., 2013; Kucerova y cols., 2014). Sin embargo, también existen investigaciones con resultados contrarios. Desafortunadamente, en la mayoría de estos estudios no se consideró el tratamiento antipsicótico de los individuos, un factor de confusión que podría afectar a los resultados obtenidos. De hecho, se ha descrito una disminución del receptor CB1 en individuos tratados con fármacos antipsicóticos frente a los individuos no tratados en los que no cambiaba (Urigüen y cols., 2009).

La contribución del receptor CB1 se ha investigado también desde el punto de vista de los modelos animales. Al administrar feniclidina (PCP) a ratones se producen efectos similares a algunos síntomas presentes en la esquizofrenia como por ejemplo: aumento de la locomoción, comportamientos estereotipados y disminución de la interacción social, efectos que no se observan en los animales *knock-out* del receptor CB1. Por el contrario, estos animales *knock-out* presentan una disminución de la actividad locomotora, y un aumento notable de la ataxia pero no demuestran cambios en la interacción social (Vigano y cols., 2009).

El bloqueo genético del CB1 modifica profundamente los efectos comportamentales del PCP, sugiriendo que este receptor podría tener un papel en la esquizofrenia.

1.4.2. Receptor CB2

El receptor CB2 se expresa fundamentalmente en el sistema inmune periférico, como bazo de rata y células inmunes en humano (Galiegue y cols., 1995) y en menor medida en músculo, hígado, intestino y testículo, así como en tejido adiposo (Roche y cols., 2006).

Existen diferentes evidencias que postulan que el receptor CB2 está involucrado en esquizofrenia. Así, la remisión clínica de algunos síntomas de la esquizofrenia, como es la mejoría en la escala PANNS (Escala de síndromes positivos y negativos – del inglés *Positive And Negative Syndrome Scale*), se acompaña de una disminución significativa de los niveles de ARNm del receptor CB2 en células mononucleares de sangre periférica (Giuffrida y cols., 2004).

La ausencia del receptor CB2 altera la actividad motora, induce ansiedad, trastornos depresivos y un déficit cognitivo que incluye daños sensomotores en modelos animales (Ortega-Alvaro y cols., 2011). Los ratones *knock-out* del receptor CB2 muestran una disminución de la actividad locomotora espontánea y una mayor sensibilidad a los efectos motores de la administración aguda de cocaína en la prueba del campo abierto. De hecho, estos ratones presentan una mayor vulnerabilidad ansiogénica (caja clara y oscura y laberinto elevado en cruz) y a estímulos depresivos (*Tail Suspension Test* o TST). Además, estos animales presentan alteraciones en la memoria a corto y largo plazo y una inhibición prepulso reducida tal y como se ha observado en pacientes con esquizofrenia (Braff y cols., 2001).

1.4.3. Consumo de cannabis y esquizofrenia

Durante las últimas décadas, el consumo de cannabis se ha incrementado hasta llegar a ser la sustancia ilegal más consumida en el mundo (United Nations Office on Drugs and Crime, 2013). La disminución de la percepción de riesgo y el aumento del consumo, principalmente en la población adolescente, son fenómenos emergentes en la actualidad. En el caso de los individuos con esquizofrenia su uso es mayor que el de la población en general (Green, 2005).

La intoxicación por cannabis puede llevar a un episodio psicótico agudo y pasajero y producir síntomas psicóticos a corto plazo, una asociación que se ha confirmado mediante la administración experimental de tetrahidrocannabinol (THC), principal compuesto activo del cannabis (D'Souza y cols., 2004; Morrison y cols., 2009).

Es conocida la influencia negativa del uso de cannabis sobre el curso y pronóstico de la enfermedad en los pacientes esquizofrénicos consumidores. Sin embargo, es controvertida la relación entre el consumo y el desarrollo de psicosis esquizofrénica o síntomas psicóticos prolongados (Power y cols., 2014); existen estudios que sugieren que el consumo de cannabis es un factor de riesgo (Ferdinand y cols., 2005) y estudios que concluyen lo contrario (Fergusson y cols., 2005; Lejoyeaux y cols., 2014).

Los resultados contradictorios sobre la asociación de causalidad de la esquizofrenia mediante el consumo de cannabis sugieren que la relación puede ser

bidireccional y que los riesgos del uso de cannabis pueden estar sobreestimados considerando el impacto económico y sanitario que puede acarrear (Power y cols., 2014).

1.5. PROTEÍNAS DE LAS VÍAS APOPTÓTICAS

La apoptosis o muerte celular programada es el proceso ordenado de muerte de una célula ante estímulos extra o intracelulares. Existen dos vías distintas de activación: una asociada a cambios en la permeabilidad mitocondrial y otra asociada a señales originadas en los receptores de muerte celular, localizados en la membrana plasmática (Figura 1.13).

La vía intrínseca o mitocondrial es el resultado de la desaparición de los estímulos de supervivencia provocando un aumento en la permeabilidad de las mitocondrias que liberan al citoplasma proteínas como el citocromo c, que actúa como cofactor de las proteínas activadoras de la apoptosis (Apaf-1).

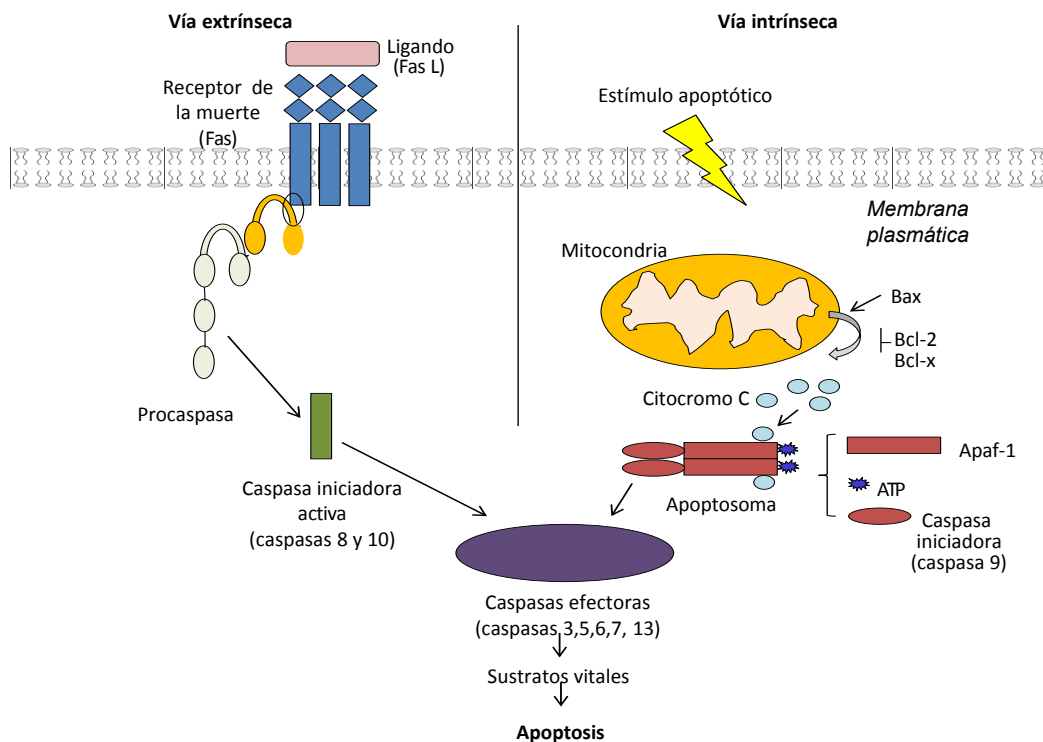


Figura 1.13. Esquema de las vías de señalización apoptótica intrínseca y extrínseca, y mecanismos efectores de la muerte celular.

La vía extrínseca o mediada por receptores de la apoptosis se desencadena tras la unión de ligandos a receptores de muerte celular. Uno de estos receptores es Fas (CD95), un receptor de muerte perteneciente a la superfamilia de receptores del factor necrótico tumoral (TNRF) (Cheema y cols, 1999). FasL, su ligando, se une a Fas formándose grupos de tres o más moléculas de receptores Fas. Gracias a esta agregación, los receptores agrupados se unen a una proteína adaptadora que contiene un dominio de muerte citosólico llamado FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*). Este dominio, por su parte, se fija a la forma inactiva de la proteína caspasa-8, que experimenta una autoactivación catalítica siendo capaz de activar otras caspasas efectoras y desencadenar la apoptosis (Figura 1.15). Esta vía de la apoptosis se llama muerte celular inducida por activación dado que se ve inducida por la activación receptor/ligando y no por la ausencia de estímulos de supervivencia.

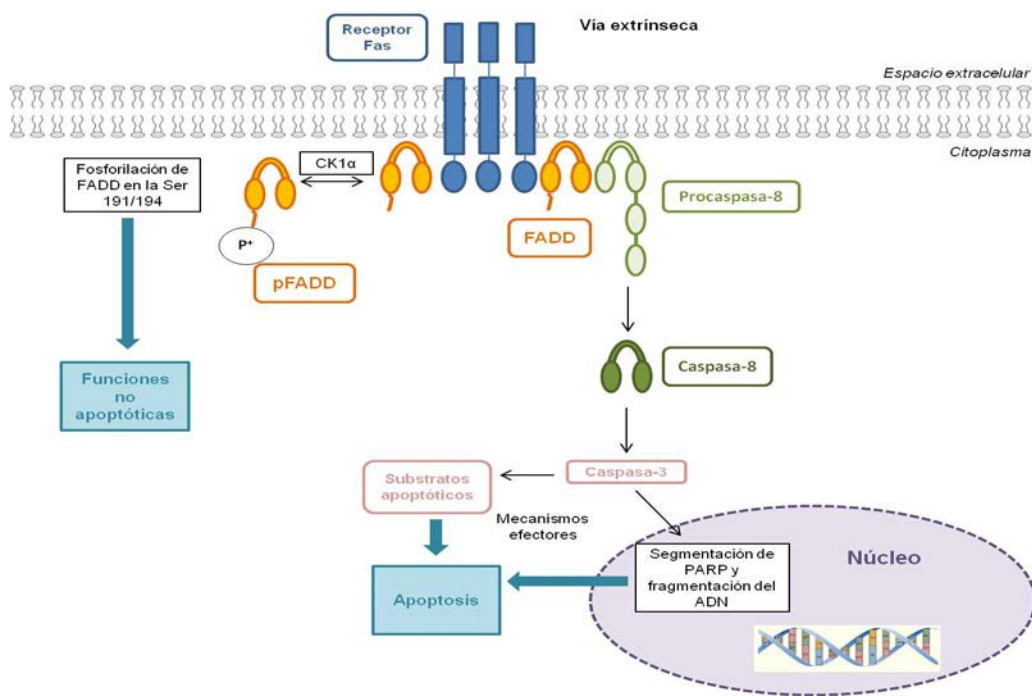


Figura 1.14. Esquema de las principales proteínas implicadas en la vía de señalización apoptótica extrínseca y mecanismos efectoras de muerte celular.

1.5.1. Receptor Fas

El receptor Fas es una proteína de la membrana plasmática con aproximadamente un peso de 36 kDa y un dominio citoplasmático de "muerte celular" conservado (Danial y Korsmeyer, 2004). Este receptor pertenece a la familia de los receptores TNF (*Tumor Necrosis Factor*), juega un papel crítico en el sistema inmunológico y, entre sus funciones, induce la muerte de células infectadas por agentes patógenos (Strasser y cols., 2009).

El gen del receptor Fas (12 kb, 9 exones, localizado en el cromosoma 10q humano) se expresa en diferentes líneas celulares y tejidos con alta variabilidad. En ratones se ha observado una expresión abundante de esta proteína en órganos como el timo, el hígado, el corazón, el pulmón, el riñón y los ovarios. En células del timo de ratón, el receptor Fas se expresa en casi todas las poblaciones excepto en las dobles negativas (CD4- CD8-) (Danial y Korsmeyer, 2004).

Los animales que carecen de este receptor desarrollan una enfermedad autoinmune parecida al lupus humano, así como un agrandamiento de los nódulos linfáticos (Budd y cols., 2006)

1.5.2. Proteínas FADD y p-FADD

La proteína FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) se identificó como una molécula clave en la transmisión de la señal de los receptores de muerte Fas después de su asociación en formas oligoméricas (Chinnaiyan y cols., 1995; Scott y cols., 2009). Su peso es de 55 kDa y su gen se encuentra en el cromosoma número 7 en ratón, siendo su longitud de 205 aminoácidos. Es una proteína que se expresa en la mayoría de órganos incluyendo hígado, riñón, tiroides, corazón, bazo, timo, pulmón, glándulas salivares, cerebro, ojo, músculo y piel.

El grupo de Tourneur generó ratones mutantes carentes de FADD y demostró que su expresión es necesaria durante el desarrollo del embrión. De hecho, los ratones *knock-out* de FADD no fueron viables y los embriones murieron en el útero en el día 12,5. En el día 11,5 los embriones mutantes estaban menos desarrollados al compararlos con embriones normales y mostraban signos de hemorragia abdominal.

Finalmente, la ausencia de FADD tenía como consecuencia un fallo cardíaco observado en más del 80% de los animales mutantes (Tourneur y Chiocchia, 2010).

Además de la regulación de la apoptosis, el complejo Fas/FADD juega papeles importantes en el crecimiento celular y la diferenciación (Valmiki y Ramos, 2009), así como mediando señales no-apoptóticas en el sistema nervioso central (Reich y cols., 2008).

La mayoría de la funciones no-apoptóticas de FADD están reguladas por la fosforilación de una única serina situada en el extremo C-terminal, fuera del dominio de muerte (en ratón Ser191 y en humano Ser194) formándose p-FADD (Ramos-Miguel y cols., 2009). La caseína quinasa 1 α (CK1 α), una serina/treonina quinasa de amplia distribución subcelular, es la principal responsable de la fosforilación de FADD en la Ser194 en distintos tipos celulares. Mediante este mecanismo, esta enzima multifuncional puede regular el ciclo celular y la sensibilidad a fármacos antineoplásicos (Alappat y cols., 2005).

1.5.3. Mecanismo efector de muerte neuronal: PARP-1

La apoptosis, tras la activación de las vías extrínseca y/o intrínseca, continúa con la fragmentación y activación de las caspasas efectoras, de las cuales, en mamíferos, la principal representante es la caspasa-3 (Kumar y cols., 2007). El fragmento activo de la caspasa efectora comienza a proteolizar substratos citosólicos, entre los que destacan neurofilamentos y tubulinas, desestructurando la arquitectura celular. Además, es capaz de trasladarse al núcleo, donde segmentará sus sustratos, activará nucleasas y desencadenará la disgregación cromosómica y nuclear observada en células apoptóticas. Entre los substratos más destacables de las caspasas efectoras se encuentra la proteína PARP-1.

La proteína PARP, o Poli (ADP-ribosa) polimerasa, es una enzima nuclear ubicua que dentro de sus funciones engloba la reparación del ADN. Esta proteína regula la maquinaria nuclear utilizada para la reparación del ADN. Si esta se mantiene sin reparar, el daño a nivel de ADN podría inducir la muerte celular.

La PARP-1 es una enzima nuclear de 116 kDa, que cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa empleando como sustrato NAD^+ , sobre residuos carboxílicos de glutámico y aspártico de proteínas nucleares. Una de las funciones biológicas de la proteína PARP-1 es la reparación del ADN y el mantenimiento de la integridad del genoma.

Esta proteína pertenece a la familia de proteínas involucradas en reparación del ADN y muerte celular programada. Dentro de este grupo existen 17 proteínas diferentes teniendo cada una de ellas diferente estructura y función.

La proteína PARP está compuesta de cuatro dominios de interés: un dominio de enlace con el ADN; un dominio de interacción con la caspasa; un dominio auto-modificador y un dominio catalítico. El dominio de enlace con el ADN está compuesto por dos motivos tipo dedos de zinc. En presencia de ADN dañado (deleción de una base), este dominio se une a la doble hélice induciendo un cambio conformacional. Se ha demostrado que esta unión se produce independiente de los otros dominios. Esta es una parte integral de un modelo de muerte celular programada basado en la inhibición de caspasa (Figura 1.15). El dominio de auto-modificación es responsable de liberar la proteína a partir del ADN después de la catálisis. Además, desempeña un papel integral en la inactivación inducida por la escisión.

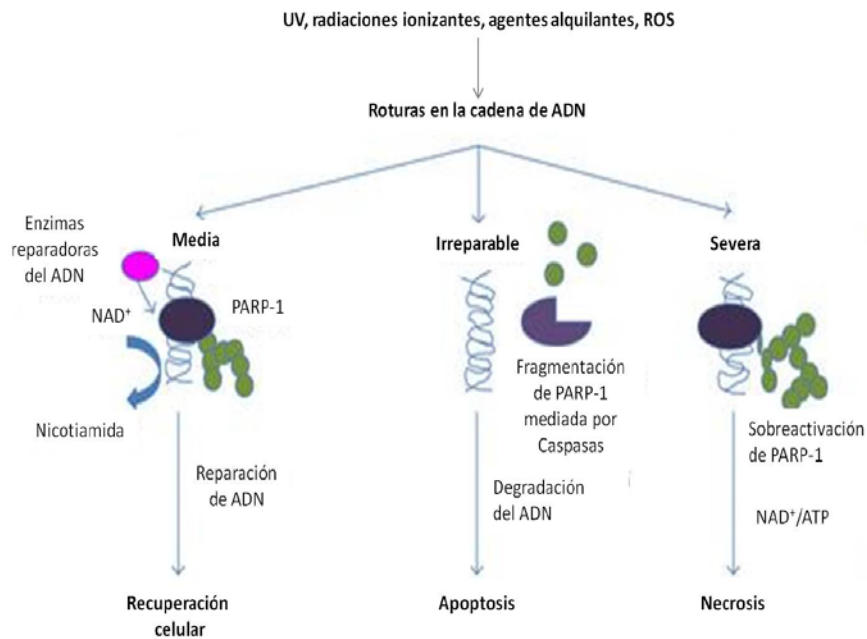


Figura 1.15. Proteína PARP-1 y respuestas celulares al daño en el ADN. La intensidad del daño en el ADN determina las vías celulares: supervivencia, apoptosis o necrosis. En el caso de un daño medio, la PARP-1 repara el ADN, manteniendo la célula viva. Cuando el daño va más allá de la reparación, la PARP-1 facilita la apoptosis, previniendo la disminución de ADN y reparando el ADN mediante fragmentación de PARP-1 inducida por caspasas. El daño severo del ADN sobreactiva la PARP-1, disminuye la energía celular y promueve la muerte necrótica de la célula (Figura modificada de Virág y Szabó, 2002).

La proteína PARP se localiza en el núcleo de la célula y su función principal es detectar las roturas en la cadena de ADN de tipo *single strand DNA break* (SSB). Cuando esta proteína detecta una SSB, se une al ADN y después de un cambio estructural, empieza la síntesis de la cadena con ayuda de otras enzimas reparadoras de ADN como la ADN ligasa III.

Se ha demostrado que la inhibición de PARP aumenta la citotoxicidad de los agentes genotóxicos, los cuales podrían ser explotados como terapia anti-cancerígena. Consecuentemente con esto, los animales *knock-out* de esta proteína presentan un aumento de la letalidad frente a radiaciones ionizantes y agentes alquilantes. Por otro lado, una actividad aumentada de PARP-1 se relaciona con una mayor longevidad en mamíferos (Gebhard y cols., 2011).

1.5.4. Apoptosis y esquizofrenia

La esquizofrenia está asociada con una gran variedad de manifestaciones físicas, como por ejemplo, metabólicas o neurológicas. Las células de mamíferos emplean mecanismos de senescencia celular y apoptosis como control de daños inevitables en el ADN. La exacerbación de estos procesos se asocia con un envejecimiento acelerado y abre investigaciones en el campo del control epigénético del genoma (Papanastasiou y cols., 2011).

Numerosos estudios con muestras de cerebro *postmortem* revelan una pérdida de volumen cerebral, atrofia y alteraciones estructurales en individuos con esquizofrenia (Wong y Van Tol, 2003; Arango y cols., 2012), hallazgos compatibles con un aumento de la apoptosis en varias regiones cerebrales, incluida la corteza cerebral (Catts y Weickert, 2012; Sellmann y cols., 2014).

En un trabajo reciente no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en las proteínas pertenecientes a la vía extrínseca de la apoptosis entre individuos con esquizofrenia comparados con individuos control. No obstante, se observan disfunciones en los componentes de la vía intrínseca, lo cual sugiere que la muerte celular en esquizofrenia está mediada por factores mitocondriales (García-Fuster y cols., 2014).

1.6. MODELOS ANIMALES

Los modelos animales son esenciales para conocer las funciones y mecanismos del organismo, así como para saber cómo trabajan los fármacos, desarrollando nuevos agentes terapéuticos y obteniendo datos críticos para el avance de los nuevos compuestos hacia los ensayos clínicos.

El modelo animal intenta imitar las patologías y otros procesos asociados a la enfermedad humana. En el campo de la genética, el desarrollo de animales transgénicos permite determinar la función de un gen específico, y potencialmente desarrollar modelos animales ligados a enfermedades humanas. A la hora de diseñar modelos animales de enfermedades mentales se encuentra un gran problema ya que no existen evidencias claras de que lo que sucede en el cerebro del animal sea

equivalente a lo que sucede en el cerebro humano. La mayoría de los síntomas utilizados para estabilizar los diagnósticos psiquiátricos en humanos (como por ejemplo, alucinaciones, tristeza o culpa) no se pueden determinar en animales. Cuando hay correlaciones razonables en animales (por ejemplo en su memoria de trabajo o comportamiento social), la correspondencia solamente puede ser aproximada.

Un buen modelo animal debería cumplir siguientes criterios tanto como sea posible: similitud en la conducta, causas semejantes, fisiología similar y tratamiento equivalente. Además, aparte de presentar alta fiabilidad, gran consistencia y estabilidad, debería establecer validez de contenido, validez predictiva y validez de constructo.

La validez de contenido hace referencia a las similitudes fenotípicas de las características anatómicas, bioquímicas, neuropatológicas o comportamentales entre el modelo animal y la enfermedad humana. La validez predictiva es la capacidad que presenta el modelo para responder a un tratamiento y poder predecir su efecto en el ser humano. Por último, la validez de constructo se relaciona con un diseño vinculado con alteraciones previamente observadas en humanos.

Un modelo animal que cumpla una o varias de estas premisas se puede emplear para investigar los mecanismos de un aspecto específico del modelo que es “homólogo” al trastorno humano.

1.6.1. Modelos animales utilizados para el estudio de esquizofrenia

1.6.1.1. Modelos animales farmacológicos

Los modelos farmacológicos se basan en administrar agonistas o antagonistas de receptores y se pueden controlar temporalmente, y espacialmente si se administra la sustancia intracranalmente. Concretamente, en los modelos animales de psicosis se inducen conductas anormales mediante administración de psicomiméticos, tanto estimulantes como alucinógenos. Por ejemplo, la administración de anfetamina a los roedores aumenta la actividad locomotora y puede producir estereotipias,

demostrando similitudes con estadios iniciales de los trastornos psicóticos en humanos.

El modelo de la esquizofrenia basado en anfetamina se basa en la capacidad de la anfetamina para alterar la actividad motora, la función sensiomotora, la atención, la conducta sexual, el aprendizaje, la memoria, el sueño y la ingesta de comida. Esta sustancia, a dosis elevadas, induce reacciones psicóticas en individuos sanos y aumenta la sintomatología psicótica en pacientes con esquizofrenia. Sin embargo, la psicosis anfetamínica como modelo animal de esquizofrenia es incapaz de reproducir la sintomatología negativa de la enfermedad. En roedores, las estereotipias y la hiperactividad inducidas por anfetamina se consideran correlatos de la psicosis, siendo revertidos por fármacos neurolépticos (Steeds y cols., 2015).

Los modelos animales glutamatérgicos son animales tratados con dosis moderadas de antagonistas del receptor NMDA, como son la ketamina y la fenilciclidina (PCP) y la dizocilpina (MK801), y reproducen los síntomas positivos (hiperlocomoción, estereotipias,...), y los síntomas negativos (déficit en interacción social) y alteraciones cognitivas (Mattei y cols., 2015).

En los últimos años también se han empezado a utilizar modelos de infección durante la gestación (*Maternal Infections Activations* o MIA). Estos modelos se basan en un incremento de la probabilidad de que la descendencia desarrolle esquizofrenia en la edad adulta tras infecciones bacterianas o virales durante el segundo trimestre de gestación de la madre. Se cree que un incremento en las citoquinas proinflamatorias en respuesta a las infecciones es capaz de alterar el neurodesarrollo del feto aumentando la vulnerabilidad a la enfermedad. En la actualidad, uno de los modelos MIA más utilizados es el modelo Poly (I:C) o administración de *polyinosinic:polycytidylic acid*. Esta sustancia es un inductor de citoquinas sintético que induce disfunciones en el comportamiento de la descendencia parecidas a las observadas en otros modelos animales de esquizofrenia (Mattei y cols, 2015).

1.6.1.2. Modelos animales genéticos

Con los avances en el campo de los organismos modificados genéticamente, los efectos de las alteraciones del genoma en la expresión fenotípica se han convertido en un área de interés en la investigación sobre esquizofrenia, generándose en pocos años varios modelos animales genéticos. Estos modelos son animales *knock-out* o *knock-in*, dependiendo de si carecen o sobreexpresan una proteína, respectivamente.

Son muchos los genes que se han relacionado con la esquizofrenia, algunos implicados en plasticidad neuronal, funciones glutamatérgicas y dopaminérgicas y sinaptogenesis, como pueden ser la neuregulina-1, el gen de la proteína *Disrupted in Schizophrenia-1* y la proteína *Reelin* (McGonigle, 2014). Todos ellos han servido de base para crear animales transgénicos que exhiban fenotipos similares a las características que se presentan en la esquizofrenia.

Uno de los modelos animales más utilizados es el que se basa en el gen *Disrupted in Schizophrenia* (*Disc-1*), que se asoció con una familia escocesa que sufría la enfermedad. En varios estudios se han utilizado ratones mutados para este gen y en algunos de ellos se han encontrado alteraciones comportamentales similares a las presentes en la esquizofrenia. Sin embargo, las mutaciones en *Disc-1* se han asociado también a otros trastornos, lo que crea confusión sobre la validez de constructo de este modelo (Nestler y Hyman, 2010).

Los modelos animales genéticos basados en variantes comunes de pequeños efectos (como son los animales *knock-out*) deben de ser abordados con cuidado, ya que no se sabe la penetrancia de la variante sobre la alteración (idealmente tendría que ser penetrancia mendeliana). A mayor penetrancia de un gen en humanos, más fiable será el modelo animal que se genere. Este es el caso, por ejemplo, del polimorfismo valina/metionina (Val/Met) en el gen que codifica la catecol-O-metiltransferasa (COMT), enzima que degrada los neurotransmisores catecolaminérgicos. La asociación entre este polimorfismo y la esquizofrenia es variable, existiendo estudios que confirman y desmienten la relación, ya que se sugiere que estos pequeños cambios pueden aumentar el riesgo pero no ser una causa directa. Algunos de estos modelos animales, por tanto, no podrían ser aceptados como

modelos de la enfermedad por su falta de validez de constructo (Nestler y Hyman, 2010).

1.6.1.3. Limitaciones de los modelos animales

Una de las limitaciones que presentan los modelos animales es la tendencia al aislamiento de factores causales únicos mientras que en pocos casos se puede identificar claramente un solo factor causante de la esquizofrenia. Además, los fenotipos de ratón transgénico suelen no ser completamente iguales al trastorno en el ser humano debido a que el mismo gen expresado en contextos diferentes puede dar lugar a fenotipos diversos.

A pesar de éstas y otras limitaciones, los modelos animales ofrecen una oportunidad esencial para conocer y poder tratar los trastornos psiquiátricos. Dado que el ciclo vital de la mayor parte de los animales es mucho menor que del humano, los modelos animales facilitan los estudios longitudinales a través del tiempo y los estudios de neurodesarrollo. También permiten realizar experimentos controlados sin factores de sesgo como son la comorbilidad, el abuso de drogas y/o los efectos de diversos fármacos.

Los modelos animales también proporcionan tejido cerebral para la investigación celular y molecular de alta calidad y por ello, deben seguir desempeñando un papel importante en la generación, verificación y difusión de las teorías actuales y de los tratamientos farmacológicos para los trastornos psiquiátricos humanos.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La esquizofrenia es una enfermedad crónica que se caracteriza por una alteración de la realidad y del comportamiento social, además de por una desorganización de la personalidad. Se trata de una patología que se inicia al final de la adolescencia o principios de la juventud, presentando un alto componente genético.

En los últimos años, han aumentado los estudios que relacionan las proteínas presinápticas y la esquizofrenia. Este fenómeno ha generado la hipótesis de que la esquizofrenia podría ser una enfermedad de la propia maquinaria de liberación de neurotransmisores. En este sentido, estudios de proteómica realizados en muestras cerebrales de individuos con esquizofrenia sugieren la presencia de alteraciones en la proteína munc18-1, una de las proteínas implicadas en este mecanismo.

La inducción de la alteración de dicha proteína en ratones podría reproducir algunos de los síntomas de la esquizofrenia, generando así un modelo animal de la enfermedad. Además de reflejar los síntomas de la esquizofrenia, éstos también deberían de ser paliados mediante el tratamiento antipsicótico actual.

2.1. Evaluación de las proteínas presinápticas en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia y el efecto del tratamiento antipsicótico

Dada la controversia existente en la bibliografía, en la primera parte de esta Tesis se marcó como objetivo principal evaluar la expresión de algunas de las proteínas presinápticas que participan en el proceso de liberación de neurotransmisores a la hendidura sináptica. Para llevar a cabo este estudio se utilizó una colección de muestras cerebrales *postmortem* procedentes de individuos con esquizofrenia e individuos control emparejados y se desarrollaron los siguientes objetivos:

- 1.- Cuantificar de manera paralela el contenido proteico de las isoformas munc18-1a/b y syntaxina-1A en individuos con esquizofrenia e individuos que habían cometido suicidio no diagnosticados de esquizofrenia, comparados con los individuos control emparejados.
- 2.- Evaluar la influencia de la exposición a fármacos psicoactivos sobre el estado de las proteínas diana en muestras cerebrales de individuos con esquizofrenia tratados y no tratados con antipsicóticos, en función de la presencia o ausencia de antipsicóticos en plasma en el momento del fallecimiento.
- 3.- Cuantificar la expresión de otras proteínas presinápticas en corteza prefrontal *postmortem* de una población de individuos con esquizofrenia y sus controles emparejados.
- 4.- Comprobar si los cambios observados en esquizofrenia son específicos de dicha enfermedad o comunes a otras enfermedades mentales, mediante la cuantificación de la expresión de las proteínas presinápticas en corteza prefrontal *postmortem* de una población de individuos con depresión mayor y sus controles.
- 5.- Cuantificar la expresión del complejo SNARE, evaluar su degradación *postmortem* y su distribución cerebral y celular en muestras de corteza cerebral *postmortem* de individuos con esquizofrenia, individuos con depresión mayor y sus respectivos individuos control.

2.2. Caracterización neuroquímica y comportamental del modelo animal Munc18-OE

Debido a las evidencias observadas, se decidió diseñar un animal que presentase una sobreexpresión de la isoforma munc18-1a en diferentes regiones cerebrales, el ratón Munc18-OE (*overexpression*). El objetivo general de esta parte del trabajo consistió en caracterizar a nivel neuroquímico, anatómico y comportamental este modelo animal. Para ello, se marcaron los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Confirmar la sobreexpresión de la isoforma munc18-1a tras la generación de modelo animal Munc18-OE mediante técnicas de cuantificación tanto de ARN mensajero como de niveles proteicos, comparando animales transgénicos con sus homólogos salvajes.
- 2.- Evaluar la expresión génica y proteica de munc18-1 tras la administración aguda de clozapina.
- 3.- Cuantificar la expresión de las proteínas presinápticas analizadas en las muestras cerebrales *postmortem* del modelo animal Munc18-OE.
- 4.- Evaluar el contenido proteico de las proteínas quinasa dependiente de ciclina-5 (Cdk5) y la proteincinasa C (PKC) que se encargan de fosforilar la proteína munc18-1.
- 5.- Cuantificar la expresión de otras proteínas relacionadas con la esquizofrenia como DISC-1, neuregulina-1, su receptor ErbB4 y PSD-95 en el modelo animal Munc18-OE y sus respectivos controles. Posteriormente, evaluar las inmunodensidades de estas proteínas tras un tratamiento agudo con clozapina.
- 6.- Analizar el contenido proteico de los receptores cannabinoides CB1 y CB2, así como los de las proteínas de las vías apoptóticas FADD, p-FADD, PARP-1 y receptor Fas, en el modelo animal Munc18-OE y sus homólogos salvajes.

7.- Evaluar el comportamiento del modelo animal Munc18-OE analizando su actividad motora, coordinación, capacidad exploratoria, ansiedad y sintomatología depresiva.

3. SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MUESTRAS CEREBRALES *POSTMORTEM*

Las muestras de cerebro humano se obtuvieron en autopsias judiciales llevadas a cabo en el Instituto Vasco de Medicina Legal de Bilbao (España) y en el Centro Universitario de Medicina Legal de Ginebra (Suiza). El estudio se desarrolló conforme a las regulaciones jurídicas y éticas vigentes en el momento para estudios con cerebro humano *postmortem*.

Para la obtención de muestras cerebrales se seleccionaron individuos caucásicos que habían fallecido por suicidio, por causas violentas o naturales, con y sin diagnóstico de enfermedad psiquiátrica. En todos los casos, se realizó una búsqueda retrospectiva del diagnóstico previo al fallecimiento utilizando la información de las historias clínicas. Tanto la recogida de las muestras como el rastreo de las historias clínicas se desarrollaron dentro de la más estricta confidencialidad.

En total se utilizaron muestras procedentes de 24 individuos diagnosticados de esquizofrenia fallecidos por suicidio y sus respectivos controles, esto es, individuos fallecidos sin diagnóstico previo de enfermedad mental. Además, se seleccionó también un grupo de 13 individuos suicidas sin diagnóstico conocido previamente de enfermedad mental (como control del factor suicidio) y otro grupo de 12 individuos diagnosticados de depresión mayor.

En el transcurso de las autopsias se obtuvo muestra para realizar un análisis toxicológico con el fin de determinar la presencia de fármacos y otras sustancias en el momento del fallecimiento. Dicha determinación se realizó en el Instituto Nacional de Toxicología (Madrid) y el Centro Universitario de Medicina Legal (Ginebra). Los grupos de individuos con esquizofrenia y con depresión mayor se clasificaron en subgrupos de acuerdo a la ausencia o presencia de antipsicóticos o antidepresivos en plasma y/u orina en el momento del fallecimiento.

Los individuos control se emparejaron por edad, género e intervalo *postmortem* con los individuos de los grupos esquizofrenia, suicidio y depresión mayor. Los grupos de individuos se presentan en la tabla 3.1 y tabla 3.2.

Tabla 3.1. Características de los individuos con esquizofrenia (SZ), individuos fallecidos por suicidio sin diagnóstico de esquizofrenia (Sui no-SZ) y sus respectivos controles utilizados en los ensayos de expresión de proteína.

Grupo	Nº	Sexo	Edad (años)	IPM (horas)	Causa de la muerte	Diagnóstico psiquiátrico	Toxicología de antipsicóticos
1	1	Mujer	35	8	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	2	Mujer	39	11	Accidente (precipitación)	SZ	Ninguno
	3	Mujer	44	24	Suicidio (ahorcamiento)	Sui no-SZ	Ninguno
2	4	Varón	48	16	Accidente (intoxicación por CO)	Ninguno (control)	Ninguno
	5	Varón	43	19	Natural (paro cardiaco)	SZ	Ninguno
	6	Varón	41	12	Suicidio (herida de bala)	Sui no-SZ	Ninguno
3	7	Varón	41	24	Accidente (caída)	Ninguno (control)	Ninguno
	8	Varón	41	41	Suicidio (herida de bala)	SZ	Ninguno
	9	Varón	37	41	Suicidio (ahorcamiento)	Sui no-SZ	Ninguno
4	10	Varón	49	17	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	11	Varón	49	41	Suicidio (ahorcamiento)	SZ	Ninguno
	12	Varón	50	29	Suicidio (ahorcamiento)	Sui no-SZ	Ninguno
5	13	Varón	25	42	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	14	Varón	24	45	Suicidio (precipitación)	SZ	Ninguno
	15	Varón	27	42	Suicidio (precipitación)	Sui no-SZ	Ninguno
6	16	Varón	45	30	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	17	Varón	44	31	Suicidio (ahorcamiento)	SZ	Ninguno
	18	Varón	41	50	Suicidio (ahorcamiento)	Sui no-SZ	Ninguno
7	19	Varón	21	16	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	20	Varón	21	24	Suicidio (precipitación)	SZ	Ninguno
8	21	Varón	23	27	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	22	Varón	23	43	Suicidio (ahorcamiento)	SZ	Ninguno
9	23	Varón	33	41	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	24	Varón	33	36	Suicidio (ahogamiento)	SZ	Ninguno
10	25	Mujer	30	15	Natural (paro cardiaco)	Ninguno (control)	Ninguno

	26	Varón	41	16	Suicidio (precipitación)	SZ	Ninguno
11	27	Varón	40	12	Homicidio (múltiples heridas)	Ninguno (control)	Ninguno
	28	Mujer	25	19	Suicidio (precipitación)	SZ	Ninguno
12	29	Varón	27	10	Natural (paro cardíaco)	Ninguno (control)	Ninguno
	30	Varón	30	13	Suicidio (precipitación)	SZ	Ninguno
13	31	Varón	66	50	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	32	Varón	66	57	Suicidio (ahorcamiento)	SZ	Olanzapina
	33	Varón	69	24	Suicidio(ahorcamiento)	Sui no-SZ	Ninguno
14	34	Mujer	29	31	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	35	Mujer	30	17	Suicidio (precipitación)	SZ	Haloperidol
	36	Mujer	31	9	Suicidio (sobredosis)	Sui no-SZ	Ninguno
15	37	Varón	58	19	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	38	Varón	57	19	Suicidio (precipitación)	SZ	Quetiapina
	39	Varón	59	26	Suicidio (ahogamiento)	Sui no-SZ	Ninguno
16	40	Varón	55	15	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	41	Varón	56	8	Suicidio (precipitación)	SZ	Quetiapina
	42	Varón	59	31	Suicidio (precipitación)	Sui no-SZ	Ninguno
17	43	Varón	36	14	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	44	Varón	37	11	Suicidio (precipitación)	SZ	Olanzapina
	45	Varón	40	15	Suicidio (precipitación)	Sui no-SZ	Ninguno
18	46	Mujer	35	22	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	47	Mujer	35	3	Suicidio (precipitación)	SZ	Quetiapina
	48	Mujer	39	19	Suicidio (sobredosis)	Sui no-SZ	Ninguno
19	49	Mujer	58	36	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	50	Mujer	56	13	Natural (paro cardíaco)	SZ	Clozapina
	51	Mujer	60	29	Suicidio (ahorcamiento)	Sui no-SZ	Ninguno
20	52	Varón	42	9	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	53	Varón	44	6	Natural (paro cardíaco)	SZ	Levomepromazina, clotiapina
21	54	Varón	38	59	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	55	Varón	43	65	Natural (paro cardíaco)	SZ	Clozapina

22	56	Varón	30	11	Accidente (electrocución)	Ninguno (control)	Ninguno
	57	Varón	30	18	Suicidio (precipitación)	SZ	Olanzapina
23	58	Varón	32	27	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	59	Varón	32	8	Suicidio (ahorcamiento)	SZ	Quetiapina
24	60	Varón	30	10	Natural (paro cardíaco)	Ninguno (control)	Ninguno
	61	Varón	27	17	Suicidio (precipitación)	SZ	Clozapina

Grupo	Sexo	Edad (años)	IPM (horas)
Control	5M/19V	39±2	23±3
Esquizofrenia (SZ)	5M/19V	39±3	23±3
Sui no-SZ	4M/9V	46±4	27±3

Tabla 3.2. Características de los individuos con depresión mayor (MD) y sus respectivos controles utilizados en los ensayos de expresión de proteína.

Grupo	Nº	Sexo	Edad (años)	IPM (horas)	Causa de la muerte	Diagnóstico psiquiátrico	Toxicología de antidepresivos
1	1	Mujer	62	28	Natural (insuficiencia cardiaca)	Ninguno (control)	Ninguno
	2	Mujer	61	26	Natural (insuficiencia cardiaca)	MD	Ninguno
2	3	Varón	53	22	Natural (insuficiencia cardiaca)	Ninguno (control)	Ninguno
	4	Varón	53	15	Suicidio (precipitación)	MD	Ninguno
3	5	Mujer	54	42	Natural (insuficiencia cardiaca)	Ninguno (control)	Ninguno
	6	Mujer	53	45	Suicidio (ahorcamiento)	MD	Ninguno
4	7	Mujer	35	22	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	8	Mujer	35	23	Suicidio (ahorcamiento)	MD	Ninguno
5	9	Mujer	74	19	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	10	Mujer	73	17	Suicidio (heridas con arma blanca)	MD	Ninguno
6	11	Mujer	57	14	Natural (insuficiencia cardiaca)	Ninguno (control)	Ninguno
	12	Mujer	57	27	Natural (insuficiencia cardiaca)	MD	Mirtazapina
7	13	Varón	34	42	Homicidio (herida de bala)	Ninguno (control)	Ninguno
	14	Varón	32	42	Suicidio (ahorcamiento)	MD	Venlafaxina, fluoxetina
8	15	Varón	34	14	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	16	Varón	34	8	Suicidio (ahorcamiento)	MD	Citalopram
9	17	Mujer	50	31	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	18	Mujer	50	19	Suicidio (precipitación)	MD	Venlafaxina, mirtazapina
10	19	Mujer	35	24	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	20	Mujer	35	25	Suicidio (precipitación)	MD	Venlafaxina, mirtazapina

11	21	Varón	31	13	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	22	Varón	33	14	Suicidio (precipitación)	MD	Venlafaxina
12	23	Varón	43	15	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	24	Varón	43	34	Suicidio (ahorcamiento)	MD	Citalopram
13	25	Mujer	58	20	Natural (insuficiencia cardiaca)	Ninguno (control)	Ninguno
	26	Mujer	49	18	Suicidio (ahogamiento)	MD	Fluoxetina
14	27	Varón	48	7	Accidente (tráfico)	Ninguno (control)	Ninguno
	28	Varón	50	9	Suicidio (sobredosis)	MD	Venlafaxina, quetiapina
15	29	Mujer	36	8	Natural (insuficiencia cardiaca)	Ninguno (control)	Ninguno
	30	Mujer	35	7	Suicidio (precipitación)	MD	Duloxetina, fluoxetina

Grupo	Sexo	Edad (años)	IPM (horas)
Control	9M/6V	47±3	21±3
MD	9M/6V	46±3	22±3

Las muestras de corteza prefrontal dorsolateral (PFC; Área 9 de Brodmann, BA9) se extrajeron tal y como describieron Urigüen y colaboradores en 2009: el tejido se cortó en la autopsia disecando desde la superficie hasta la sustancia blanca. Se tuvo especial cuidado para incluir solamente sustancia gris. También se recogió sustancia blanca para evaluar la expresión de las isoformas munc18-1a/b y el complejo SNARE. Las muestras se guardaron inmediatamente a -70°C hasta su homogeneización y preparación de membranas.

Con respecto a la estabilidad de las muestras, el pH es un factor que puede influir en la expresión génica y proteica (Li y cols., 2004; Gawryluk y cols., 2011). El análisis de los datos de pH se realizó previamente sin obtener cambios significativos entre los grupos de estudio. Otros de los factores que influyen en la expresión génica y

proteica es el intervalo *postmortem* (IPM) y la edad. El IPM es el periodo de tiempo que transcurre desde el fallecimiento del individuo hasta el almacenamiento de la muestra de tejido cerebral. Junto con la edad de los individuos, es una variable conocida que puede afectar a los resultados de expresión proteica (González-Maeso y cols., 2002; Stan y cols., 2006). Para evaluar el efecto del intervalo *postmortem* (rango: 5-102 horas) y la edad (rango: 15-52 años) en la cuantificación de las proteínas diana, se utilizaron muestras control de 8 varones y 4 mujeres.

3.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

3.2.1. Generación del modelo animal Munc18-OE

El grupo de investigación en el que se han realizado estos experimentos, conjuntamente con la empresa biotecnológica Proteomika S.L., realizó un estudio de proteómica sobre muestras cerebrales de individuos con esquizofrenia. En dicho trabajo se identificaron alteraciones en diversas proteínas vinculadas a los procesos de exocitosis y liberación de neurotransmisores. Mediante técnicas de proteómica se detectó que el nivel de expresión de munc18-1 era mayor en muestras de corteza cerebral de individuos con esquizofrenia libres de tratamiento antipsicótico y retornaba a valores de individuos control en individuos con esquizofrenia tratados con antipsicóticos. En este trabajo, y en otra población de individuos con esquizofrenia, se realizó una validación de los resultados obtenidos mediante otra técnica de evaluación de expresión proteica como es el *western blot*. Posteriormente, se procedió al diseño y creación de un ratón transgénico que sobreexpresara la isoforma específica neuronal munc18-1a en áreas cerebrales concretas, al que se denominó Munc18-OE (Munc18-*overexpression*). La generación de los animales transgénicos se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) de Madrid gracias al trabajo realizado por los Drs. Alfonso Gutierrez-Adán y Belén Pintado. Este animal se creó con el objetivo de evaluar la isoforma munc18-1a como posible diana de los fármacos antipsicóticos. Sin embargo, antes de llegar a ese paso, el modelo animal debió caracterizarse a nivel neuroquímico, funcional y comportamental.

Los animales Munc18-OE se crearon mediante un proceso de transgénesis aditiva mediante la inserción de ADN exógeno por microinyección pronuclear. Los

animales utilizados tenían el fondo genético *Mus musculus*, cepa B6CBAF1 híbrida entre C57BL/6J y CBA. La transgénesis aditiva se basa en la introducción del transgén en el pronúcleo de embriones en fase de célula única. En esta fase se produce la integración del transgén en algún cromosoma del embrión al azar en un proceso denominado recombinación no homóloga. Tras este proceso de recombinación no homóloga no se puede predecir el lugar ni el número de copias que se integran en el cromosoma embrionario. Esto justifica que las diferentes líneas generadas a partir de los diferentes animales fundadores tengan fenotipos diferentes, a pesar de haber incorporado una misma construcción.

La microinyección se realiza con la ayuda de un microscopio invertido y requiere la utilización de dos micromanipuladores (Figura 3.2).



Figura 3.2. Equipo de microinyección consistente en un microscopio invertido, mandos eléctricos que controlan los dos brazos de micromanipulación y microinyectores.

El primer micromanipulador se conecta a la pipeta de sujeción, que sujeta el embrión inmovilizándolo. El otro brazo controla una aguja cargada con la solución de ADN y la punta se introduce en el interior de uno de los pronúcleos del embrión. Una vez colocada en esa posición, se inyecta a presión la solución (Figura 3.3).



Figura 3.3. Microinyección del transgén en un embrión de ratón en fase pronuclear.

La sobreexpresión de la proteína munc18-1a se vinculó al promotor de la proteína de membrana GTRAP3-18 (*Glutamate-TRansporter-Associated Protein 3-18*) que interacciona y regula la actividad del transportador de glutamato EAAT3 (*Excitatory Amino Acid Transporter 3*), estando ambas proteínas expresadas en las mismas regiones cerebrales (Furuta y cols., 1997). Tanto el ARN mensajero (ARNm) como la proteína GTRAP3-18 se localizan principalmente en regiones cerebrales que contienen neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas como son la corteza cerebral, el hipocampo, el estriado y el cerebelo (Butchbach y cols., 2002).

La producción del fundador transgénico es un proceso complejo y poco eficiente, pero una vez se ha generado, éste incorpora la información como si fuera uno más de sus genes, con lo que para extenderlo en la población se puede recurrir a métodos de reproducción convencionales.

En un primer lugar se obtuvieron cuatro líneas de ratones fundadores y en tres de ellas el transgén se transmitía de forma mendeliana (líneas L3, L7 y L8). Los ensayos de inmunodensidad demostraron que la línea L8 no mostraba una expresión de munc18-1a incrementada mientras que la línea L3 poseía una reproducción disminuida. Después de la caracterización básica de estas tres líneas (datos no mostrados), se seleccionó la línea L7 (a la que pasó a denominarse Munc18-OE) para llevar a cabo los estudios posteriores. La cría y el mantenimiento de la colonia de animales transgénicos se llevaron a cabo en las instalaciones del Animalario de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. Todos los animales se

mantuvieron en condiciones ambientales constantes ($23 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo de luz 12 horas, de 8:00 h a 20:00 h; acceso libre a agua y comida). Los ratones se alojaron por camada y sexo en jaulas de tamaño adecuado. Todos los experimentos con animales presentados en esta Tesis doctoral se realizaron siguiendo las directrices del Real Decreto 223/1988 del 14 de Marzo (BOE núm. 67 del 18.03.1988) y la Orden Ministerial del 13 de Octubre de 1989 (BOE número 270 del 10.11.1989) referente a la protección de animales de experimentación, así como con la Directiva del Consejo Europeo del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC). Después de la fase experimental de este trabajo, se han establecido nuevas regulaciones para los procedimientos para la investigación con animales de laboratorio (Real Decreto 53/2013).

Los procedimientos realizados se aprobaron por la Comisión Ética de Bienestar Animal (CEBA) de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea con código 107/2010/MEANA MARTÍNEZ e informe favorable a fecha de 18 de abril de 2010. También se necesitó la aprobación de la Comisión Ética de Investigación con Agentes Biológicos y organismos modificados genéticamente (CEIAB) de dicha universidad ya que el estudio incluía organismos modificados genéticamente (código 9/2010/MEANA MARTÍNEZ).

3.2.2. Evaluación genética de los animales

3.2.2.1. Extracción de ADN

El ADN para el genotipado de cada uno de los animales se obtuvo a partir de tejido de la cola y se extrajo mediante un kit comercial NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) siguiendo el protocolo del fabricante.

3.2.2.2. Genotipado

El genotipado de los animales se llevó a cabo mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) con el ADN resultante de la extracción. La PCR es una herramienta utilizada en biología molecular que permite amplificar con gran eficacia secuencias muy específicas del ADN.

En una reacción de PCR se simula lo que sucede en una célula cuando se sintetiza el ADN, siendo necesario: la polimerasa, el ADN del organismo que se quiere estudiar –donde se encuentra el fragmento que queremos sintetizar–, los oligonucleótidos (llamados también *primers*, iniciadores, cebadores, “oligos”, etc.) necesarios para que se inicie la transcripción, dinucleótidos (dNTPs), y las condiciones para que la enzima trabaje adecuadamente (cierto pH, determinadas cantidades de magnesio en forma de MgCl₂, KCl, y pueden necesitarse otras sales o reactivos, dependiendo de cada polimerasa).

El objetivo, en este caso, es amplificar las secuencias correspondientes al transgén insertado para poder identificar a los animales transgénicos (Tg ó Munc18-OE) y animales control (C).

Las secuencias de los oligonucleótidos complementarios fueron:

F1: CAGGGCAAAGAACACACACAAGC

R2: CCATGGCGTTCTTCGAGTCTTC

Para la realización de la técnica de PCR se utilizó el kit comercial Go Taq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, WI 53711, EEUU) y la enzima Taq polimerasa. Los dNTPs y el agua DEPC se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Missouri, EEUU). La proporción de componentes para una muestra se describe en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Proporción de componentes para una muestra de ADN

Componentes	Volumen
H2O DEPC-Treated Water Dnase/Rnase Free	15 µl
5x Buffer	5 µl
MgCl ₂	2 µl
dNTPs	0,25 µl
Cebadores (F1 y R2) cada uno	0,5 µl
Taq Polimerasa	0,1 µl
ADN	2 µl

La PCR se llevó a cabo en el termociclador StepOne Plus® de Applied Biosystems (California, EEUU) y las condiciones fueron: preciclo (94°C, 2 minutos), 30 ciclos (94°C, 15 segundos; 54°C, 25 segundos; 72°C, 20 segundos) y post-ciclo (72°C, 5 minutos). Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta el momento de la electroforesis.

3.2.2.3. Electroforesis en gel de agarosa

Para poder analizar los fragmentos obtenidos en la técnica de PCR, se realiza una electroforesis en un gel de agarosa, que permite separar estos fragmentos de acuerdo al tamaño de cada uno.

En este caso, se aplicó una corriente eléctrica de 200 voltios en un gel de agarosa al 2% (la proporción utilizada depende del tamaño de la banda que se desea visualizar). Para ello, se utilizó bromuro de etidio (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EEUU), un agente que se intercala entre la doble hélice de ADN y que es visible por radiación ultravioleta en un transiluminador (Nahita, Reino Unido).

En el caso de los animales transgénicos se observó una banda de aproximadamente 400 pares de bases (correspondiente al transgén insertado) que no se observó en los animales control (Figura 3.4).

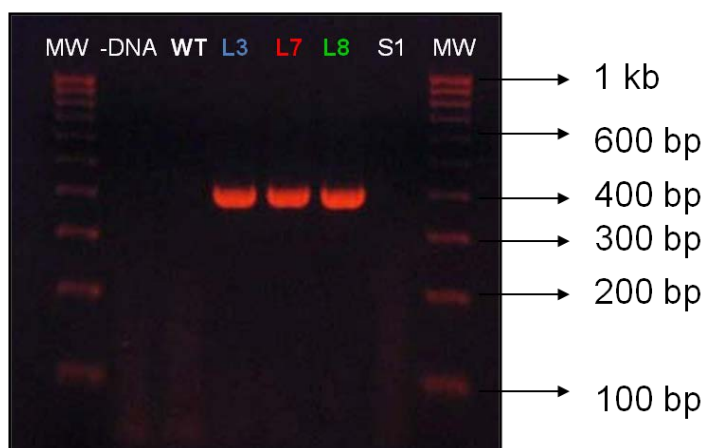


Figura 3.4. Imagen representativa del gel de agarosa que contiene los amplificadores de animales control (WT), animales transgénicos de la Línea 3 (L3), animales transgénicos de la Línea 7 (L7) y animales transgénicos de la Línea 8 (L8). También se incluyen una muestra de un ratón Swiss (S1) y una muestra sin ADN (-DNA) como control negativo. A ambos lados se cargó un marcador de peso molecular (MW).

3.2.3. Administración aguda de fármacos

La administración se realizó mediante una única inyección aguda intraperitoneal (i.p.) de suero salino o de clozapina (1 mg/kg) empleando volúmenes no inferiores a 0,15 ml. Los animales se sacrificaron dos horas después.

La clozapina se disolvió inicialmente en 10 μ l de ácido acético glacial, a los cuales se añadieron 50 μ l de agua milliQ. Finalmente, se añadió el volumen restante necesario de suero salino (NaCl 0,9%).

3.3. MATERIALES

3.3.1. Reactivos

Los reactivos empleados, así como la compañía suministradora donde se adquirieron, se describen en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Tabla resumen de los reactivos empleados

Compañía suministradora	Reactivo
Bio-Rad Laboratories (California, EEUU)	Persulfato de amonio (APS) N, N, N, N'-tetrametiletildiamina (TEMED) Tampón Laemmli
Carlo Erba Reagents (Rodano, Italia)	Metanol
Merck (Darmstadt, Alemania)	Cloruro de sodio Cloruro de magnesio Cloruro de potasio Hidróxido de sodio Ácido etilendiamino tetrácetico, sal disódica (EDTA) Ácido ortofosfórico 85% Bifosfato de potasio
National Diagnostics (Georgia, EEUU)	Acrilamida 30%-bisacrilamida 0,8%
Quimivita S.A. (Barcelona, España)	Alcohol etílico absoluto
Sigma Aldrich® (Missouri, EEUU)	Albúmina bovina (BSA) Antipaina Aprotinina β -mercaptoetanol 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato (CHAPS) Chimostatina Cloroformo Cocktail inhibidor de proteasas Fluoruro sódico Glicina Igepal Desoxicolato de sodio Dodecil sulfato de sodio (SDS) Sigma 7-9® Tritón™ X-100 Tween 20 Vanadato de sodio

3.3.2. Sondas

En este estudio se utilizaron sondas TaqMan® (Applied Biosystems) para la cuantificación del ARN mensajero correspondientes a la isoforma munc18-1a, y a los dos controles endógenos. En la Tabla 3.5 se muestran las características de las sondas TaqMan® utilizadas.

Tabla 3.5. Listado de sondas TaqMan® utilizadas.

Gen	Nombre del gen	Longitud del amplicon (pb)	Assay ID
Munc18-1a	STXBP1a		STXBP1A (no inventariado)
GADPH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	107	Mouse GAPD Control endógeno (FAM/MGB Probe)
RSP29	Ribosomal protein S29	149	Mm02342448_gH

3.3.3. Anticuerpos

3.3.3.1. Inmunofluorescencia

En esta técnica solamente se utilizó un anticuerpo primario, concretamente el correspondiente a la isoforma munc18-1a [munc18-1a humana (residuos 591-603; SRVSFEDQAPTME) generado en cabra (Abnova, China) con número de referencia PAB6504].

Como anticuerpo secundario se utilizó Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse IgG_{2b} con la referencia A21141 y número de lote 399690 de Invitrogen (Nueva York, EEUU) visualizándose en color verde.

Además, también se utilizó el agente Hoechst (Sigma-Aldrich, EEUU) que es capaz de teñir la cromatina de las células haciendo visible su ADN gracias a un marcaje fluorescente, observándose el resultado en color azul.

3.3.3.2. Western Blot

En las muestras de corteza cerebral *postmortem* y en muestras de cerebro de ratón, tanto controles como transgénicos, se utilizaron distintos anticuerpos. Esto es debido a que algunos de los anticuerpos utilizados estaban diseñados para reconocer secuencias diferentes y no todos fueron coincidentes a la hora de cuantificar algunas de las proteínas diana. Los anticuerpos utilizados en este trabajo se describen a continuación en las tablas 3.6 y 3.7.

Tabla 3.6. Listado de anticuerpos utilizados en muestras cerebrales *postmortem*

Proteína	Peso molecular	Huésped	Nº de catalogo	Compañía	Dilución
Munc18-1a	75 kDa	Cabra	PAB6504	Abnova, China	1:1000
Munc18-1b	67 kDa	Conejo	M2694	Sigma, EEUU	1:1000
Sintaxina-1A	34 kDa	Ratón	MAB336	Millipore, EEUU	1.1000
Sinaptobrevina	13 kDa	Ratón	ab24735	Abcam, Reino Unido	1:1000
SNAP-25	25 kDa	Ratón	MAB 331	Millipore, EEUU	1:1000
Sinaptotagmina	65 kDa	Ratón	610434	BD Biosciences, EEUU	1:1000
Sinaptofisina	38 kDa	Ratón	M0776	Dako, Dinamarca	1:200
GFAP	52 kDa	Ratón	GFAP-GA5	Novocastra, EEUU	1:5000
PSD-95	95 kDa	Ratón	MAB1596	Millipore, EEUU	1:2000
Estatmina	17 kDa	Conejo	3352	Cell Signalling, EEUU	1:1000
Receptor Fas*	38-48 kDa	Conejo	sc-716	Santa Cruz Biotechnology Inc., EEUU	1:5000
PAR-4	47 kDa	Ratón	sc-1666	Santa Cruz Biotechnology Inc., EEUU	1:500
NF-L	60 kDa	Ratón	5139 NR4	Sigma, EEUU	1:5000
β -actina	42 kDa	Ratón	A1978	Sigma, EEUU	1:10000

*Peso molecular del receptor Fas: forma nativa, 35 kDa; formas glicosiladas: \approx 48; agregados (homo-oligómeros): \approx 120-240 kDa

Tabla 3.7. Listado de anticuerpos utilizados en muestras cerebrales de ratón

Proteína	Peso molecular	Huésped	Nº de catalogo	Compañía	Dilución
Munc18-1a	75 kDa	Cabra	PAB6504	Abnova, China	1:1000
Munc18-1b	67 kDa	Conejo	M2694	Sigma, EEUU	1:1000
Sintaxina-1A	34 kDa	Ratón	MAB336	Millipore, EEUU	1.1000
Sinaptobrevina	13 kDa	Ratón	ab24735	Abcam, Reino Unido	1:1000
SNAP-25	25 kDa	Conejo	ab41726	Abcam, Reino Unido	1 µg/ml
Sinaptotagmina	65 kDa	Ratón	ab13259	Abcam, Reino Unido	2 µg/ml
Sinaptofisina	38 kDa	Ratón	M0776	Dako, Dinamarca	1:200
p-Munc18	~65 kDa	Conejo	AB9842	Millipore, EEUU	1:1000
Cdk5	31 kDa	Ratón	AHZ0492	Invitrogen, EEUU	1 µg/ml
PKC	82 kDa	Conejo	ab19031	Abcam, GB	2 µg/ml
CB1	~52 kDa	Conejo	C1108	Sigma, EEUU	1:500
CB2		Conejo	C1358	Sigma, EEUU	1:250
Fas receptor	48 kDa	Conejo	sc-716	Santa Cruz Biotechnology Inc., EEUU	1:1000
FADD	27 kDa	Conejo	sc-5559	Santa Cruz Biotechnology Inc., EEUU	1:5000
p-FADD	30 kDa	Conejo	2785S	Cell Signalling, EEUU	1:500
PARP	85/116 kDa	Conejo	512729	Calbiochem, Alemania	1:800
PSD-95	95 kDa	Ratón	MAB1596	Millipore, EEUU	1 mg/ml
NRG-1	65/ 80 kDa	Ratón	sc-57384	Santa Cruz Biotechnology, Inc., EEUU	1:500
ErbB4	80 kDa	Cabra	sc-31150	Santa Cruz Biotechnology, Inc., EEUU	1:200
DISC-1	70 kDa	Cabra	sc-47990	Santa Cruz Biotechnology, Inc., EEUU	1:200

3.4. MÉTODOS

3.4.1. Evaluación cuantitativa de la expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

La técnica de PCR cuantitativa a tiempo real (del inglés *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN. Para ello, emplea un molde de ADN que se obtiene por transcripción reversa a partir de ARN. También se añaden al menos un par de cebadores específicos, desoxirribonucleótidos trifosfato ó dNTPs, un tampón de reacción adecuado y una ADN polimerasa termoestable. A esta solución se le añade un fluoróforo que permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos (Watson y cols., 2004). La cuantificación se puede realizar después de cada ciclo de amplificación, por lo que se le denomina PCR a tiempo real.

3.4.1.1. Extracción de ARN

Para la extracción y purificación del ARN de la corteza cerebral de los animales transgénicos y sus controles se utilizó el kit comercial RiboPure™ (Ambion, Life Technologies, Reino Unido). Para la lisis de las células, las muestras (50-100 mg de corteza) se homogeneizaron con un mortero en 1 ml de reactivo TRI (fenol y guanidin tiocianato en una solución monofásica) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 200 µl de cloroformo a cada una de las muestras, se pasaron los microtubos por el vortex, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y se centrifugaron a 12.000 x g durante 10 minutos (4°C). El resultado de este proceso fueron tres fases bien diferenciadas en cada microtubo: una fase rojiza en el fondo, la fase orgánica; una interfase de color blanco y la fase acuosa transparente en la parte superior. Se mezclaron 400 µl de la fase acuosa con 200 µl de etanol absoluto 100%, se pasaron las muestras por el vortex, y se centrifugaron a 12.000 x g durante 30 segundos a temperatura ambiente en un tubo colector acoplado a un filtro. Se extrajo el ARN del filtro con 100 µl de tampón de elución y se mantuvieron las muestras a -20°C hasta su utilización.

Se cuantificó la concentración de ARN y el ratio 260/280 con la ayuda de un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EEUU). La integridad del ARN se midió mediante el número RIN (*RNA Integrity Number*) en el bioanalizador Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, California, EEUU).

3.4.1.2. Transcripción reversa

La transcripción reversa se llevó a cabo para obtener ADN complementario (ADNc) a partir de las muestras de ARN purificadas. Para realizar este proceso, se utilizó el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems™).

Se recogió el volumen apropiado de cada muestra y se diluyó en agua milliQ para obtener la misma concentración final en cada una de las muestras. Las condiciones de los diferentes pasos de este proceso de transcripción reversa se detallan en la Tabla 3.8.

Tabla 3.8. Condiciones de la transcripción reversa.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tiempo	10 min	120 min	5 s	∞

3.4.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa

Tal y como se ha explicado anteriormente, la expresión de diferentes genes de interés en la corteza cerebral de animales controles y transgénicos, se determinó mediante qRT-PCR en un termociclador StepOne Plus™ (Applied Biosystems). Para ello, se utilizaron 2 µl de ADNc y 18 µl de solución agua DEPC (Dietil pirocarbonato al 0,1 % en agua destilada), la enzima polimerasa (contenida en la mezcla TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix) y la sonda correspondiente a la secuencia que se quería amplificar. Las sondas utilizadas fueron sondas específicas de tecnología TaqMan® (*TaqMan® gene expression assay*, Applied Biosystems). Estas sondas incluyen los cebadores o *primers* de ambos sentidos (*Forward* y *Reverse*) a una concentración final de 900 nM y una sonda marcada con fluorescencia (FAM™) a una concentración final de 250 nM.

Los niveles de expresión del ARNm se normalizaron con los niveles de expresión de los genes de referencia o *housekeeping*, GADPH (*Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase*) y RSP29 (*Ribosomal Protein S29*). Estos genes no cambian su expresión en condiciones patológicas y es por ello que se utilizan como control del proceso. Las muestras se añadieron por triplicado siempre manteniendo una muestra de animal *wild-type* control como muestra de referencia. Las condiciones de la qRT-PCR se describen en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Condiciones del proceso de q-RT-PCR.

	Paso de desnaturalización inicial	40 ciclos	
		Paso 1	Paso 2
Temperatura	95°C	95°C	65°C
Tiempo	20 s	1 s	20 s

3.4.1.4. Análisis matemático

Las curvas de amplificación del producto de la PCR se dividen en tres fases: fase exponencial, fase lineal y fase de meseta. Durante la fase exponencial de amplificación se produce un incremento lineal en la señal fluorescente que corresponde al producto de la PCR (amplificado). El umbral de amplificación representa un punto a partir del cual la señal fluorescente alcanza un valor por encima del ruido de fondo. El ciclo umbral (Ct) indica el número de ciclos en el cual la cantidad de amplificado alcanza un umbral fijado. El valor Ct es indirectamente proporcional a la cantidad de ADNc diana inicial, habiendo mayor cantidad de ADNc cuanto menor sea el valor de Ct. Por ello, los valores de Ct se pueden utilizar para la cuantificación de ADN en muestras problema.

La ecuación que describe la amplificación exponencial de la PCR es la siguiente:

$$X_n = X_0(1 + E_x)^n$$

Donde X_n es el número de moléculas diana en el ciclo n ; X_0 es el número inicial de moléculas diana; E_x es la eficiencia de amplificación (1 para todas las sondas *TaqMan® Gene Expression*) y n es el número de ciclos.

La cantidad relativa de ARNm ($\Delta\Delta Ct$) de los genes de cada muestra se calculó mediante el método comparativo de Ct, en base a la cantidad de ARNm de los

controles internos (GADPH y Rsp29) y se relativizó en función de la expresión en la muestra de referencia (Ecuación 3.1).

Ecuación 3.1. Ecuación de la cantidad relativa de ARNm donde mr: muestra de referencia

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{housekeeping}})_{\text{muestra}} - (Ct_{\text{gen}} - Ct_{\text{housekeeping}})_{\text{mr}}$$

El análisis de los datos resultantes se realizó con el programa StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems).

La cantidad relativa de ARNm de los genes estudiados en animales control y transgénicos, se expresó como cantidad relativa (*Relative Quantity*, RQ) \pm error estándar, donde la media de la muestra de referencia fue considerada como valor relativo 1.

3.4.2. Localización anatómica y cuantificación de munc18-1a mediante técnicas de inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica que se basa en la detección de antígenos presentes en el tejido mediante una reacción antígeno-anticuerpo. Los anticuerpos son glicoproteínas que reconocen partes específicas de los antígenos, que se denominan epítomos.

En inmunofluorescencia indirecta, para la visualización de la reacción antígeno-anticuerpo, se necesita utilizar un marcador llamado fluorocromo. Un fluoróforo o fluorocromo es una molécula que absorbe luz a una determinada longitud de onda volviéndose fluorescente ya que emite a una longitud de onda mayor, que es la que determina el color que se aprecia.

En esta modalidad de la técnica, en un primer paso se utiliza un anticuerpo primario específico sin ningún marcaje y en un segundo paso se emplea un anticuerpo marcado con el correspondiente fluorocromo que reacciona de forma específica con el anticuerpo primario.

3.4.2.1. Fijación del tejido cerebral mediante perfusión de paraformaldehído

La fijación de tejidos se realiza para preservar las características morfológicas y moleculares de los tejidos. La perfusión es el método más utilizado para fijar tejidos en animales de experimentación, ya que el líquido fijador se inyecta en el sistema circulatorio del animal.

Para realizar la perfusión se anestesiaron los animales con hidrato de cloral (8%, i.p.). Se abrió la caja torácica y se introdujo una aguja fina en el ventrículo izquierdo del corazón hasta alcanzar la aorta. Tras realizar una incisión en la aurícula derecha, se perfundió al animal una solución de suero salino (0,9% NaCl) con objeto de eliminar toda la sangre del sistema circulatorio. Posteriormente, se perfundió una solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M (42,58 g Na_2HPO_4 y 13,79 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 1 L de H_2O) para la fijación de tejidos.

Seguidamente se procedió a la extracción del cerebro y se prolongó el proceso de fijación mediante incubación en paraformaldehído a 4°C durante 24 horas. Transcurrido ese tiempo, el paraformaldehído se sustituyó por una solución de sacarosa al 30% para crioproteger el tejido cerebral durante dos o tres días. Finalmente, las muestras se mantuvieron en tampón fosfato salino (PBS) a 4°C hasta el momento de su utilización.

3.4.2.2. Obtención de secciones de cerebro

Los cerebros se embebieron en gel criogénico (Tissue-Tek, Sakura, California, EEUU) sobre placas soportes de criostato (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EEUU) y, posteriormente, se cortaron en secciones coronales de 30 μm de grosor que fueron conservadas en PBS a 4°C hasta su uso en los estudios inmunohistoquímicos.

3.4.2.3. Inmunofluorescencia

Las secciones cerebrales se incubaron con solución de bloqueo (3% suero de burro, 0,5% Triton X-100 y 0,025% Azida en Tampón fosfato salino ó PBS) para evitar uniones inespecíficas durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente (anti-munc18-

1a) diluido en solución de bloqueo durante 24 horas a temperatura ambiente y en agitación.

Al día siguiente, las secciones se lavaron (3 lavados de un minuto y otros 3 de 10 minutos) con una solución de lavado (1,5% de suero de burro en PBS) en agitación. Posteriormente, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (Alexa[®]488) durante 24 horas a 4°C.

Finalmente, las secciones se lavaron como se ha descrito anteriormente para eliminar el anticuerpo secundario sobrante. En el penúltimo lavado, se añadió a la solución de lavado el agente Hoechst (Sigma-Aldrich, EEUU) para teñir los núcleos celulares. Este fluorocromo se excita a una longitud de onda de 350 nm y emite en color azul.

Por último, las secciones se montaron con medio de montaje *ProGold*[®] (Invitrogen, Nueva York, EEUU) y se cubrieron con los cubreobjetos para su posterior visualización en el microscopio de fluorescencia.

3.4.2.4. Cuantificación de la fluorescencia

La cuantificación de fluorescencia se llevó a cabo en un microscopio Nikon (Kanagawa, Japón) equipado con un láser (488 nm) para la excitación de isotiocianato de Fluoresceína (*Fluorescein isothiocyanate*, FITC).

Para cuantificar los niveles de fluorescencia se utilizaron 20 imágenes de 150 píxeles x 150 píxeles tomadas de varias regiones y a un tiempo de excitación de 300 ms. Las imágenes originales se procesaron con el programa *Adobe Photoshop 7.0* (Adobe Systems Inc., Mountain View, California, EEUU).

3.4.3. Evaluación de la expresión proteica mediante western blot

El *western blot* es una técnica semicuantitativa que se emplea para la detección de proteínas específicas en una muestra compleja. Se trata de un procedimiento inmunológico ya que se basa en la especificidad de una reacción antígeno-anticuerpo, utilizando anticuerpos específicos contra proteínas que se desean detectar.

3.4.3.1. Localización de las proteínas diana

La localización subcelular de proteínas diana se evaluó mediante la utilización de un kit comercial de extracción subcelular (*Subcellular Proteome Extraction Kit, ProteoExtract™*, Calbiochem, Massachusetts, EEUU). Para estas pruebas y para la comparación de sustancia gris frente a sustancia blanca se recogieron muestras de la corteza prefrontal de un individuo sano (varón, 44 años, IPM 16 horas, 15 µg de proteína).

Este método de extracción secuencial se basa en las diferencias de solubilidad de las proteínas localizadas en los distintos compartimentos subcelulares para rendir, de forma sucesiva, cuatro fracciones enriquecidas en proteínas citosólicas (F1), proteínas de membrana (F2), nucleares (F3) y proteínas citoesqueléticas (F4).

3.4.3.2. Preparación de las muestras de cerebro *postmortem*

Se utilizó homogeneizado total de tejido cerebral del área 9 de Brodmann (BA9) de cada individuo. Las muestras cerebrales se prepararon siguiendo el protocolo empleado por García-Fuster y cols., en 2008 a partir de 250-300 mg de corteza prefrontal que se homogenizó en tampón Tris-HCl (50 mM y pH 6,8). Este tampón contenía EDTA (1 mM), SDS al 2% e inhibidores de proteasas.

Tras realizar la homogenización del tejido, se procedió a la cuantificación del contenido proteico de cada muestra. Esta cuantificación se llevó a cabo mediante el lector de placas ELx808 (BioTek® Instruments, Winooski, EEUU) basado en principios de absorbancia y la utilización del kit BCA de BioRad. Se preparó una recta de calibrado con albumina sérica bovina en un rango de concentraciones de 0,2 a 0,8 mg/ml. Las muestras se diluyeron 1:10 y se midieron por triplicado. Todas las muestras de homogeneizado total se diluyeron a una concentración final de 3 mg/ml con tampón de homogenización.

Las muestras estándar (st, 100%) se obtuvieron de un *pool* de 22 ó 15 muestras de individuos control.

Las alícuotas del homogeneizado se mezclaron con el tampón de carga en relación 1:2, que contenía Tris-HCl (50 mM y pH 6,8), SDS al 1,5 %, glicerol al 10%, β-

mercaptoetanol al 2,5 % y 0,1% de azul de bromofenol, alcanzando una concentración final de 1,5 mg/ml de proteínas. Las muestras (homogeneizado total) se guardaron a una temperatura de -80°C hasta uso.

Las muestras cerebrales se desnaturalizaron a 94°C durante 2 minutos antes de cargar en el gel de poliacrilamida, excepto en aquellas muestras en las que se quiso evaluar complejo SNARE.

3.4.3.3. Preparación de las muestras cerebrales del modelo animal Munc18-OE

La preparación empleada fue homogeneizado total de corteza de ratón. Para ello, tras sacrificar a los animales mediante dislocación cervical, se extrajo el cerebro de cada animal.

Se partió de 250-300 mg de corteza prefrontal que se homogenizó en tampón Tris-HCl (50 mM y pH 6,8). Este tampón contenía EDTA (1 mM), SDS al 2% e inhibidores de proteasas.

Tras la homogenización del tejido, y al igual que en el caso de las muestras cerebrales *postmortem*, se cuantificó el contenido proteico, se prepararon las alícuotas y se guardaron hasta su uso de la misma forma arriba indicada.

3.4.3.4. Electroforesis

Este proceso se conoce como SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) y consiste en separar las proteínas presentes en la muestra en geles de poliacrilamida en función de su peso molecular aplicando un voltaje. Para ello, las muestras de tejido cerebral se desnaturalizaron antes de cargar a 94°C durante 2 minutos.

Los geles de poliacrilamida forman una red por donde las proteínas migran, gracias a la aplicación de voltaje, dependiendo de su peso molecular. Las proteínas de menor tamaño migran más distancia que las de alto peso molecular, ya que estas últimas no son capaces de atravesar los poros que forma la red de poliacriamida. Para que la poliacrilamida se solidifique se necesitan dos reactivos: TEMED (N, N, N N'-tetrametilediamina) y persulfato amónico (APS). Dependiendo del peso molecular de la

proteína diana, la concentración de poliacrilamida utilizada fue diferente, por ejemplo: la proteína sinaptobrevina que es una proteína con un peso molecular de 19 kDa necesitó un porcentaje de poliacrilamida superior a la proteína munc18-1b, que pesa 68 kDa.

La electroforesis es un proceso discontinuo ya que las proteínas migran a través de dos geles diferentes: en primer lugar por el *Stacking gel* donde todas las proteínas cargadas se acumulan en una sola banda, denominada frente de migración; y en segundo lugar por el *Running gel* que es donde las proteínas se separan. La composición de tanto el *Stacking Gel* como del *Running Gel* se describe en la tabla 3.10 (para 4 geles de 1,5 mm de grosor al 10-12%).

Tabla 3.10. Composición de los geles.

	Running gel		Stacking gel
	10%	12%	
Poliacrilamida 30 %	13,33 ml	16 ml	3,2 ml
H ₂ O milliQ	16 ml	13,4 ml	16 ml
Tris-HCl 3 M (pH=8,8)	10 ml	10 ml	4 ml
SDS 10% (CF = 0,1%)	400 µl	400 µl	240 µl
TEMED (CF = 0,05%)	20 µl	20 µl	20 µl
APS 10% (CF=0,05%) 0,1 mg/ml	200 µl	200 µl	560 µl

Las muestras (40 µg de homogeneizado total y 15 µg de cada fracción subcelular) se cargaron en pocillos que se forman al insertar un peine de Teflon™ en el *Stacking gel* antes de que se polimerice. Al menos, un pocillo de cada gel se reservó para poder cargar el marcador de peso molecular que consiste en un conjunto de proteínas de peso molecular conocido que sufre el mismo procedimiento de las muestras, es decir, que se separa y se transfiere de igual manera. Este marcador permite determinar el peso molecular de la banda de la proteína diana (Figura 3.11).

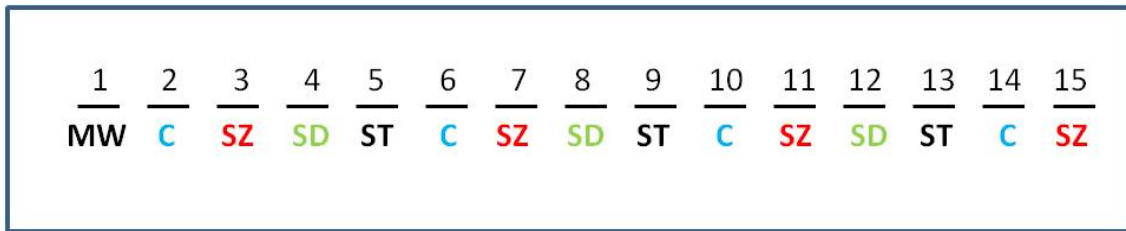


Figura 3.11. Esquema de carga de muestras de cerebro *postmortem* en el gel de poliacrilamida (MW: marcador de peso molecular; C: muestra de individuo control; SZ: muestra de individuo con esquizofrenia; SD: muestra de individuo suicida y ST: muestra estándar).

El proceso electrofóretico requiere una fuente de alimentación que proporciona un campo eléctrico mediante dos electrodos entre los que se establece una diferencia de potencial y que permite que las proteínas de la muestra se puedan separar (Figura 3.12). Inicialmente se aplicó un voltaje constante de 80 V hasta que se observó una separación de las proteínas del marcador de peso molecular. Posteriormente, el voltaje se subió hasta 120 V hasta que el frente de migración desapareció.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

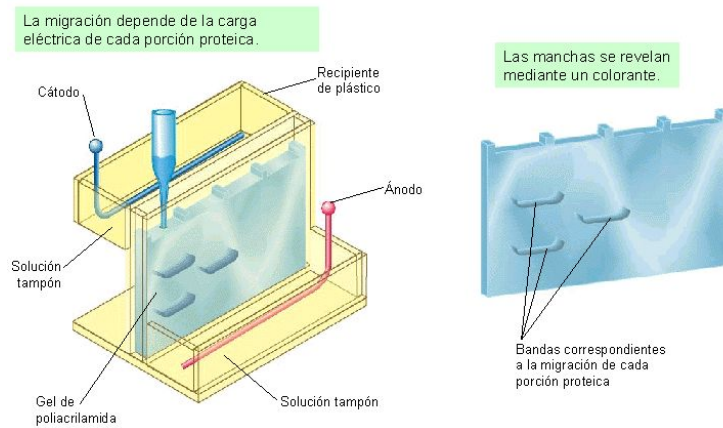


Figura 3.12. Esquema de electroforesis en gel de poliacrilamida.

La electroforesis se llevó a cabo en unas cubetas de electroforesis en las que se añadió tampón de electroforesis compuesto por Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1%.

3.4.3.5. Transferencia

Después, las proteínas se transfirieron desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (PROTAN® BA85, Schleider & Schuell GmbH, Dassel Alemania) mediante la aplicación de un campo eléctrico de 110 V durante 150 minutos.

Para transferir las proteínas separadas en el gel se utilizaron equipos de transferencia. Estos se preparan siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Bio-Rad laboratories). En este procedimiento se apilan dentro del equipo una esponja plana, 3 hojas de papel de cromatografía Whatman™ (Amersham, GE Healthcare, Reino Unido) empapado en tampón de transferencia, la membrana y el gel en contacto directo, otras tres hojas de papel cromatográfico y otra esponja plana, formando una especie de sándwich (Figura 3.13).

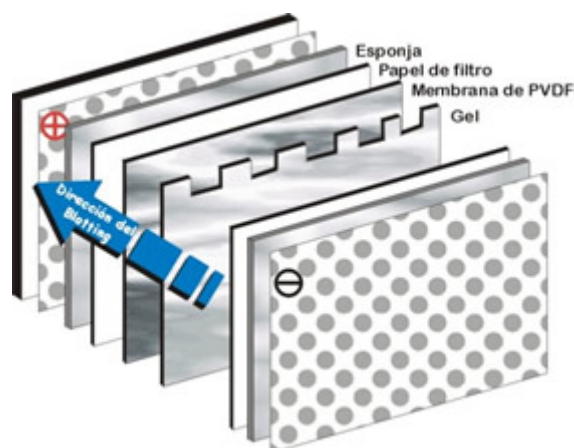


Figura 3.13. Esquema de montaje para realizar la transferencia de proteínas.

El montaje debe realizarse en tampón de transferencia que está compuesto de Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM y metanol al 20%. El proceso se realizó en cubetas de transferencia que se rellenaron de tampón de transferencia guardado a -20°C y a 4°C, es decir congelado y líquido, con objeto de mantener el tampón lo más refrigerado posible. Para asegurar su recirculación, se añadió un imán en la cubeta que se pone

encima de un agitador para evitar el calentamiento producido por la corriente eléctrica.

3.4.3.6. Bloqueo de la membrana

Las membranas de nitrocelulosa poseen gran afinidad por las proteínas, que es una ventaja a la hora de realizar la transferencia pero también un inconveniente. Para prevenir la unión no específica del anticuerpo primario se necesita saturar el sistema con proteínas no específicas como las que contiene la leche desnatada en polvo.

La solución de bloqueo que se empleó contiene leche en polvo desnatada al 5% y albúmina sérica bovina (BSA) al 0,5 % en tampón fosfato salino (PBS 1X). Este tampón se preparó al 10X con 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 14,4 g de Na₂HPO₄ y 2,4 g de KH₂PO₄ en un litro de agua milliQ.

3.4.3.7. Inmunodetección de las muestras de cerebro *postmortem*

Después de bloquear las membranas se incubaron a 4°C, en agitación y durante toda la noche en solución de bloqueo a la que se añadió 0,2% de Tween 20. A esta mezcla se añadió la cantidad de anticuerpo recomendada por el fabricante para detectar la proteína de interés.

Al día siguiente, las membranas se lavaron con PBS 1X (tres aclarados rápidos y tres lavados de 5 minutos en agitación). De este modo, se eliminaron los excesos de anticuerpo primario no unido a la membrana que, posteriormente, podría aumentar el ruido de fondo.

Una vez realizados los lavados, las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y en agitación con solución de bloqueo suplementada con 0,2% de Tween 20 y el anticuerpo secundario que reconoce al primario (Figura 3.14).

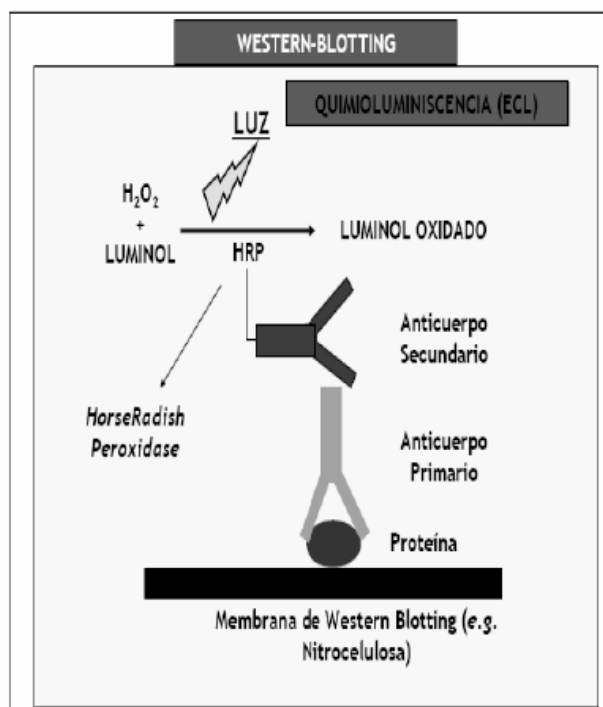


Figura 3.14. Esquema de detección mediante un sistema de quimioluminiscencia (ELC).

Tras tres lavados rápidos y tres lavados de 5 minutos en agitación se procedió a realizar la detección de la quimioluminiscencia. Para ello, las membranas se mezclaron con los dos líquidos del sistema de quimioluminiscencia ECL (Amersham, GE Healthcare, GB), se secaron y se envolvieron en film transparente montando un paquete. Estos paquetes se metieron en casetes de exposición membrana-película (Hypercasete™; Amersham, GE Healthcare, Reino Unido) y se expusieron a una película fotográfica. Seguidamente, las películas se revelaron con un líquido revelador y otro fijador. El tiempo de exposición varió entre 1-60 minutos.

Para reducir la variabilidad y controlar la transferencia de proteínas desde el gel a la membrana de nitrocelulosa, se utilizó como control de carga la proteína β -actina (aproximadamente 42 kDa). Se utilizó esta proteína ya que presenta escasa variabilidad en respuesta a diferentes manipulaciones experimentales (Greer y cols, 2010). Para poder cuantificar esta proteína, se deshicieron los paquetes de film transparente donde se habían envuelto las membranas con anterioridad, y estas se lavaron en PBS 1X. Con objeto de deshacer los puentes disulfuro que se forman entre el anticuerpo primario y la proteína de interés adherida a la membrana, se realizó un

proceso de *Stripping*. En este proceso las membranas se lavaron con el tampón de *Stripping* durante 30 minutos en agitación fuerte en un baño a una temperatura de 50°C. El tampón de *Stripping* estaba formado por: 31,25 ml de Tris-HCl (1M, pH 6,8), 4 ml de β -mercaptoetanol (que rompe los puentes disulfuro y la unión antígeno-anticuerpo) y 100 ml de SDS al 10 % en 500 ml de agua milliQ.

Tras lavar abundantemente las membranas con PBS 1X, se volvió a incubar con solución de bloqueo suplementada con 0,2% de Tween 20 y, en este caso, con anticuerpo contra la β -actina. Al día siguiente, se lavó el exceso de éste y se incubó con el anticuerpo secundario tal que como se ha explicado previamente.

El listado de anticuerpos primarios se resume en las Tabla 3.6 y Tabla 3.7

3.4.3.8. Cuantificación de las proteínas diana en cerebro *postmortem*

La densidad de las proteínas de interés y del complejo SNARE se evaluó como se describe en García-Fuster y colaboradores en 2008. La densidad óptica integrada [Integrated Optical Density (IOD)] de bandas inmunoreactivas de las películas autorradiográficas se cuantificó en un escáner *GS-800 Imaging Densitometer*.

Las proteínas de interés de la corteza prefrontal (BA9) se cuantificaron en parejas de individuos con esquizofrenia, y suicidas sin diagnóstico de enfermedad mental cuando existía muestra, o de individuos con depresión mayor con sus individuos control emparejados. Se calculó el contenido relativo de cada proteína (cambio en porcentaje) en relación con los triplicados del estándar incluidos en cada gel. Las muestras estándar (100%) se obtuvieron de un *pool* de 22 ó 15 muestras de individuos control. La cuantificación de cada proteína se evaluó en cada individuo de 3 a 6 veces en geles diferentes, y la media resultante se utilizó como valor final. Se obtuvieron resultados similares en cuanto a las unidades de IOD cuando se normalizaron por β -actina.

3.4.3.9. Inmunodetección de las muestras de corteza del modelo animal Munc18-OE

En este caso, el proceso de inmunodetección fue diferente ya que se realizó con fluorescencia y no con luminiscencia. Para ello, fueron necesarios anticuerpos secundarios fluorescentes que fuesen capaces de reconocer al anticuerpo primario.

Las membranas de nitrocelulosa tras ser incubadas con el anticuerpo primario durante toda la noche, se lavaron con PBS y seguidamente se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente correspondiente durante una hora a temperatura ambiente. Para finalizar, las membranas se volvieron a lavar con PBS.

3.4.3.10. Cuantificación de las proteínas diana en corteza cerebral del modelo animal Munc18-OE

Las membranas incubadas con los anticuerpos fluorescentes se cuantificaron mediante el escáner *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences, Nebraska, EEUU). Este aparato es capaz de detectar dos longitudes de onda simultáneamente (en color rojo y verde), lo que permitió poder cuantificar dos proteínas al mismo tiempo (la proteína diana y el control de carga, β -actina).

La imagen de anticuerpos IRDye™800 (Tebu-Bio, EEUU) se capturó a 800 nm, visualizándose en verde, mientras que la de anticuerpos Alexa Fluor®680 (Invitrogen, EEUU) se detectó a 680 nm, observándose en rojo (Figura 3.15).

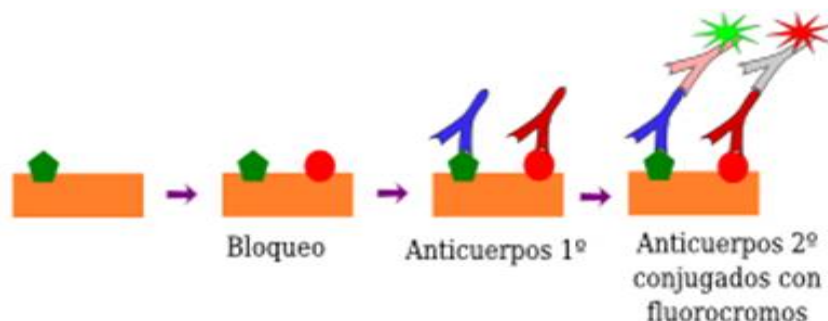


Figura 3.15. Esquema de inmunodetección indirecta por fluorescencia.

3.4.4. Evaluación del fenotipo comportamental del modelo animal Munc18-OE

3.4.4.1. Evaluación de la actividad motora

3.4.4.1.1. Actividad motora espontánea. Actímetro

El actímetro monitoriza la actividad del roedor durante un tiempo determinado escogido por el experimentador y consiste en una caja negra opaca de 44 x 37 x 35 cm (PanLab, Barcelona). En la base de la jaula hay unos sensores capaces de detectar los movimientos horizontales del ratón (Figura 3.16). Se situó a cada animal en el centro del aparato y se evaluó la actividad motora horizontal (número de pasos) durante 10 minutos.



Figura 3.16. Actímetro. La fotografía muestra la caja negra y los sensores de movimiento en la parte inferior en forma de rejilla.

3.4.4.1.2. Coordinación motora. Rotarod

El rotarod permite la medida de parámetros para la evaluación del equilibrio y la coordinación motora del roedor. Esta prueba comportamental se basa en colocar al animal sobre un rodillo giratorio que acelera su velocidad progresivamente de 4 a 40 cm^2/s durante cinco minutos.

El día previo a la prueba se entrena al animal en el aparato a velocidad constante $5 \text{ cm}^2/\text{s}$. Este entrenamiento consiste en colocar al animal durante cinco minutos en la barra horizontal giratoria (Figura 3.17).

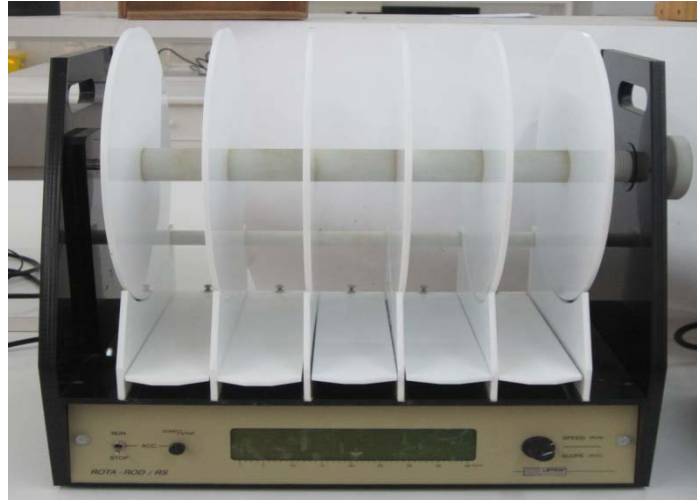


Figura 3.17. Fotografía del aparato Rotarod. Se aprecia la barra central giratoria y los cinco huecos para poder analizar cinco roedores al mismo tiempo.

3.4.4.2. Evaluación de la actividad exploratoria mediante la caja con agujeros

La prueba de la caja con agujeros sirve para medir la actividad exploratoria en animales de experimentación. Los cambios que se puedan observar en esta prueba se relacionan con el estado de ansiedad.

La caja con agujeros es una caja cuadrada de $50 \times 50 \times 50 \text{ cm}$ cuya base tiene 16 agujeros del mismo tamaño en los que el animal introduce el hocico como parte de su comportamiento exploratorio. Se contabilizaron las veces que asomaba la cabeza durante un periodo de cinco minutos (Figura 3.18).



Figura 3.18. Fotografía de la caja con agujeros en la que se aprecian los agujeros y la parte inferior para observar al ratón.

3.4.4.3. Evaluación del estado de ansiedad

3.4.4.3.1. Laberinto elevado en cruz

El estudio del comportamiento de un roedor en el laberinto en cruz elevado se emplea en la comprensión de algunos estados anímicos y en pruebas de fármacos ansiolíticos y ansiogénicos.

El aparato consiste en un laberinto en forma de cruz con una altura de 50 cm y con dos brazos abiertos y dos cerrados enfrentados entre sí (Figura 3.19). Esta prueba se basa en el miedo condicionado que tienen los roedores a la altura y los espacios abiertos.

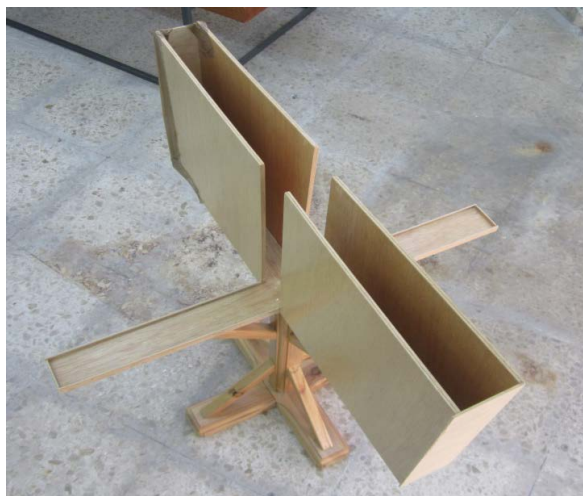


Figura 3.19. Fotografía del laberinto elevado en cruz. Se aprecian los cuatro brazos, dos abiertos y dos cerrados enfrentados dos a dos.

La prueba consistió en colocar al animal en el cuadrado central dejándolo explorar libremente durante cinco minutos. En este tiempo, se contabilizaron el tiempo de permanencia en los brazos abiertos y el número de entradas que realizaron a ellos. La entrada a un brazo se estipuló en el momento en el que el animal tuviese las cuatro patas dentro del brazo.

3.4.4.3.2. Interacción social

El paradigma conductual de la interacción social se basa en la evaluación de la conducta espontánea, que no requiere entrenamiento previo del animal y cuya variable dependiente es el tiempo que un animal se relaciona con otro individuo de su misma especie.

En una caja (20 x 40 x 10 cm) limpia se colocaron dos ratones procedentes de jaulas diferentes y se contabilizó el tiempo de interacción entre ambos durante cinco minutos (Figura 3.20). Como interacción entre los ratones se consideraron los olisqueos y el contacto físico.

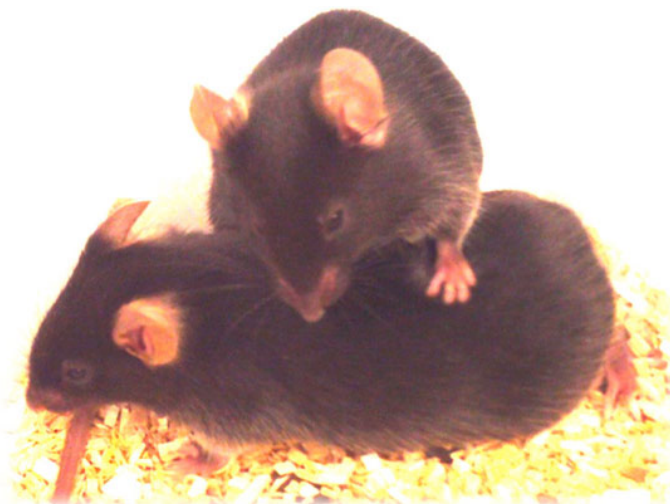


Figura 3.20. Imagen sobre el contacto físico entre ratones.

3.4.4.4. Evaluación del estado de depresión mediante la prueba de natación forzada

La prueba de la natación forzada (o test de Porsolt) se utiliza para valorar fármacos antidepresivos. Se genera un estrés al animal y se valora la respuesta

natatoria de un roedor a la amenaza de ahogamiento, cuyo resultado se interpreta como la susceptibilidad al estado de ánimo negativo. Comúnmente, se utiliza para medir la efectividad de los fármacos antidepresivos.

El primer día del ensayo se introduce al animal en un tanque cilíndrico de metacrilato (65 cm de alto por 30 de diámetro) lleno de agua a 25°C aproximadamente, existiendo una distancia de 14 cm entre el agua y la parte superior del tanque. Durante 15 minutos se deja al animal nadar libremente en el tanque. El segundo día, se repite la inmersión durante 5 minutos y se contabiliza el tiempo que el animal permanece inmóvil (realizando exclusivamente movimientos de flotación). Después de cada ensayo se seca al animal.

3.4.5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos de los datos se realizaron con el programa *GraphPad Prism 5*[®] (GraphPad Software, California, EEUU). En todos los casos, los resultados se expresaron como valores medios \pm error estándar de la media. La significación estadística se consideró cuando el valor de p fue inferior a 0,05.

Antes de realizar los análisis estadísticos, los datos se inspeccionaron para ver si existían valores extremos o atípicos que se distancian numéricamente del resto de los datos (*outliers*) (valor crítico, $Z > 1,96$) utilizando el test de Grubbs (Graphpad Software en www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1.cfm).

La comparación estadística entre dos poblaciones con distribución normal se realizó mediante el test t de Student. Sin embargo, cuando existían más de dos poblaciones para comparar, se llevaron a cabo análisis de varianzas de una vía (*one-way ANOVA*). En el caso de existir dos factores que podrían interactuar entre ellos, se realizaron análisis de varianzas de dos vías (*two-way ANOVA*).

Para determinar si las variables sexo, edad e intervalo *postmortem* influyeron en los resultados se realizaron análisis de covarianzas. Además, para observar las interacciones entre dos proteínas y la relación entre concentración de proteína y la intensidad de la fluorescencia. Los valores se expresan como r o como r^2 .

4. RESULTADOS

4.1. EVALUACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PRESINÁPTICAS EN CORTEZA PREFRONTAL DE INDIVIDUOS CON ESQUIZOFRENIA

4.1.1. Caracterización de la expresión proteica de munc18-1a y munc18-1b en corteza prefrontal de cerebro humano *postmortem*

Como se ha descrito anteriormente, la proteína munc18-1 se localiza en los terminales nerviosos y tiene un peso molecular aproximado de 68 kDa. Se han descrito dos isoformas, munc18-1a (603 aminoácidos) y munc18-1b (594 aminoácidos) y se diferencian entre ellas en los últimos nueve aminoácidos del extremo N-terminal.

La inmunodetección de las isoformas munc18-1a/b se realizó en homogenizado total de corteza prefrontal (CPF) humana *postmortem* (área 9 de Brodmann). Se identificaron las isoformas monoméricas munc18-1a y munc18-1b con anticuerpos monoclonales específicos para cada una de ellas.

Para detectar y diferenciar las dos isoformas, se creó una proteína recombinante, RP-1a, formada por la proteína de fusión GST (*Glutathione S-transferase*) y la isoforma munc18-1a, de un peso molecular total aproximado de 100 kDa (Figura 4.1).

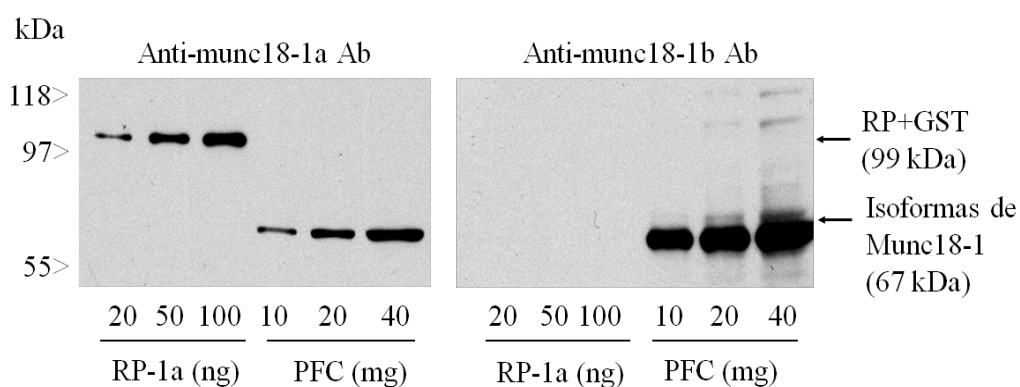


Figura 4.1. Imagen representativa de la inmunodensidad de las proteínas munc18-1a y munc18-1b (conjunto de 22 muestras de individuos control: 10-40 μ g de proteína); y de la proteína munc18-1a recombinante marcada con GST (RP-1a, 20-100 ng de proteína) utilizando anticuerpos específicos contra ambas isoformas. Cada anticuerpo reveló la presencia de la isoforma correspondiente (formas monoméricas a 67 kDa). La proteína RP-1a (99 kDa) se detectó solamente con el anticuerpo contra la isoforma anti-munc18-1a.

4.1.2. Distribución subcelular de las isoformas munc18-1a/b en corteza prefrontal de cerebro humano *postmortem*

Para comprobar la eficacia del proceso de fraccionamiento subcelular se utilizaron anticuerpos contra marcadores específicos de cada fracción: estatmina en F1, receptor Fas en F2, proteína nuclear reguladora de apoptosis en próstata (PAR-4) en F3 y neurofilamento-L (NF-L) en F4. Además, se incluyeron otros marcadores del citoesqueleto (F4) como son la proteína postsináptica PSD-95 que se expresa en neuronas y la proteína fibrilar glial (GFAP) que es específica de astrocitos. En la figura se aprecia como la proteína estatmina se expresa en la fracción citosólica (F1) tanto de sustancia gris como de sustancia blanca. En la fracción enriquecida en membranas F2, se expresa el receptor Fas. La proteína PAR-4 se expresa únicamente en la fracción nuclear F3 y en la fracción del citoesqueleto F4 se expresa el neurofilamento L (NF-L), además de las proteínas PSD-95 y GFAP (Figura 4.2).

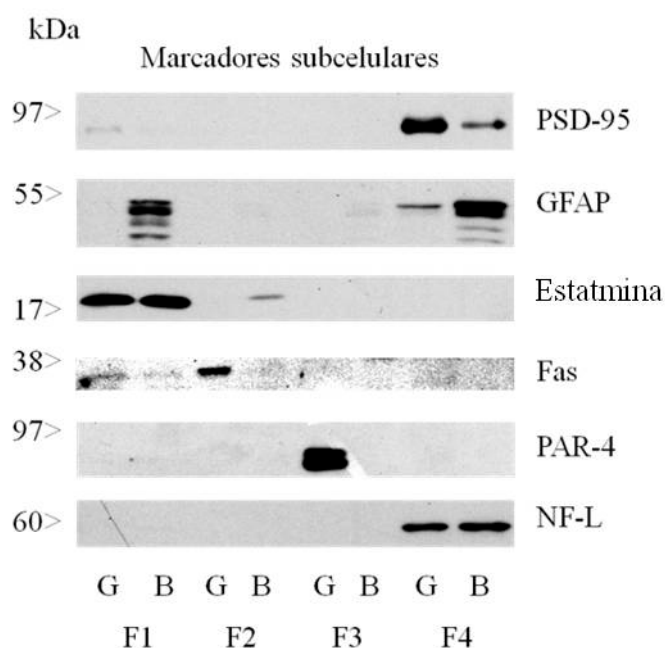


Figura 4.2. Imágenes representativas de la expresión proteica de las proteínas PSD-95 (marcador de sustancia gris -G-), GFAP (marcador de sustancia blanca -B-) y marcadores subcelulares selectivos de cada fracción: estatmina (F1), receptor Fas (F2), PAR-4 (F3) y NF-L (F4). Se utilizaron estándares comerciales de peso molecular para determinar el peso de cada proteína.

Las isoformas munc18-1a y munc18-1b se localizaron en la fracción citosólica (F1), en la fracción enriquecida en membranas (F2) y en los núcleos (F3), siendo más abundante en sustancia gris que en sustancia blanca. En la fracción correspondiente a las proteínas citoesqueléticas (F4) la distribución fue similar. La distribución de munc18-1a y de munc18-1b (incluyendo el fragmento proteolítico) fue similar tanto en la sustancia gris como en la blanca (Figura 4.3).

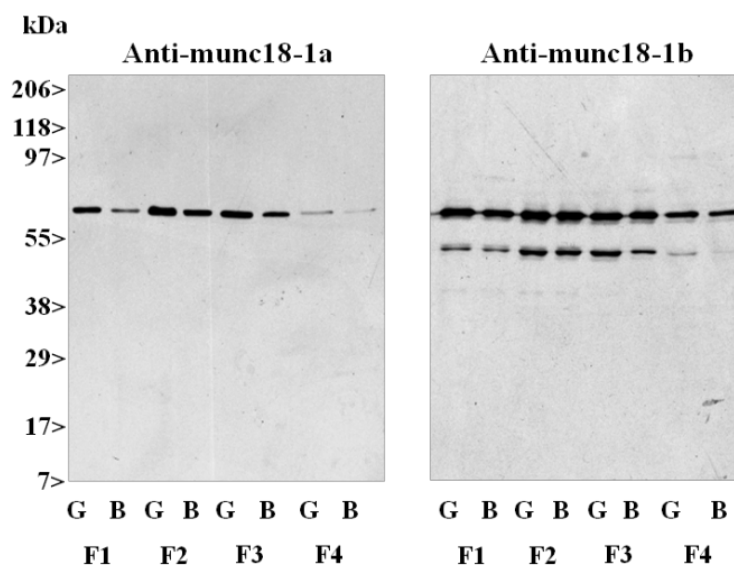


Figura 4.3. Imagen representativa de la localización subcelular de las isoformas munc18-1a y munc18-1b en sustancia gris (G) y sustancia blanca (B) en corteza prefrontal de cerebro humano *postmortem* (sujeto: varón, 44 años, 16 horas de IPM, muestra: 40 µg de proteína). F1: fracción citosólica, F2: fracción enriquecida en membranas, F3: fracción enriquecida en núcleos y F4: fracción del citoesqueleto. Se utilizaron estándares comerciales de peso molecular para determinar el peso de cada proteína.

4.1.3. Evaluación del efecto del intervalo *postmortem* sobre la expresión

El intervalo *postmortem* es el periodo de tiempo que transcurre desde el fallecimiento del individuo hasta el almacenaje del cerebro a -80°C. En este trabajo el intervalo *postmortem* tiene un rango que oscila entre 5 y 102 horas. Los resultados mostraron que el intervalo *postmortem* no afecta a la expresión de las isoformas de munc18-1 ni a la syntaxina-1A (Figura 4.4).

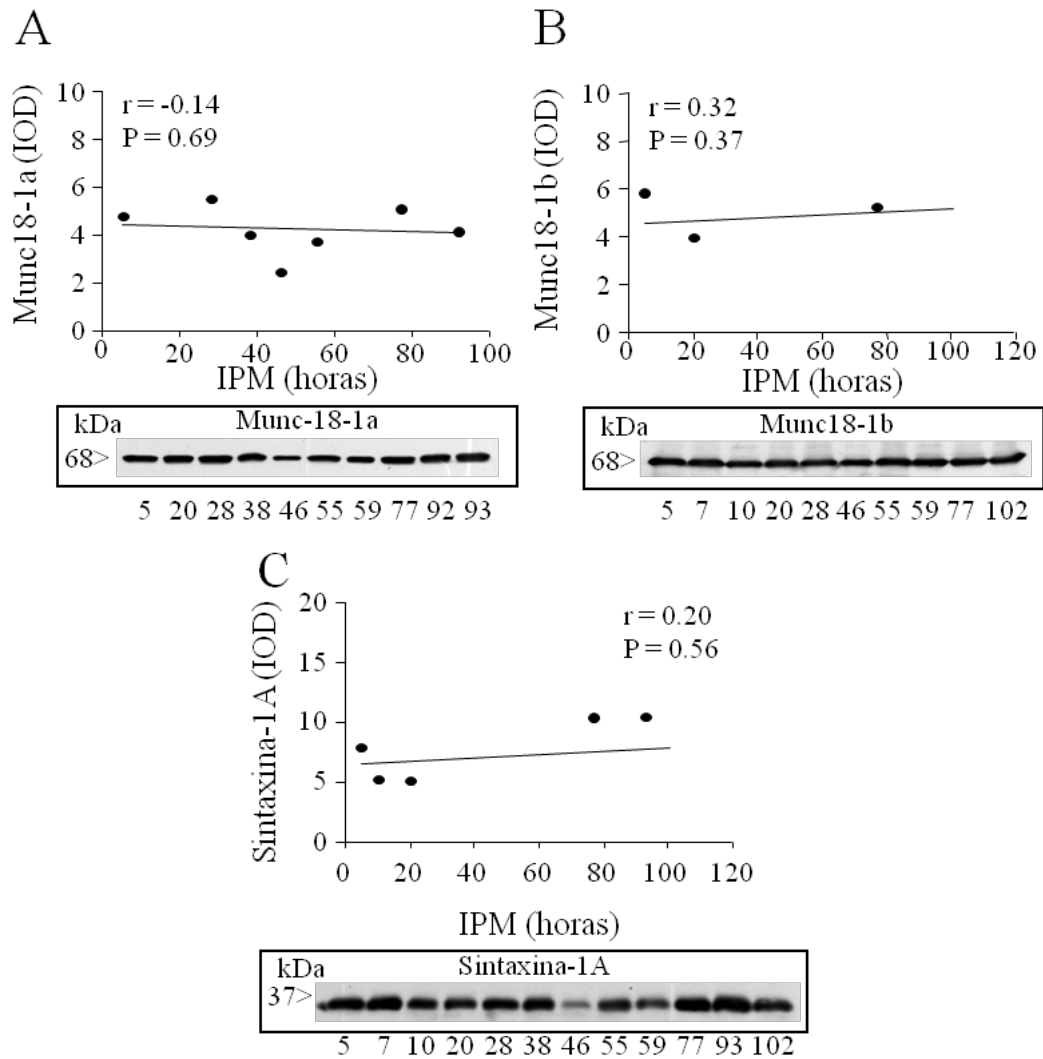


Figura 4.4. Efecto del intervalo *postmortem* (IPM) en la expresión proteica (IOD: densidad óptica integrada) de (A) munc18-1a, (B) munc18-1b y (C) syntaxina-1A en corteza prefrontal (BA9) de cerebro humano *postmortem*. Los puntos representan el contenido relativo de cada una de las proteínas de individuos sanos. *Abajo*: imágenes representativas de la expresión proteica de munc18-1a, munc18-1b y syntaxina-1A a diferentes IPM.

Todas las muestras utilizadas en este estudio se emparejaron en función de la edad, el género y el intervalo *postmortem* de los individuos, tal y como se muestra en las tablas 3.1 y 3.2 del apartado material y métodos. Los análisis de covarianzas que se realizaron para determinar si estas variables influyeron en los resultados fueron negativos en todos los casos.

4.1.4. Evaluación de la expresión proteica de munc18-1, sintaxina-1A y otras proteínas presinápticas en corteza prefrontal de cerebro humano *postmortem* de individuos con esquizofrenia y sus controles

4.1.4.1. Evaluación de la expresión proteica de munc18-1

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de munc18-1a en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia ni en individuos suicidas sin diagnóstico de esquizofrenia frente a sus controles ($F [2,55]= 1,97; p > 0,05$) (Figura 4.5).

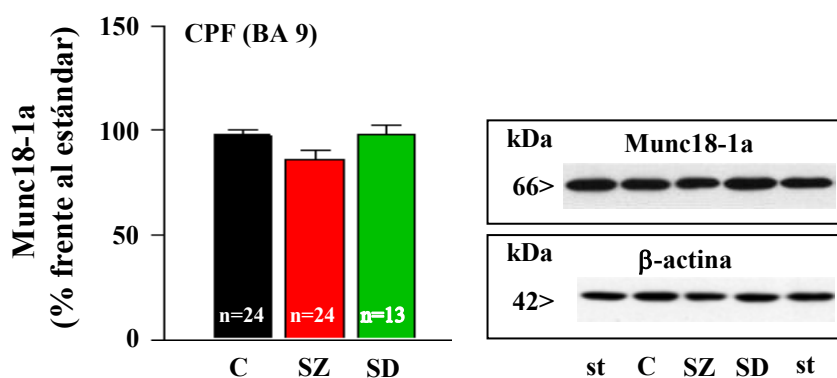


Figura 4.5. Representación gráfica de la expresión proteica de munc18-1a en corteza prefrontal de individuos control (C), individuos con esquizofrenia (SZ) e individuos suicidas sin esquizofrenia (SD). Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100% conjunto de 22 muestras de individuos control). Derecha: Imágenes representativas de los niveles de inmunodetección de munc18-1a y β -actina, en los que se incluye las muestras estándar (st).

Respecto a la inmunodensidad de la isoforma munc18-1b, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control, individuos con esquizofrenia e individuos suicidas sin diagnóstico de esquizofrenia ($F [2,58]= 0,18; p > 0,05$) (Figura 4.6).

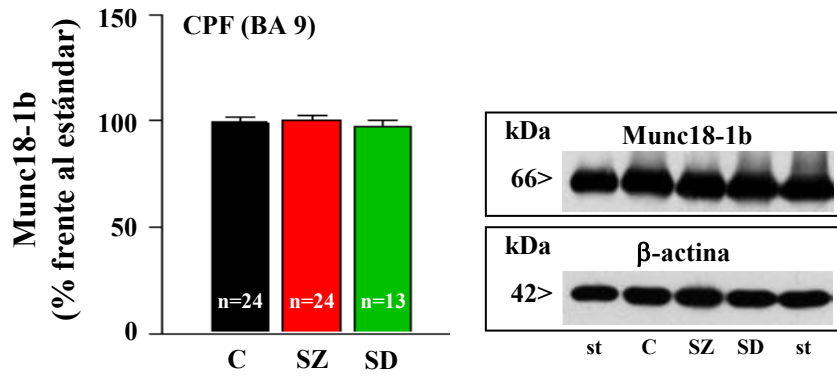


Figura 4.6. Representación gráfica de la expresión proteica de munc18-1b en corteza prefrontal de individuos control (C), individuos con esquizofrenia (SZ) e individuos suicidas sin esquizofrenia (SD). Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100% conjunto de 22 muestras de individuos control). Derecha: Imágenes representativas de los niveles de inmunodetección de munc18-1a y β -actina, en los que se incluye las muestras estándar (st).

4.1.4.2. Evaluación de la expresión proteica de sintaxina-1A

Al evaluar la expresión de la proteína sintaxina-1A mediante una ANOVA de una vía seguida del *post-hoc* de Bonferroni, se observó un aumento significativo (42%) en el grupo de individuos con esquizofrenia al compararlo con el grupo control ($F [2,44]=8,45$; $p=0,0009$) (Figura 4.7).

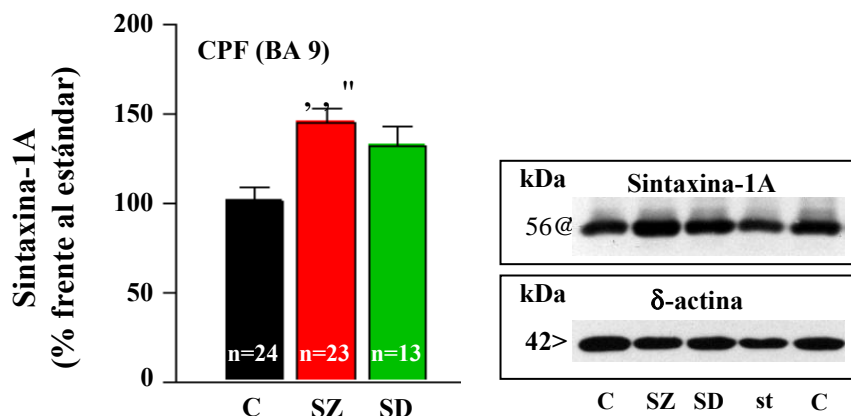


Figura 4.7. Representación gráfica de la expresión proteica de syntaxina-1A en corteza prefrontal de individuos control (C), individuos con esquizofrenia (SZ) e individuos suicidas sin esquizofrenia (SD). Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100% conjunto de 22 muestras de individuos control). ** $p < 0,05$ al comparar el grupo de individuos con esquizofrenia frente a sus respectivos controles (ANOVA de una vía seguido del *post-hoc* de Bonferroni). Derecha: Imágenes representativas de los niveles de inmunodetección de munc18-1a y β -actina, en los que se incluye las muestras estándar (st).

4.1.4.3. Evaluación de la expresión proteica de sinaptobrevina

Respecto al contenido proteico de sinaptobrevina, no se observaron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los grupos de estudio al compararlos con el grupo control ($F [2, 52] = 0,67$), $p = 0,898$) (Figura 4.8).

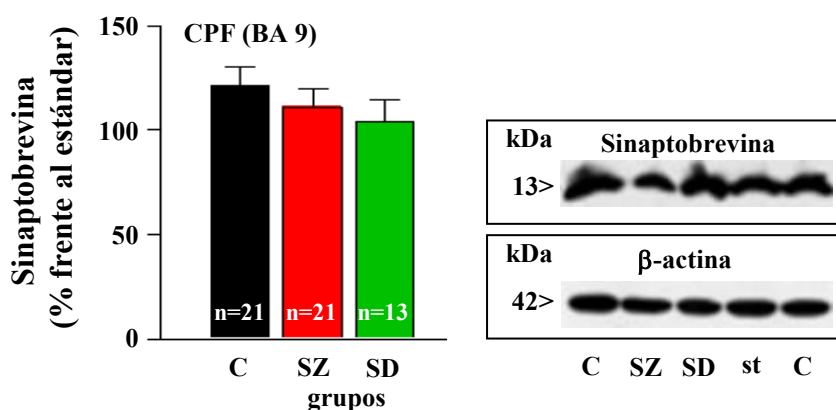


Figura 4.8. Representación gráfica de la expresión proteica de sinaptobrevina en corteza prefrontal de individuos control (C), individuos con esquizofrenia (SZ) e individuos suicidas sin esquizofrenia (SD). Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100% conjunto de 22 muestras de individuos control). Derecha: Imágenes representativas de los niveles de inmunodetección de munc18-1a y β -actina, en los que se incluye las muestras estándar (st).

4.1.4.4. Evaluación de la expresión proteica de SNAP-25

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de SNAP-25 entre los tres grupos de estudio ($F [2,58]= 3,83, p= 0,949$) (Figura 4.9).

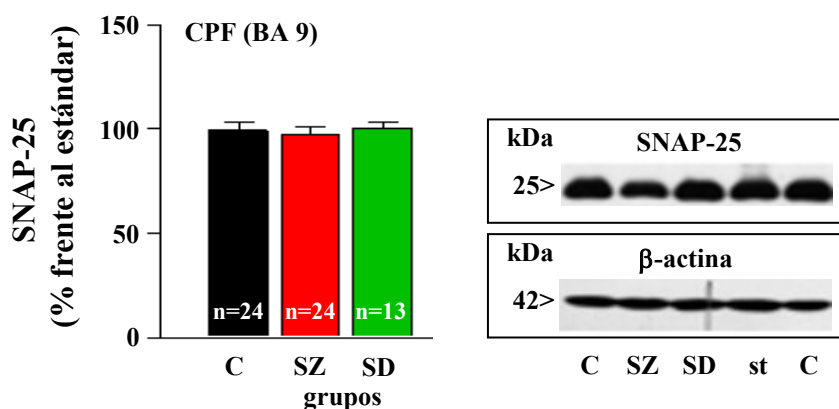


Figura 4.9. Representación gráfica de la expresión proteica de SNAP-25 en corteza prefrontal de individuos control (C), individuos con esquizofrenia (SZ) e individuos suicidas sin esquizofrenia (SD). Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100% conjunto de 22 muestras de individuos control). Derecha: Imágenes representativas de los niveles de inmunodetección de munc18-1a y β -actina, en los que se incluye las muestras estándar (st).

4.1.4.5. Evaluación de la expresión proteica de sinaptotagmina

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de sinaptotagmina entre el grupo de individuos con esquizofrenia, el grupo de los individuos control y el grupo de individuos suicidas ($F [2,57]= 2,11, p= 0,1301$) (Figura 4.10).

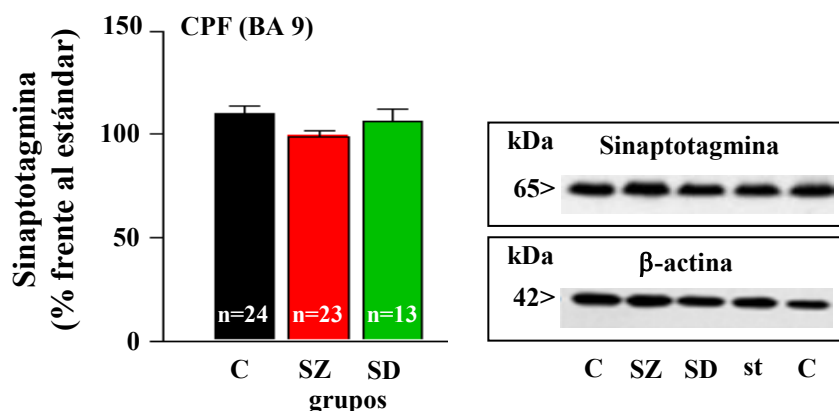


Figura 4.10. Representación gráfica de la expresión proteica de sinaptotagmina en corteza prefrontal de individuos control (C), individuos con esquizofrenia (SZ) e individuos suicidas sin esquizofrenia (SD). Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100% conjunto de 22 muestras de individuos control). Derecha: Imágenes representativas de los niveles de inmunodetección de munc18-1a y β -actina, en los que se incluye las muestras estándar (st).

4.1.4.6. Evaluación de la expresión proteica de sinaptofisina

No se encontraron cambios estadísticamente significativos entre los niveles de inmunodensidad de sinaptofisina de los individuos con esquizofrenia, individuos suicidas sin diagnóstico de esquizofrenia y el grupo control ($F [2,58] = 0,17$, $p = 0,847$) (Figura 4.11).

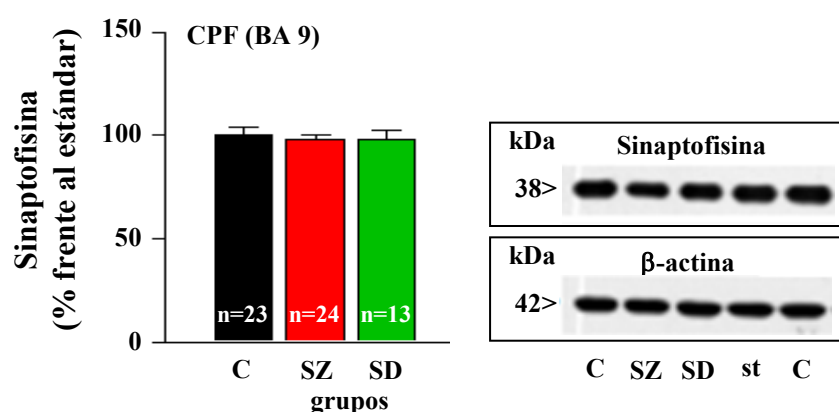


Figura 4.11 Representación gráfica de la expresión proteica de sinaptofisina en corteza prefrontal de individuos control (C), individuos con esquizofrenia (SZ) e individuos suicidas sin esquizofrenia (SD). Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100% conjunto de 22 muestras de individuos control). Derecha: Imágenes representativas de los niveles de inmunodetección de munc18-1a y β -actina, en los que se incluye las muestras estándar (st).

4.1.5. Efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión proteica de munc18-1, sintaxina-1A y otras proteínas presinápticas

4.1.5.1. Evaluación del efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión proteica de munc18-1 en corteza prefrontal

Como ya se ha descrito anteriormente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de munc18-1a al comparar el grupo de individuos con esquizofrenia con el grupo de individuos control (Figura 4.5). Sin embargo, al separar la población de individuos con esquizofrenia en individuos tratados y no tratados con antipsicóticos en el momento del fallecimiento, se observó una disminución estadísticamente significativa de la expresión de munc18-1a en el grupo de individuos con esquizofrenia tratados con respecto al grupo control (21%). También se observó una reducción significativa en los individuos tratados con antipsicóticos respecto a los individuos con esquizofrenia libres de tratamiento (18%) (F [2,42]= 6,39, $p= 0,0038$). No se encontraron diferencias en el grupo de individuos con esquizofrenia libres de tratamiento en comparación con los individuos control (Figura 4.12).

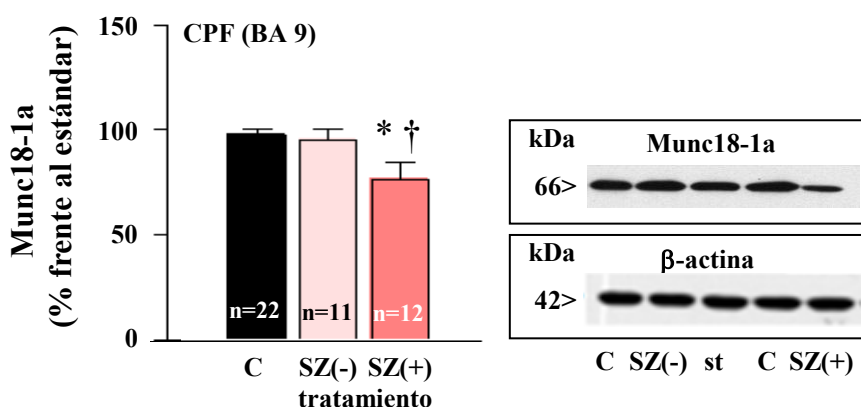


Figura 4.12. Expresión proteica de munc18-1a en corteza prefrontal de individuos control (C), individuos con esquizofrenia no tratados [SZ(-)] y tratados con antipsicóticos [SZ(+)] en el momento del fallecimiento. Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100% conjunto de 22 muestras de individuos control). ** $p<0,01$ al comparar el grupo de individuos con esquizofrenia no tratados frente a sus respectivos controles. † $p<0,05$ al comparar los individuos con esquizofrenia tratados con antipsicóticos frente al grupo de individuos con esquizofrenia libres de tratamiento (ANOVA de una vía seguido del análisis *post-hoc* mediante el test de Bonferroni). Derecha: Imágenes representativas de munc18-1a y β -actina, en los que se incluye las muestras estándar (st).

En el caso de la isoforma munc18-1b, no había cambios significativos en su expresión proteica (ANOVA de una vía; $F [2,44]=2,79$, $p=0,072$) pero al dividir la población de individuos con esquizofrenia entre tratados con antipsicóticos y libres de tratamiento se observó una disminución en aquellos que habían recibido tratamiento antipsicótico frente a los que no lo habían recibido (test *post-hoc* de Bonferroni) (Figura 4.13).

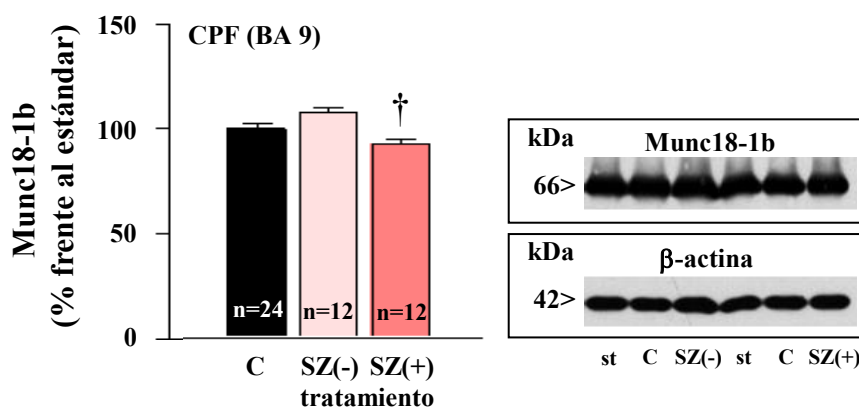


Figura 4.13. Expresión proteica de munc18-1b en corteza prefrontal de individuos control (C), individuos con esquizofrenia no tratados [SZ(-)] y tratados con antipsicóticos [SZ(+)]. Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100% conjunto de 22 muestras de individuos control). † $p < 0,05$ al comparar los individuos con esquizofrenia tratados con antipsicóticos frente al grupo de individuos con esquizofrenia libres de tratamiento (ANOVA de una vía seguido del análisis *post-hoc* mediante el test de Bonferroni). Derecha: Imágenes representativas de munc18-1b y β -actina, en los que se incluye las muestras estándar (st).

4.1.5.2. Evaluación del efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión proteica de sintaxina-1A en corteza

La expresión proteica de sintaxina-1A aumentó de manera significativa en los individuos con esquizofrenia, al compararlos con los individuos del grupo control (42%, $p < 0,01$) (Figura 4.7). Al dividir la población de los individuos con esquizofrenia entre tratados con antipsicóticos en el momento del fallecimiento y los que no estaban bajo tratamiento, también se observa un incremento significativo en ambos grupos con respecto a los individuos control ($F [2,44]= 8,45$; $p= 0,0009$) [SZ(-): 51%, $p < 0,01$; SZ(+): 35%, $p < 0,05$] pero no hubo diferencias entre estas dos poblaciones ($p= 0,3108$) (Figura 4.14).

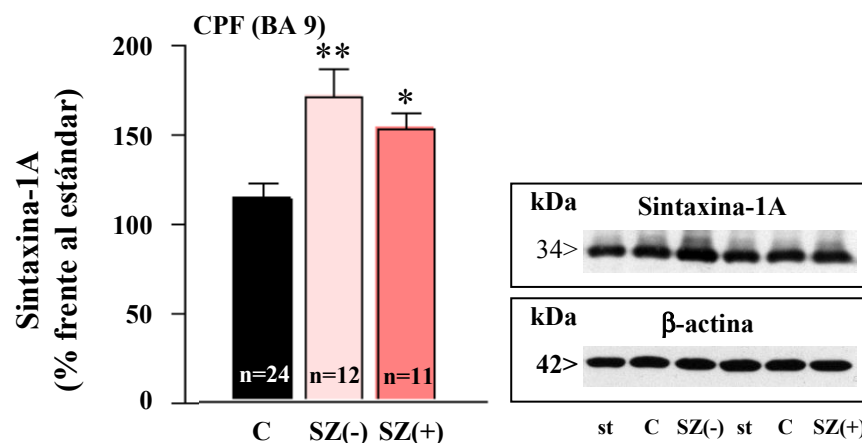


Figura 4.14. Expresión proteica de sintaxina-1A en corteza prefrontal de individuos control (C), individuos con esquizofrenia no tratados [SZ(-)] y tratados con antipsicóticos [SZ(+)]. Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100% conjunto de 22 muestras de individuos control). * $p < 0,05$ al comparar los grupos frente a los individuos control (ANOVA de una vía seguido del análisis *post-hoc* mediante el test de Bonferroni). *Derecha:* Imágenes representativas de sintaxina-1A y β -actina, en los que se incluye las muestras estándar (st).

4.1.5.3. Evaluación del efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión proteica de sinaptobrevina en corteza prefrontal

En el caso de la expresión proteica de sinaptobrevina, no se obtuvieron cambios significativos al comparar los individuos con esquizofrenia frente a los individuos control. No obstante, se observó una disminución significativa de la expresión en individuos con esquizofrenia tratados con antipsicóticos frente a los individuos libres de tratamiento (SZ(+): 32% de reducción, $F [2,39] = 3,35$, $p = 0,045$) (Figura 4.15).

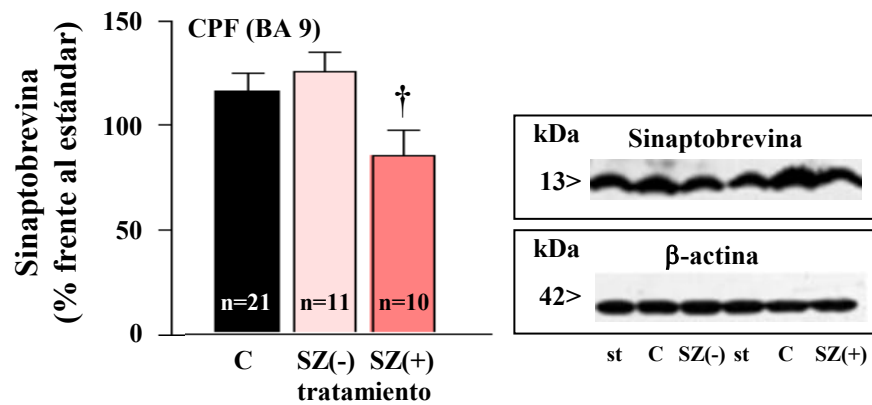


Figura 4.15. Expresión proteica de sinaptobrevina en corteza prefrontal de individuos control (C), individuos con esquizofrenia no tratados [SZ(-)] y tratados con antipsicóticos [SZ(+)]. Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100% conjunto de 22 muestras de individuos control). † $p < 0,05$ al comparar los individuos con esquizofrenia tratados con antipsicóticos frente al grupo de individuos con esquizofrenia libres de tratamiento (ANOVA de una vía seguido del análisis *post-hoc* mediante el test de Bonferroni). Derecha: Imágenes representativas de sinaptobrevina y β -actina, en los que se incluye las muestras estándar (st).

4.1.5.4. Evaluación del efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión proteica de SNAP-25 en corteza prefrontal

No se encontraron cambios significativos en la expresión proteica de SNAP-25 al comparar los tres grupos de estudio ($F [2,45] = 1,93$; $p = 0,1568$) (Figura 4.16).

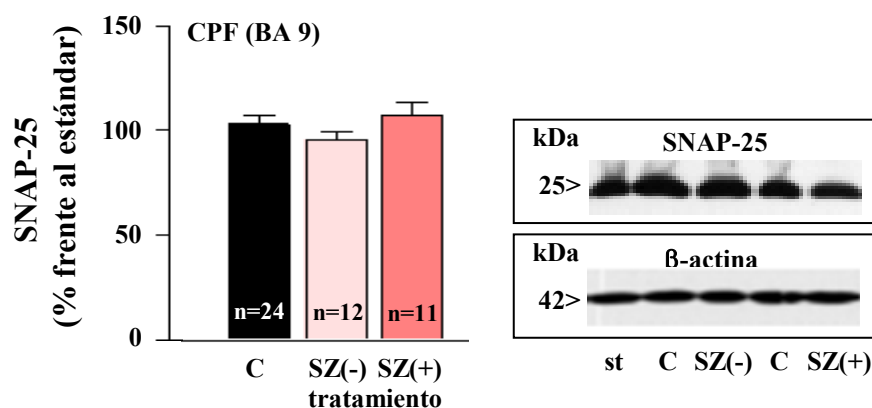


Figura 4.16. Expresión proteica de SNAP-25 en corteza prefrontal de individuos control (C), individuos con esquizofrenia no tratados [SZ(-)] y tratados con antipsicóticos [SZ(+)]. Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100% conjunto de 22 muestras de individuos control). Derecha: Imágenes representativas de SNAP-25 y β -actina, en los que se incluye las muestras estándar (st).

4.1.5.5. Evaluación del efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión proteica de sinaptotagmina en corteza prefrontal

No se encontraron cambios significativos en la expresión de sinaptotagmina entre los grupos control, individuos con esquizofrenia libres de tratamiento e individuos con esquizofrenia tratados con antipsicóticos ($F [2, 44]= 2,81, p= 0,0708$) (Figura 4.17).

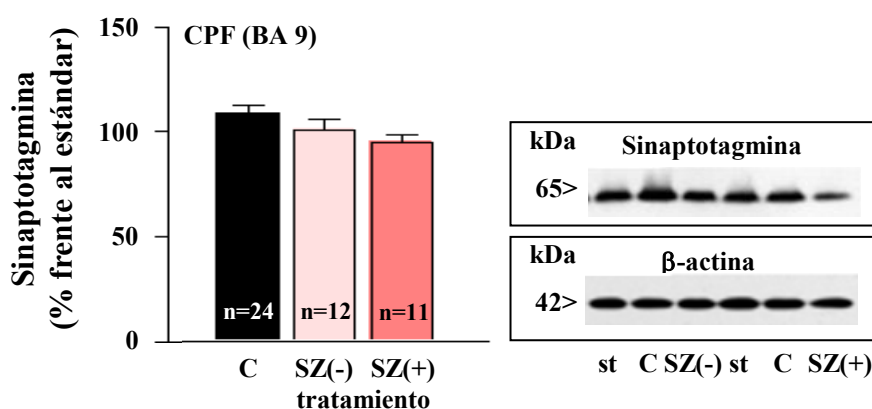


Figura 4.17. Expresión proteica de sinaptotagmina en corteza prefrontal de individuos control (C), individuos con esquizofrenia no tratados [SZ(-)] y tratados con antipsicóticos [SZ(+)]. Las barras representan la media \pm SEM de los porcentajes frente al estándar del gel (100% conjunto de 22 muestras de individuos control). Derecha: Imágenes representativas de sinaptotagmina y β -actina, en los que se incluye las muestras estándar (st).

4.1.5.6. Evaluación del efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión proteica de sinaptofisina en corteza prefrontal

Por último, no se observaron cambios significativos entre la expresión proteica de sinaptofisina en los individuos con esquizofrenia con o sin tratamiento frente a los individuos control ($F [2, 45]= 0,44, p= 0,6449$) (Figura 4.18).

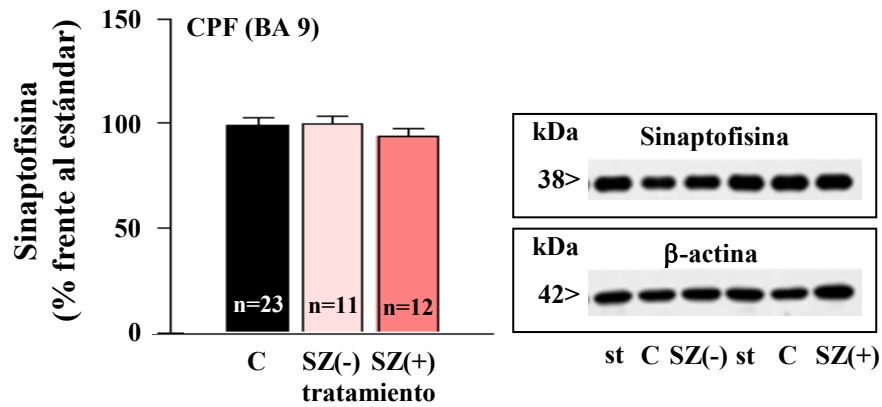


Figura 4.18. Expresión proteica de sinaptofisina en corteza prefrontal de individuos control (C), individuos con esquizofrenia no tratados [SZ(-)] y tratados con antipsicóticos [SZ(+)]. Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100% conjunto de 22 muestras de individuos control). *Derecha:* Imágenes representativas de sinaptofisina y β -actina, en los que se incluye las muestras estándar (st).

4.1.6. Evaluación de la relación entre la expresión de munc18-1a y otras proteínas presinápticas en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia y sus controles

Con el fin de describir la posible relación entre la expresión de munc18-1a y munc18-1b en la esquizofrenia, se realizaron análisis de correlación entre la expresión de ambas isoformas. Los resultados mostraron que existe una correlación positiva entre las dos isoformas en la corteza prefrontal de individuos control ($r= 0,42$, $p= 0,04$, $n= 22$). Sin embargo, esta relación no se observó en el grupo de individuos con esquizofrenia (Figura 4.19).

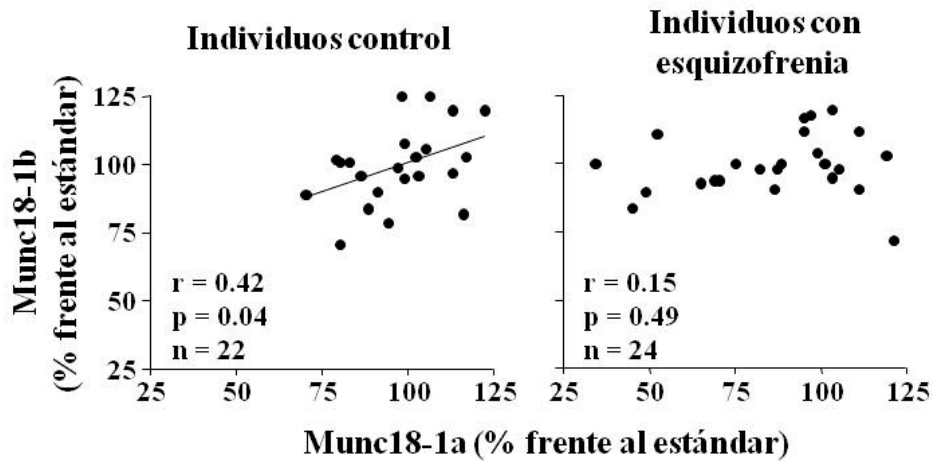


Figura 4.19. Diagramas de dispersión representando la relación entre el contenido de las proteínas munc18-1a y munc18-1b en corteza prefrontal (BA9) de individuos control (izquierda) y individuos con esquizofrenia (derecha).

Se ha descrito una interacción entre las proteínas munc18-1 y sintaxina-1A, de tal forma que dependiendo de la conformación de sintaxina-1A, dicha interacción varía. Cuando sintaxina-1A interactúa con munc18-1 no puede unirse a sinaptobrevina y SNAP-25 para formar el complejo SNARE y permitir la liberación de neurotransmisores.

Por todo ello, se evaluó la relación entre las inmunodensidades de munc18-1 y sintaxina-1A de las muestras de tejido *postmortem* de los individuos con esquizofrenia y sus controles. Se observó una correlación positiva entre la densidad proteica de la isoforma munc18-1a y la sintaxina-1A en los individuos control. Esta correlación no se observó entre la isoforma munc18-1b y la sintaxina-1A. Cuando se cuantificó la densidad de la isoforma munc18-1a y de la sintaxina-1A en individuos con esquizofrenia, se observó una correlación negativa (todos los individuos con esquizofrenia: $r = -0,45$, $p = 0,02$, $n = 22$), independientemente del tratamiento antipsicótico (no-tratados: $r = -0,76$, $p = 0,004$, $n = 12$; tratados: $r = -0,67$, $p = 0,02$, $n = 11$) (Figura 4.20). Además, en los individuos con esquizofrenia se observó un incremento neto significativo ($F [2,44] = 6,24$; $p = 0,004$ seguido de análisis *post-hoc* mediante test de Bonferroni] en el ratio sintaxina-1A/munc18-1a [controles (C): $1,04 \pm 0,07$, $n = 23$; no-tratados SZ(-): $1,76 \pm 0,28$, $n = 12$; tratados SZ(+): $1,92 \pm 0,33$, $n = 12$].

Por el contrario, no se encontró ninguna relación entre la densidad de munc18-1b y sintaxina-1A en el grupo de individuos con esquizofrenia (todos los individuos con esquizofrenia SZ: $r = 0,09$, $p = 0,68$, $n = 23$; no-tratados SZ(-): $r = -0,10$, $p = 0,77$, $n = 12$; tratados SZ(+): $r = -0,05$, $p = 0,89$, $n = 11$) (Figura 4.20).

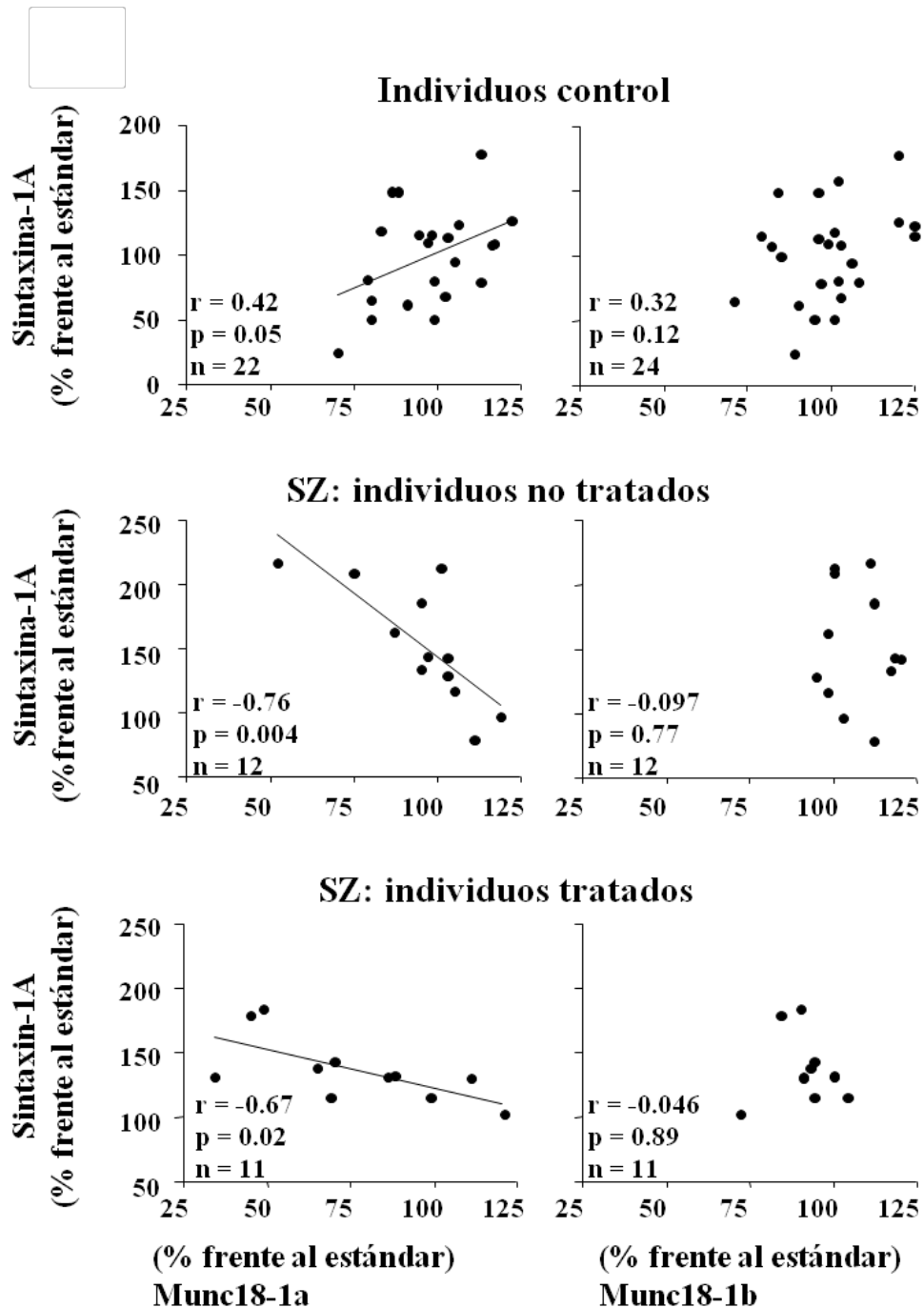


Figura 4.20. Relación entre munc18-1a (izquierda) o munc18-1b (derecha) y el contenido de sintaxina-1A en la corteza prefrontal de individuos control, individuos con esquizofrenia (SZ) tratados y no tratados con antipsicóticos. Se presentan los valores de coeficiente de correlación de Pearson, valores p y número de individuos. En los casos significativos se presenta la recta de regresión.

4.1.7. Evaluación de la expresión proteica de munc18-1, syntaxina-1A y otras proteínas presinápticas en corteza prefrontal de individuos con depresión mayor y sus respectivos controles

Con el objetivo de comprobar si los cambios observados en esquizofrenia eran específicos de dicha entidad o, por el contrario, comunes a otras enfermedades mentales, se evaluó la expresión proteica de las proteínas presinápticas en corteza prefrontal *postmortem* de una población de individuos con depresión mayor y sus controles.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de ninguna de las proteínas estudiadas (munc18-1a, munc18-1b, syntaxina-1, SNAP-25, sinaptobrevina, sinaptotagmina y sinaptofisina) entre los individuos con depresión mayor, independientemente de la presencia o no de tratamiento antidepresivo, al compararlos con sus controles emparejados (Figura 4.21).

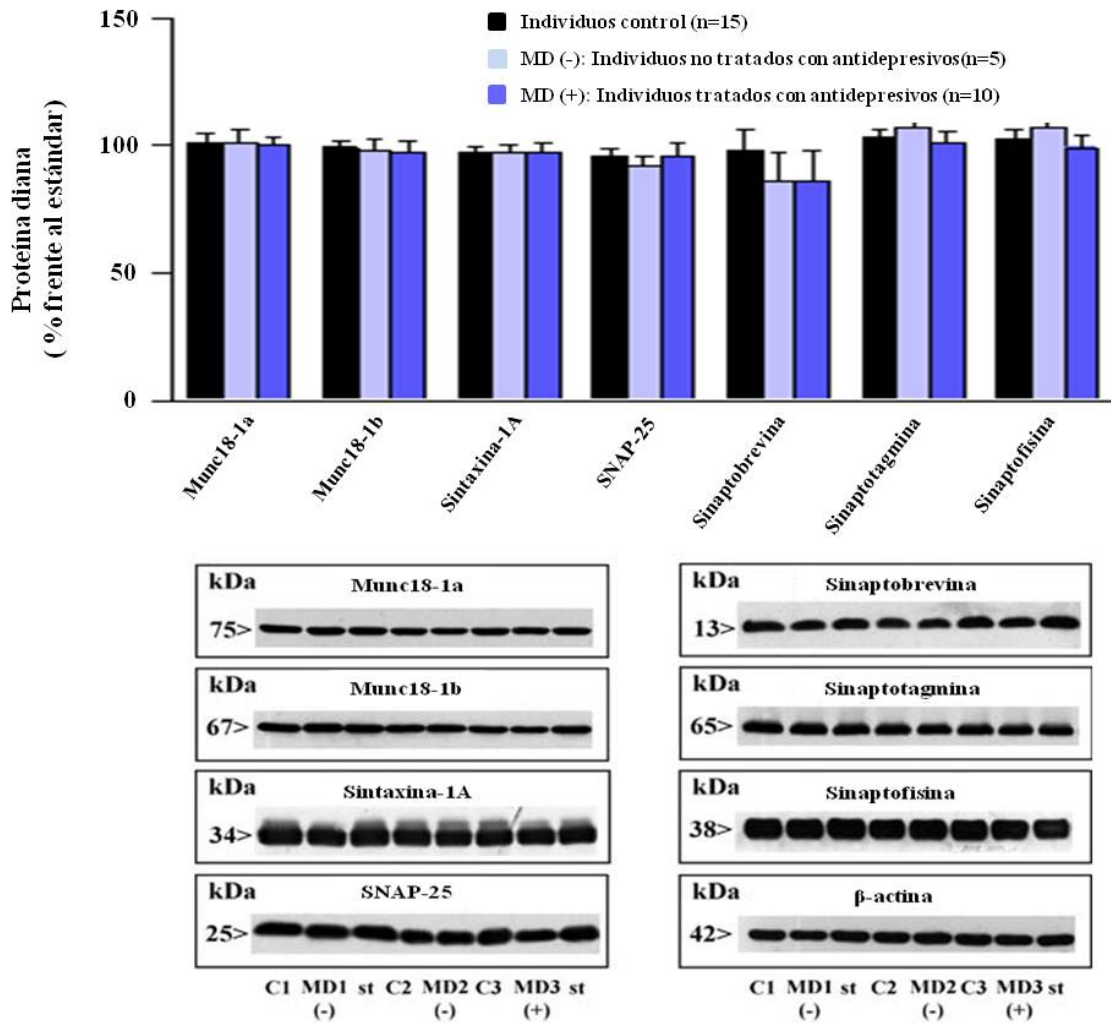


Figura 4.21. Expresión proteica de munc18-1a, munc18-1b, sintaxina-1A, SNAP-25, sinaptobrevina, sinaptotagmina y sinaptofisina en corteza prefrontal de individuos control (C, n= 15) e individuos con depresión mayor sin tratamiento con antidepresivos [MD(-), n= 5] y tratados con antidepresivos [MD(+), n= 10], las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100 %, conjunto de 15 muestras control). *Abajo:* imágenes representativas de munc18-1a, munc18-1b, sintaxina-1A, SNAP-25, sinaptobrevina, sinaptotagmina, sinaptofisina y β -actina, muestras estándar (st) y muestras de individuos emparejados C, MD(-) y MD(+).

4.1.8. Evaluación del complejo SNARE: degradación *postmortem* y distribución en sustancia gris y blanca

La formación del complejo SNARE es un proceso esencial para la liberación de neurotransmisores en el botón sináptico. Por ello, se realizó la cuantificación de este heterocomplejo formado por sintaxina-1A, sinaptobrevina y SNAP-25. Al interactuar

estas tres proteínas, se facilita la fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática para que se liberen los neurotransmisores a la hendidura sináptica.

4.1.8.1. Evaluación del complejo SNARE: degradación *postmortem*

Tanto en corteza cerebral de rata como de humano (BA9), se detectaron distintas formas del complejo SNARE (~75 kDa y ~110 kDa de peso molecular) mediante la utilización de anticuerpos específicos para las proteínas que componen el complejo (syntaxina-1A, SNAP-25 y sinaptobrevina) (Figura 4.22). La forma de ~75 kDa (detectada con los tres anticuerpos contra las proteínas que forman el complejo) es la que más se aproxima al peso molecular (~72kDa) esperado para este heterotrímero, pudiendo estar las formas de mayor peso molecular (~110 kDa) relacionadas con modificaciones post-transcripcionales de algunos de sus componentes.

Para cuantificar las diferentes formas del complejo SNARE, se utilizaron muestras no desnaturalizadas de cerebro de rata, y muestras desnaturalizadas y no desnaturalizadas de cerebro humano con objeto de visualizar la estabilidad el complejo. Para realizar este proceso se utilizó el agente ditioneitol o DTT ya que rompe los puentes disulfuro de las estructuras proteicas. La desnaturalización de las muestras cerebrales (CPF humana) rompió los complejos SNARE (detectado con el anticuerpo anti-SNAP-25) y aumentó la expresión de la forma monomérica de la proteína (Figura 4.22). En las muestras tratadas con DTT (200 mM), se observó una disminución de la expresión de las formas de ~75 kDa y ~110 kDa. Esta disminución también se observó después del tratamiento con urea desnaturalizante (6 M) o tras un proceso de congelación/descongelación. Consecuentemente, las formas monoméricas de sinaptobrevina (5-52%), syntaxina-1A (6-35%) y SNAP-25 (63-160%) se incrementaron (Figura 4.22).

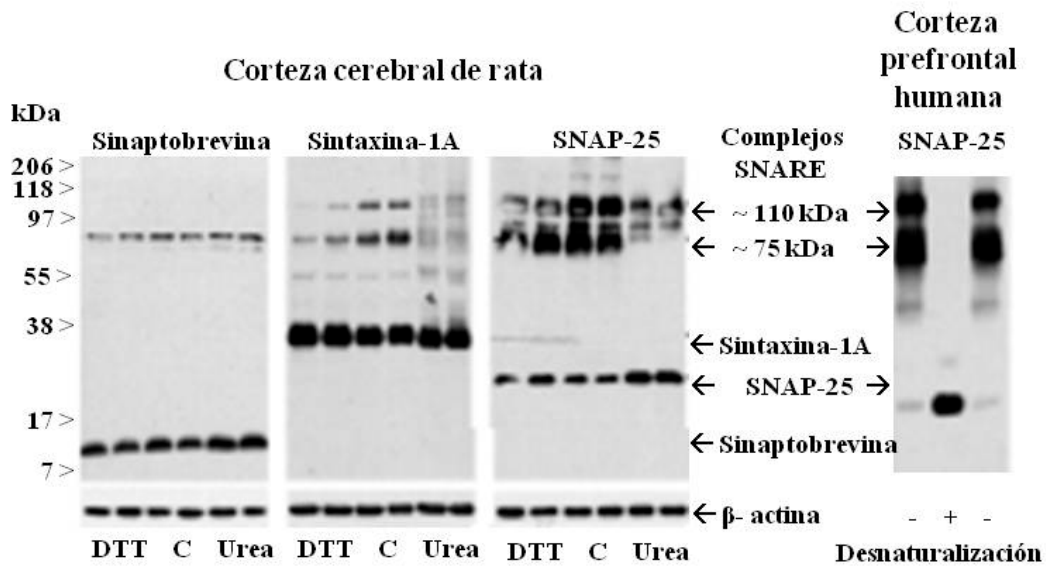


Figura 4.22. Detección y caracterización de las formas del complejo SNARE (~75 kDa y ~110 kDa) en corteza cerebral de rata (homogeneizado total: 40 µg de proteína) y corteza prefrontal humana (conjunto de 22 controles: 40 µg de proteína) con los anticuerpos anti-sinaptobrevina, anti-sintaxina-1A y anti-SNAP-25. En cerebro de rata (C, muestras control), el desacople de los complejos SNARE se logró mediante manipulación química con ditioneitol (DTT, 200 mM) o urea (6 M) seguido de un proceso de congelación/descongelación.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al evaluar la expresión del complejo SNARE de ~75 kDa a lo largo de todo el rango de intervalo *postmortem* (IPM: 5-102 horas), cuantificado con los anticuerpos anti-sinaptobrevina, anti-sintaxina-1A y anti-SNAP-25, sugiriendo que el heterotrímero es altamente resistente a desacople *postmortem* y/o degradación específica (Figura 4.23).

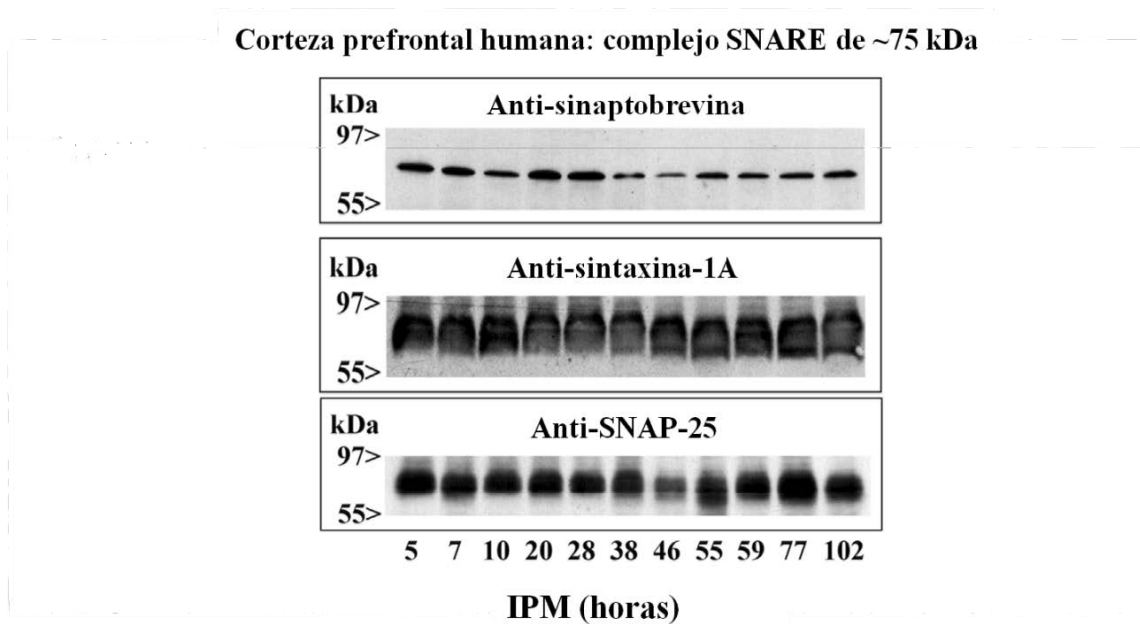


Figura 4.23. Efecto del IPM (rango: 5-102 h) en la expresión del complejo SNARE de ~75 kDa en la corteza prefrontal de individuos control (8 hombres, 3 mujeres; rango de edad: 15- 52 años) cuantificado con los anticuerpos anti-sinaptobrevina ($r = -0,48$, $p = 0,14$), anti-sintaxina-1A ($r = 0,16$, $p = 0,62$) y anti-SNAP-25 ($r = 0,30$, $p = 0,38$).

4.1.8.2. Evaluación del complejo SNARE: distribución subcelular

A nivel subcelular, el complejo de ~75 kDa (detectado con los anticuerpos anti-sintaxina-1A o anti-SNAP-25) se detectó fundamentalmente en la fracción enriquecida en membranas (F2) tanto de la sustancia gris como de la blanca (Figura 4.24).

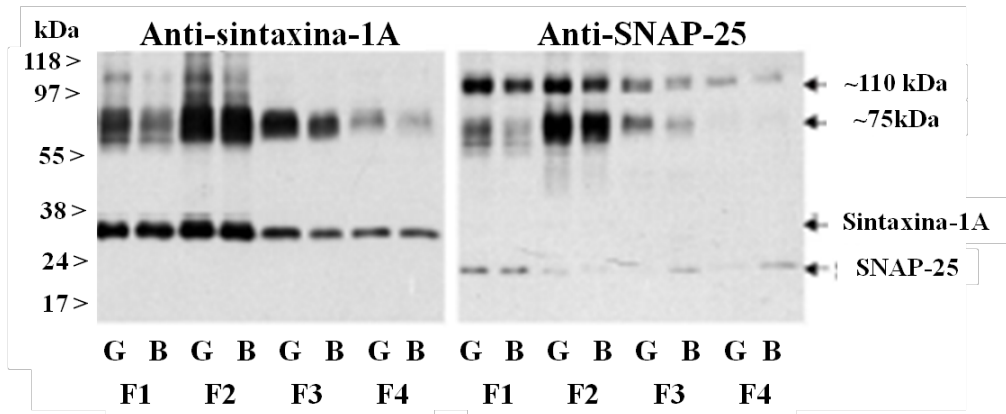


Figura 4.24. Localización subcelular de las formas del complejo de ~75 kDa y ~110 kDa (detectado con los anticuerpos anti-syntaxina-1A y anti-SNAP-25) en sustancia gris (G) y blanca (B) de la corteza prefrontal (sujeto varón, 44 años de edad, IPM 16 h, muestra: 40 μ g de proteína), y sus contenidos relativos en varios compartimentos subcelulares (F1: fracción citosólica; F2: fracción enriquecida en membranas; F3: fracción nuclear y F4: fracción citoesquelética).

4.1.9. Evaluación del complejo SNARE de ~75 kDa en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia e individuos con depresión mayor. Efecto del tratamiento antipsicótico y antidepressivo

El heterocomplejo formado por syntaxina-1A, sinaptobrevina y SNAP-25 en las muestras de individuos con esquizofrenia e individuos con depresión mayor se cuantificó mediante *western blot* utilizando anticuerpos que reconocen las tres proteínas integrantes del complejo.

Se observó una disminución significativa en la expresión de la forma de ~75 kDa del complejo SNARE (cuantificado con el anticuerpo anti-SNAP) en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia al compararlos con los individuos control ($F [2, 58] = 6,53, p = 0,0027$) (Figura 4.25).

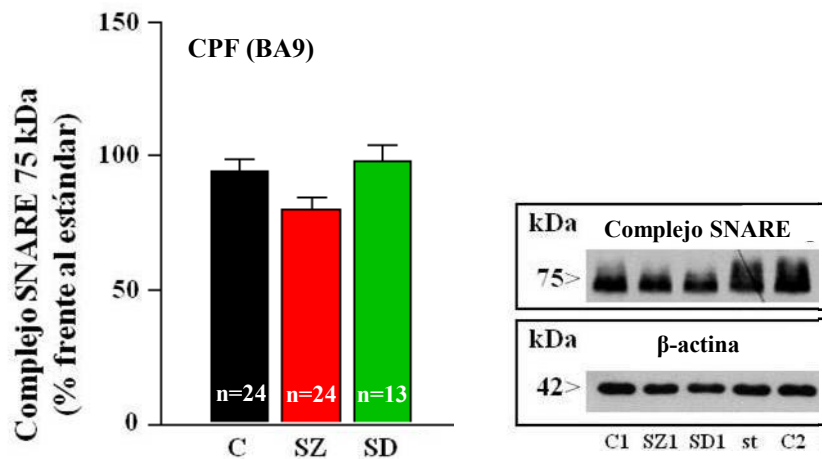


Figura 4.25. Expresión proteica del complejo SNARE de ~75 kDa cuantificado con el anticuerpo anti-SNAP-25 en la corteza prefrontal (CPF/BA9) de controles (C, n= 24), individuos con esquizofrenia (SZ, n= 24) e individuos suicidas sin esquizofrenia (SD, n= 13). Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100%, conjunto de 22 controles). * $p < 0,05$ (ANOVA seguido del análisis *post-hoc* mediante el test de Bonferroni). Derecha: Imágenes representativas del complejo SNARE de ~75 kDa y de β -actina, que incluyen las muestras estándar (st).

Al discriminar entre individuos tratados con antipsicóticos y libres de tratamiento, se observó que dicha reducción era más acusada en las muestras de los individuos con esquizofrenia que habían recibido tratamiento antipsicótico [SZ(-): 11%, $p > 0,05$; SZ(+): 29%]. Además, un efecto del tratamiento antipsicóticos ya que existían diferencias estadísticamente significativas entre individuos con esquizofrenia tratados e individuos con esquizofrenia libres de tratamiento ($F [2,45]=9,75$, $p=0,0003$) (Figura 4.26).

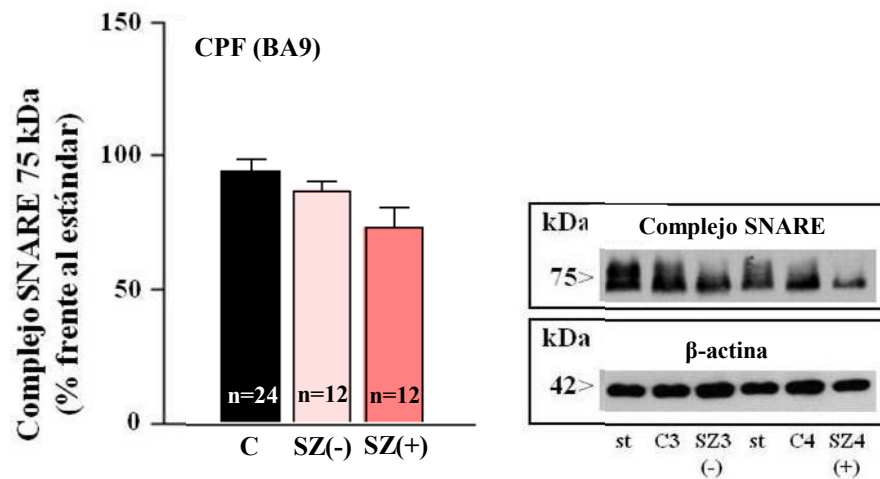


Figura 4.26. Expresión proteica del complejo SNARE de ~75 kDa cuantificado con el anticuerpo anti-SNAP-25 en la corteza prefrontal (CPF/BA9) de controles (C, n= 24), individuos con esquizofrenia no tratados [SZ(-)=12] y tratados con antipsicóticos [SZ(+), n=12]. Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100%, conjunto de 22 controles). ** $p < 0,01$ [SZ(+)] vs C] y † $p < 0,01$ [SZ(+)] vs SZ (-)] (ANOVA seguido del análisis *post-hoc* mediante el test de Bonferroni). Derecha: Imágenes representativas del complejo SNARE de ~75 kDa y de β -actina, que incluyen las muestras estándar (st).

Por el contrario, en las muestras de individuos con depresión mayor no se observaron cambios significativos en la expresión del complejo SNARE a ~75 kDa (cuantificado con el anticuerpo anti-SNAP-25) frente a los individuos control (test *t* de Student ($p=0,0786$)). Al analizar los resultados de los individuos deprimidos tratados con antidepresivos e individuos deprimidos libres de esta clase de fármacos no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía F [2, 28]= 1,75; $p= 0,1935$) (Figura 4.27).

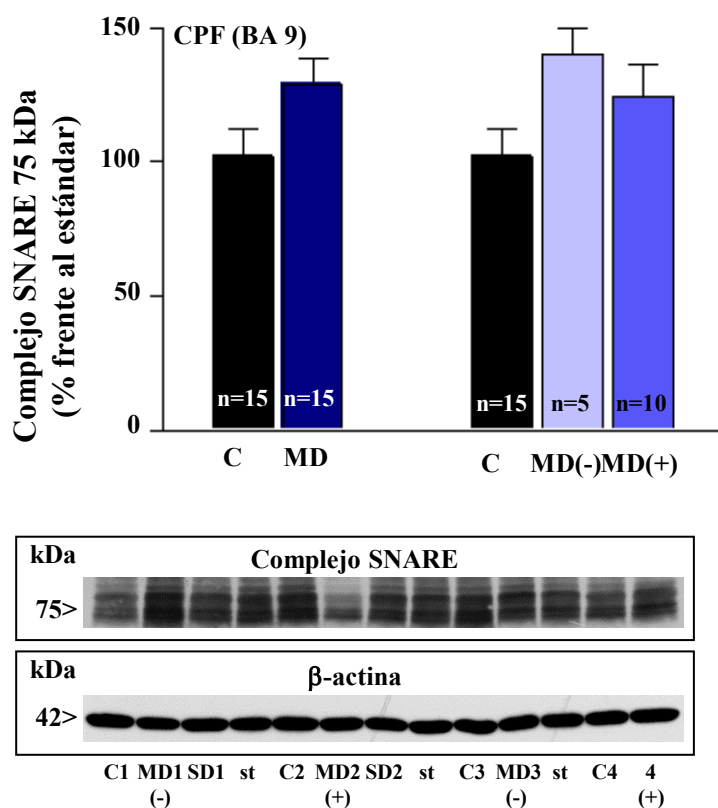


Figura 4.27. Expresión proteica del complejo SNARE de ~75 kDa cuantificado con el anticuerpo anti-SNAP-25 en la corteza prefrontal (CPF/BA9) de controles (C, n= 15) y individuos con depresión mayor (MD, n= 15), así como individuos con depresión no tratados [MD(-), n= 5] y tratados con antidepresivos [MD(+), n= 10]. Las barras representan la media \pm error estándar de los porcentajes frente al estándar del gel (100%, conjunto de 22 controles). *Abajo:* Imágenes representativas del complejo SNARE de ~75 kDa y de β -actina, que incluyen las muestras estándar (st), y muestras de individuos C, MD(-) y MD(+) emparejados.

4.2. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL MUNC18-OE

A continuación se exponen los resultados obtenidos en el proceso de caracterización del modelo animal Munc18-OE.

4.2.1. Evaluación de la expresión génica de munc18-1 mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR)

Los experimentos de qRT-PCR con sondas TaqMan® para la isoforma munc18-1a y los genes *housekeeping* Rps29 y Gadph dieron lugar a unas amplificaciones exponenciales del ADNc en las cuales los ciclos umbral ó *threshold cycles* (Ct) fueron de 23, 21, 22 y 17, respectivamente (Figura 4.28).

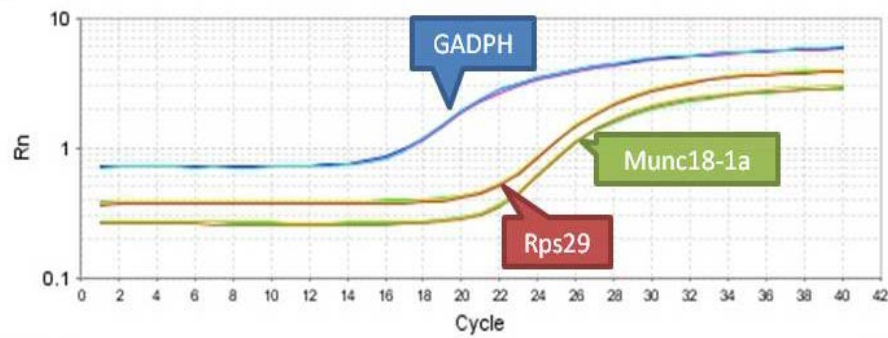


Figura 4.28. Amplificaciones exponenciales de cuantificación relativa de experimentos de qRT-PCR para la isoforma munc18-1a y los dos genes *housekeeping*, GADPH y Rps29.

Para la realización de los estudios de expresión génica se utilizaron sondas comerciales TaqMan® para el gen munc18-1a y para los genes de referencia Gadph y Rsp29.

En la cuantificación de la expresión relativa del ARNm de la munc18-1a se observó un aumento significativo en los animales Munc18-OE respecto a los animales control (55%; *t* de Student: $t = 2,686$; $p = 0,0249$) (Figura 4.29).

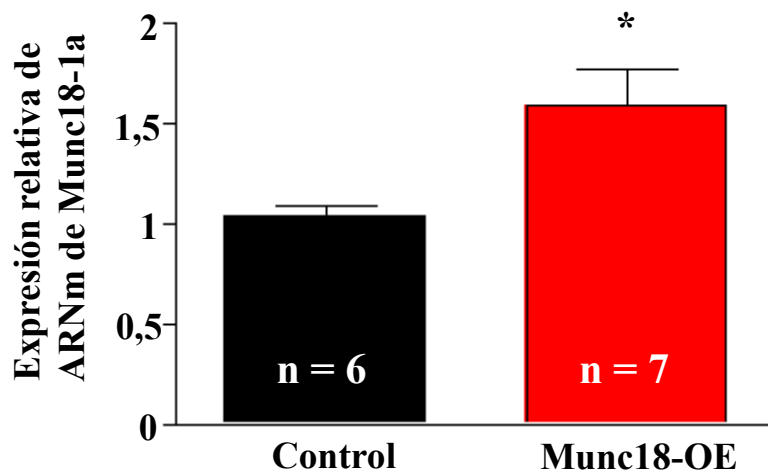


Figura 4.29. Expresión relativa de ARNm de la isoforma munc18-1a de animales Munc18-OE y sus controles. Las columnas representan la media \pm error estándar de valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. * $p < 0,05$ (*t*-test Munc18-OE vs Control).

4.2.2. Evaluación de la expresión proteica munc18-1a

4.2.2.1. Localización anatómica y cuantificación de munc18-1a mediante inmunofluorescencia

Para describir la localización cerebral de la isoforma a de la proteína munc18-1 se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas.

Al ser munc18-1a una proteína que se expresa en diversos tipos de neuronas, su marcaje y cuantificación se llevó a cabo en varias áreas cerebrales (Figura 4.30).

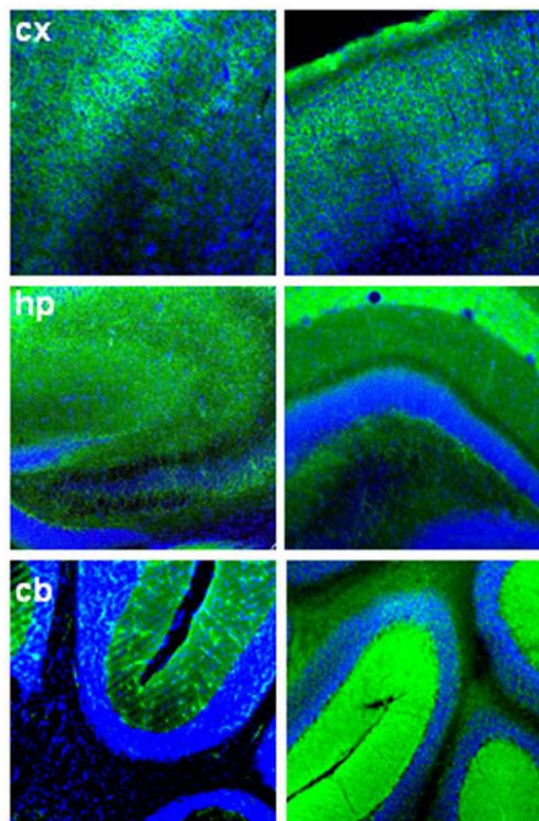


Figura 4.30. Localización de la proteína munc18-1 en animales Munc18-OE (derecha) y en sus controles *wild-type* (izquierda) en diferentes áreas cerebrales (cx: corteza; hp: hipocampo; cb: cerebelo). En todas las imágenes los núcleos celulares están marcados en azul y la isoforma munc18-1a en verde.

Para la cuantificación de la expresión de la isoforma munc18-1a en cerebro mediante técnicas inmunohistoquímicas, se tomaron imágenes en un microscopio de fluorescencia. Dicha expresión fue significativamente superior en los animales Munc18-OE en corteza cerebral (109 %, *t* de Student; $t = 8,18$; $p < 0,001$), hipocampo

(24 %, $t=2,98$; $p= 0,038$) ó cerebelo (203 %, $t= 14,22$; $p< 0,001$). También se observaron diferencias significativas en la expresión de *munc18-1* entre las distintas regiones cerebrales de los animales *Munc18-OE* ($F [3,179]=5,02$; $p= 0,0023$) (Figura 4.31).

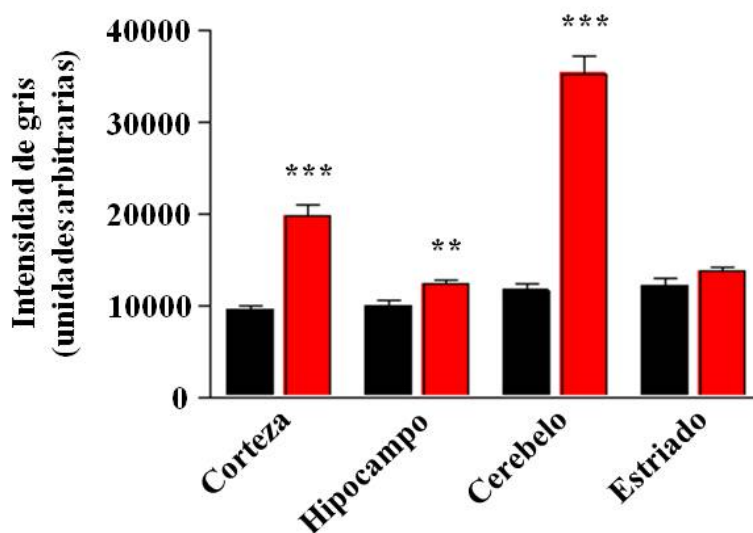


Figura 4.31. Intensidad de gris en diferentes áreas cerebrales de animales *Munc18-OE* (rojo; $n=3$) y sus controles *wild-type* (negro; $n=3$). Las columnas representan la media \pm error estándar de valores de intensidad de gris. Los datos corresponden a 40-60 medidas realizadas por área cerebral. ** $p< 0,01$ y *** $p< 0,001$ frente a animales control.

4.2.2.2. Cuantificación de la expresión de la proteína *munc18-1*

Antes de comenzar las cuantificaciones de las diferentes proteínas de estudio fue necesario realizar una serie de pruebas para optimizar las condiciones del ensayo para cada una de ellas. En primer lugar, se comprobó que el anticuerpo correspondiente detectaba al menos una banda específica, presente en el peso molecular determinado por el diseño del fabricante. Además, se realizó una curva concentración creciente de cada proteína para determinar el rango óptimo para cada una de ellas. Los pesos moleculares tanto de las proteínas diana como de la β -actina, que se utilizó como control de carga, se estimaron a partir de estándares referenciados.

Para determinar la relación entre la concentración de proteína total y la intensidad de fluorescencia de *munc18-1a* y *munc18-1b*, se llevaron a cabo experimentos de *western blot* en un rango de 5-35 μ g, en los cuales se estableció una

relación lineal entre los dos parámetros. Estas observaciones permitieron fijar en 10 μg el contenido proteico óptimo para llevar a cabo los experimentos de cuantificación (Figura 4.32).

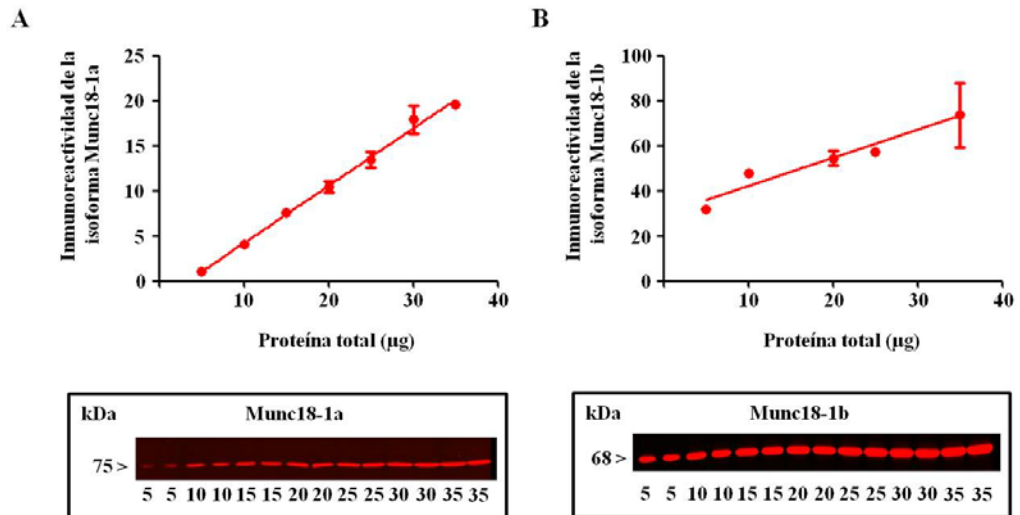


Figura 4.32. Expresión proteica de las isoformas munc18-1a y munc18-1b en contenido proteico total creciente. Para ambas isoformas, se cargaron de 5 a 35 μg de proteína total en el mismo gel obteniendo como resultado un aumento en la fluorescencia. (A) La isoforma munc18-1a, se saturó a una concentración de 30 μg de proteína total ($r^2= 0,982$). (B) La isoforma munc18-1b no se consiguió saturar en el rango establecido ($r^2= 0,965$). Las gráficas muestran la relación lineal entre en contenido de proteína total y la fluorescencia de ambas isoformas de munc18-1 de experimentos representativos. *Abajo:* imágenes representativas.

Se observó un aumento estadísticamente significativo de la proteína munc18-1a ya que los animales control presentaron valores de $100 \pm 4 \%$ mientras que los de los animales Munc18-OE fueron superiores ($125 \pm 5 \%$) (t de Student; $t=3,764$; $p=0,0031$) (Figura 4.33A).

Sin embargo, no se encontraron diferencias en la densidad de la isoforma munc18-1b en esos mismos animales. Los valores mostrados por los animales control fueron de $100 \pm 6 \%$ y los valores de los animales Munc18-OE $98 \pm 4 \%$ (t de Student; $t=0,3227$; $p=0,7530$) (Figura 4.33B).

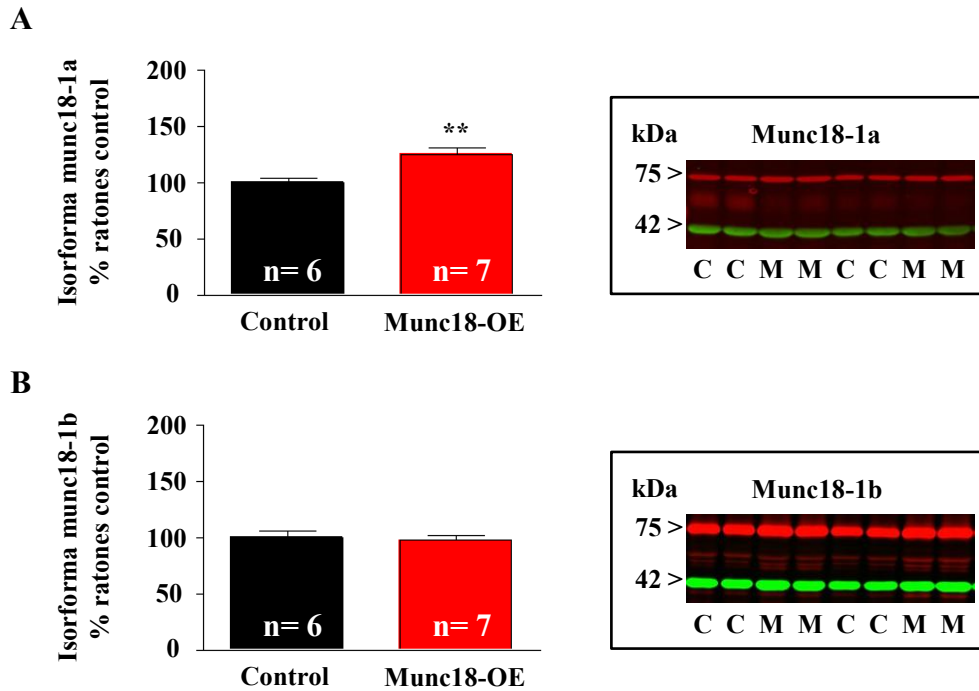


Figura 4.33. Expresión proteica de (A) munc18-1a y (B) munc18-1b en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M) y sus controles *wild-type* (C). Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje de niveles de inmunodensidad respecto a los animales control. ** $p < 0,01$ (t -test; Munc18-OE vs Control). Derecha: imágenes representativas de las inmunodensidades (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

4.2.2.3. Cuantificación de la expresión génica y proteica de munc18-1 tras la administración aguda de clozapina

Se realizó una administración aguda de clozapina a dosis de 1 mg/kg por vía i.p. con el objetivo de evaluar el efecto del antipsicótico sobre la expresión de munc18-1.

A nivel de ARN mensajero, una dosis aguda de clozapina indujo una disminución tanto en animales control como en animales Munc18-OE ($F[1,15]= 10,09$; $p= 0,0063$). En el caso de los animales transgénicos esta disminución fue estadísticamente significativa tras realizar un análisis *post-hoc* de Bonferroni ($p=0,0119$). En este caso, se observó que el genotipo del animal también influía significativamente en los resultados ($F[1,15]= 6,581$; $p= 0,0215$). Sin embargo, no se observó una interacción entre genotipo y el tratamiento administrado ($F[1,15]= 0,584$; $p=0,4512$) (Figura 4.34).

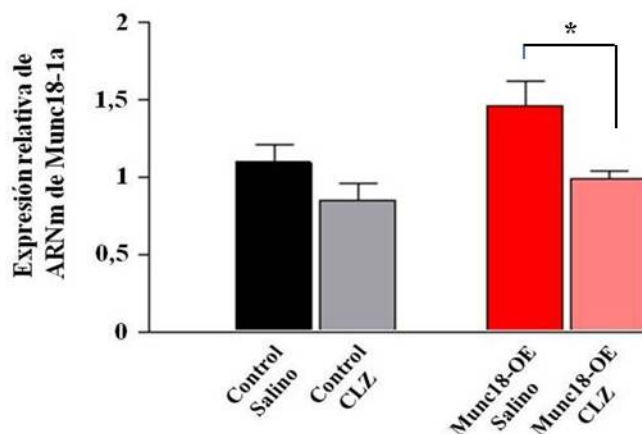


Figura 4.34. Expresión relativa de ARNm de la isoforma munc18-1a en corteza cerebral de animales *wild-type* y Munc18-OE tras la administración aguda con suero salino i.p (● n=5, ● n=4; respectivamente), así como la inyección aguda de clozapina 1 mg/kg i.p (● n=5, ● n=4; respectivamente) (ANOVA de dos vías seguida de análisis *post-hoc* mediante el test de Bonferroni). Las columnas representan la media \pm error estándar de valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. * $p < 0,05$.

Una vez analizada la expresión a nivel de ARN mensajero se procedió a realizar la evaluación de la expresión proteica de las isoformas de la proteína munc18-1. En caso de munc18-1a, existía una relación entre el genotipo (si el animal era transgénico o no) y el tratamiento administrado (si el animal había sido tratado con suero salino o con clozapina 1mg/kg), es decir que el tratamiento con clozapina afectó de diferente manera dependiendo del genotipo del animal al que se le administra la dosis $F[1,26]=8,463$, $p=0,0073$). Además, el factor genotipo ($F[1,26]=6,170$, $p=0,0198$) y el factor tratamiento administrado ($F[1,26]=8,463$, $p=0,0073$) influenciaron significativamente en los resultados. El análisis *post-hoc* de Bonferroni mostró un aumento estadísticamente significativo de la inmunoreactividad de munc18-1a en los animales Munc18-OE tratados con suero salino al 0,9% frente a los animales control tratados con esta misma solución (aumento de 87%; $p=0,0021$) y una disminución estadísticamente significativa en los animales Munc18-OE tratados con clozapina frente a los que habían recibido una administración de suero salino (disminución del 94%; $p=0,009$) (Figura 4.35).

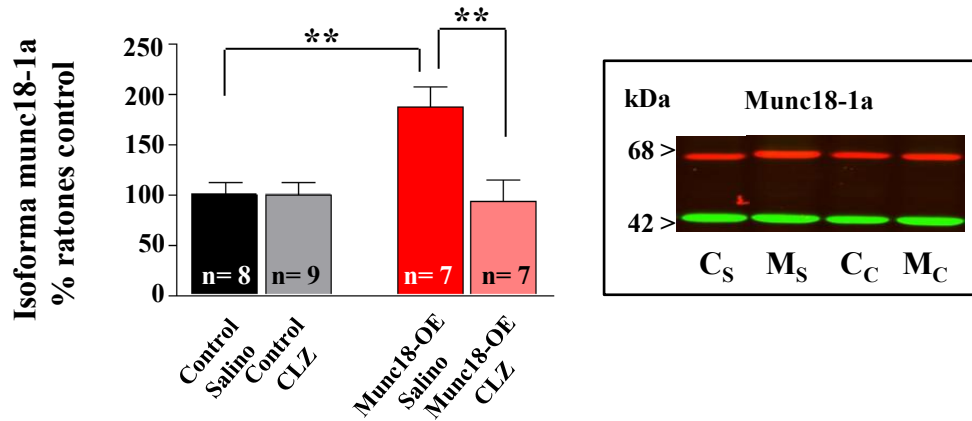


Figura 4.35. Expresión proteica de la isoforma munc18-1a en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M_S) y sus controles *wild-type* (C_S) tras administración aguda de suero salino i.p. y animales Munc18-OE (M_C) y sus controles *wild-type* (C_C) tras inyección aguda de clozapina 1 mg/kg i.p. Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje de niveles de inmunodensidad respecto a los de los animales control tratados con suero salino (ANOVA de dos vías seguida de análisis *post-hoc* mediante el test de Bonferroni). ** $p < 0,01$. Derecha: imágenes representativas de las inmunodensidades (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

Con respecto a la isoforma b de la proteína munc18-1, tras realizar un análisis de varianzas de dos vías, no se observaron cambios significativos influenciados ni por el genotipo del animal ($F[1,27] = 0,1955$, $p = 0,6619$), ni por el tratamiento administrado ($F[1,27] = 0,1349$, $p = 0,7163$) ni por la interacción entre ambos factores ($F[1,27] = 0,4651$, $p = 0,5011$) (Figura 4.36).

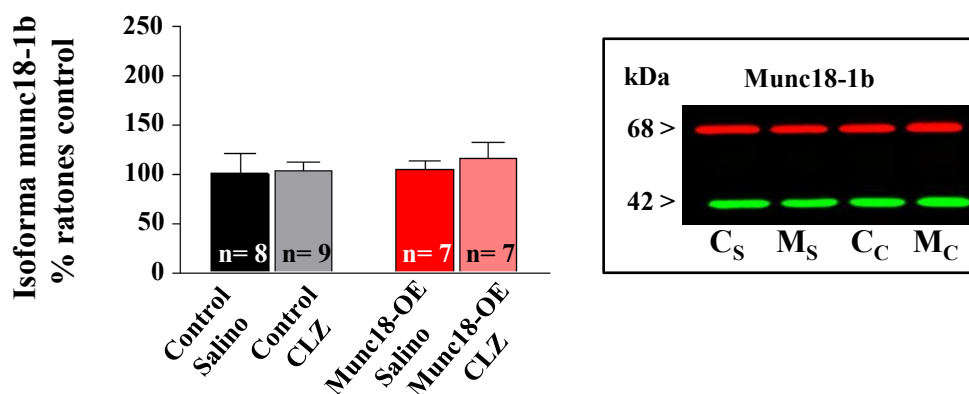


Figura 4.36. Expresión proteica de la isoforma munc18-1b en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M_S) y sus controles *wild-type* (C_S) tras administración aguda de suero salino i.p. y animales Munc18-OE (M_C) y sus controles *wild-type* (C_C) tras inyección aguda de clozapina 1 mg/kg i.p.. Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje de niveles de inmunodensidad respecto a los de animales control tratados con salino. Derecha: imágenes representativas (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

4.2.3. Evaluación de la expresión de las proteínas presinápticas en el modelo animal Munc18-OE

4.2.3.1. Proteínas del complejo SNARE

Tal y como se ha descrito en apartados anteriores, el complejo SNARE está formado por tres proteínas: sintaxina-1A, sinaptobrevina y SNAP-25 y en este caso también se realizaron pruebas para optimizar las condiciones del ensayo para cada una de ellas. En primer lugar, se comprobó que el anticuerpo correspondiente detectaba al menos una banda específica, presente en el peso molecular determinado por el diseño del fabricante. Además, se llevó a cabo una curva concentración creciente de cada proteína para determinar el rango óptimo para cada una de ellas. Los pesos moleculares tanto de las proteínas diana como de la β -actina, que se utilizó como control de carga, se estimaron a partir de estándares referenciados.

Con respecto a las proteínas que forman el complejo SNARE, sintaxina-1A, sinaptobrevina y SNAP-25, el contenido proteico elegido para realizar los experimentos de inmunodetección y cuantificación proteica fue de de 10 μ g de proteína en los tres casos (Figura 4.37).

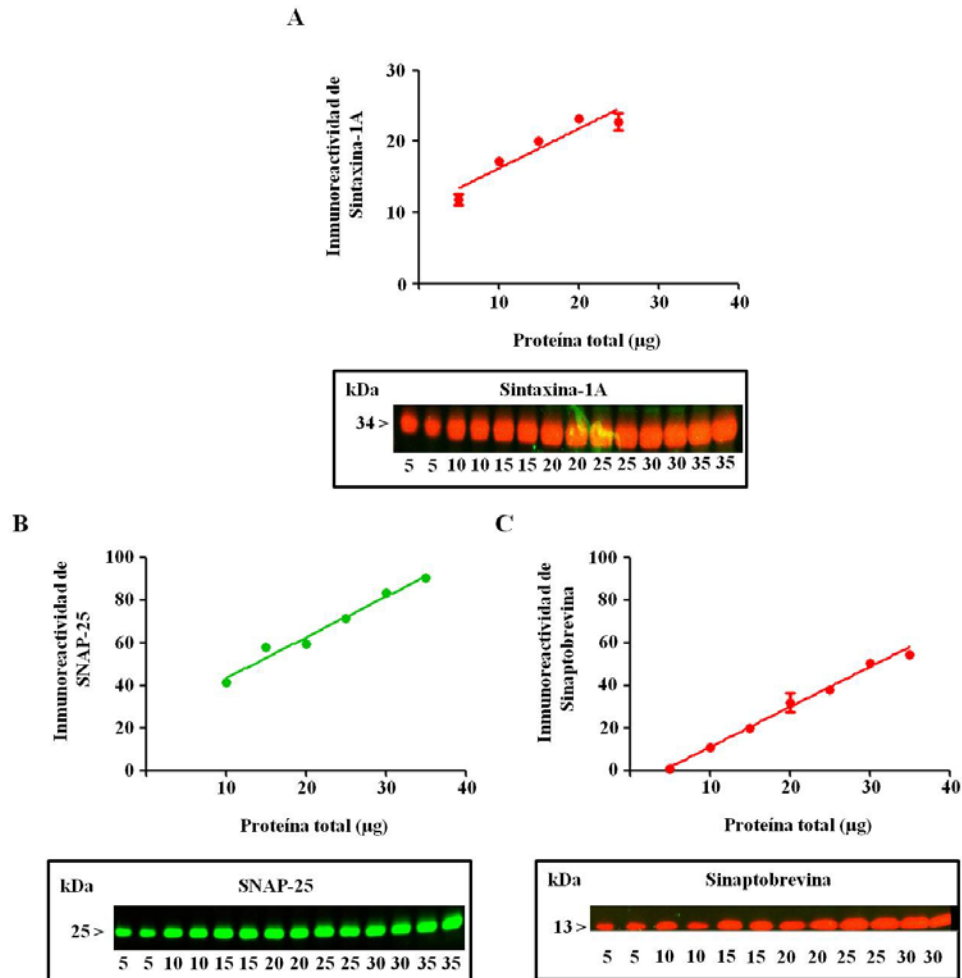


Figura 4.37. Expresión proteica de las proteínas que forman el complejo SNARE (A) sintaxina-1A, (B) SNAP-25 y (C) sinaptobrevina en contenido proteico total creciente. Las gráficas muestran la relación lineal entre en contenido de proteína total y la fluorescencia que tuvieron unos valores r^2 de 0,867; 0,969 y 0,980, respectivamente. *Abajo:* imágenes representativas.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión proteica de estas proteínas en los animales Munc18-OE al compararlos con sus controles *wild-type*.

En el caso de sintaxina-1A los animales control presentaron un valor de 97 ± 5 % mientras que los datos de los animales Munc18-OE fueron de 101 ± 6 % (*t* de Student; $t = 0,512$; $p = 0,6166$) (Figura 4.38A).

Con respecto a sinaptobrevina los valores presentados por los animales control fueron 100 ± 7 % y los de los animales Munc18-OE 109 ± 9 % (*t* de Student; $t = 0,889$; $p = 0,3888$) (Figura 4.38B).

Por último, los datos de SNAP-25 fueron de 100 ± 24 % en el caso de los animales control y en el caso de los animales Munc18-OE de 112 ± 22 % (*t* de Student; $t = 0,3563$; $p = 0,7284$) (Figura 4.38C).

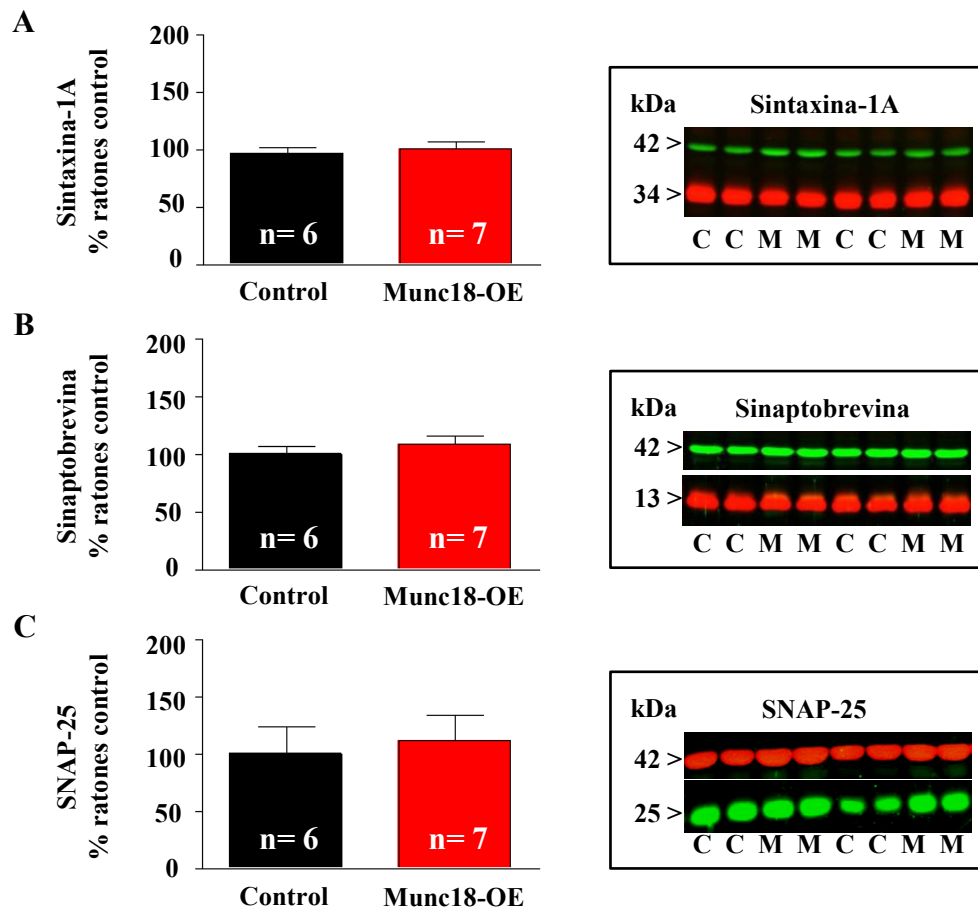


Figura 4.38. Expresión proteica de (A) sintaxina-1A, (B) sinaptobrevina y (C) SNAP-25 en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M) y sus controles *wild-type* (C). Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje de niveles de inmunodensidad respecto a los de animales control (*t*-test, Munc18-OE vs Control). Derecha: imágenes representativas (proteína de interés en rojo y β -actina en verde para el caso de sintaxina-1A y sinaptobrevina; en el caso de SNAP-25 la proteína de interés se visualiza en verde y la β -actina en rojo).

4.2.3.2. Proteínas sinaptotagmina y sinaptofisina

Se cuantificaron dos proteínas presinápticas más: sinaptotagmina y sinaptofisina. En este caso, tras realizar el cálculo del contenido proteico total creciente, también se eligió la cantidad de $10 \mu\text{g}$ de proteína para llevar a cabo los experimentos (Figura 4.39).

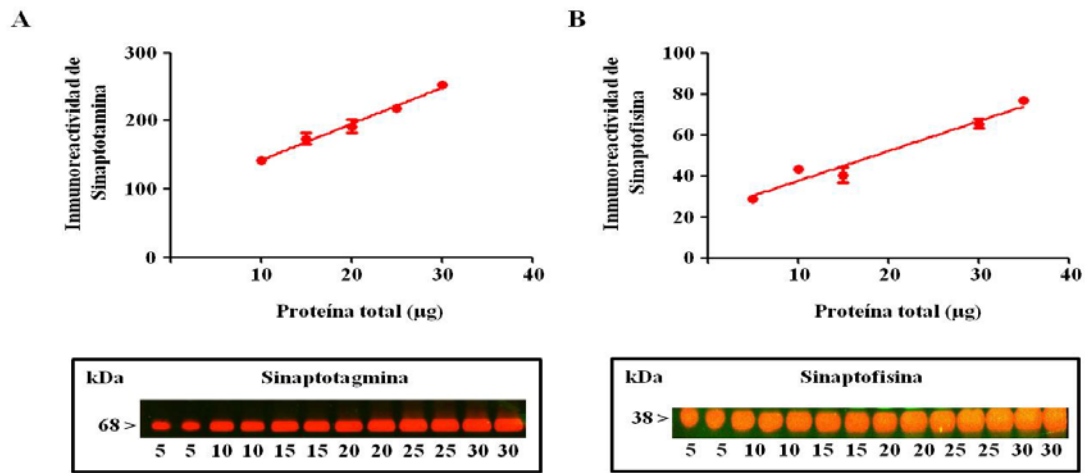


Figura 4.39. Expresión proteica de las proteínas presinápticas (A) sinaptotagmina y (B) sinaptofisina en contenido proteico total creciente. Las gráficas muestran la relación lineal entre en contenido de proteína total y la fluorescencia que tuvieron unos valores r^2 de 0,965 y 0,938, respectivamente. *Abajo:* imágenes representativas de ambas proteínas.

En la cuantificación de la expresión proteica de sinaptotagmina no se obtuvieron diferencias significativas ya que los animales control tenían unos valores de $100 \pm 9\%$ y los animales Munc18-OE unos valores de $94 \pm 6\%$ (t de Student; $t = 0,5641$; $p = 0,5840$) (Figura 4.40A).

En el caso de la proteína sinaptofisina los animales control presentaron unos valores de $100 \pm 7\%$ mientras que los animales Munc18-OE tenían unos valores de $85 \pm 4\%$ por lo que no se observaron cambios estadísticamente significativos en la cuantificación de esta proteína (t de Student; $t = 1,801$; $p = 0,0911$) (Figura 4.40B).

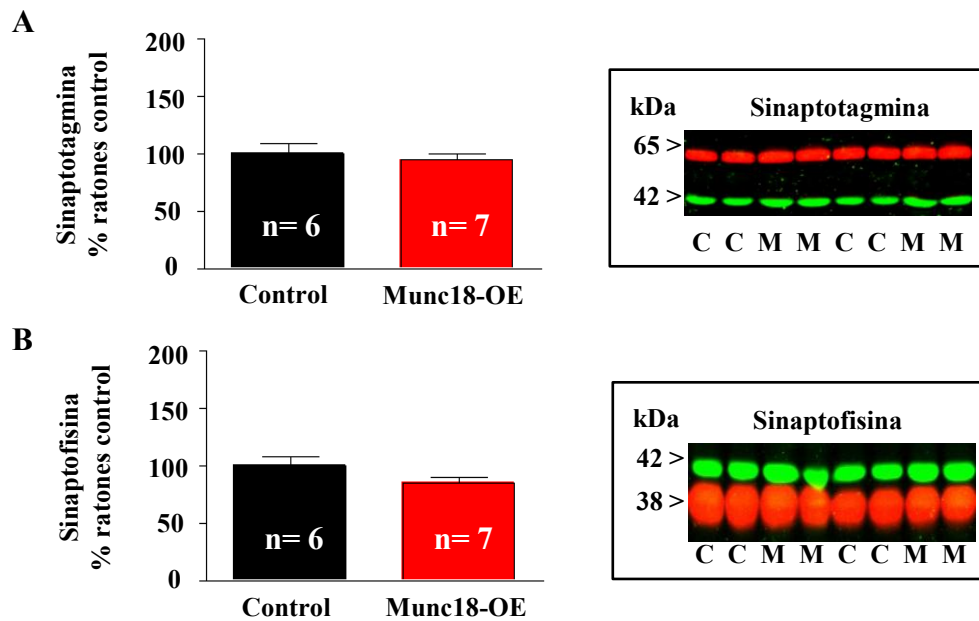


Figura 4.40. Expresión proteica de (A) sinaptotagmina y (B) sinaptofisina en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M) y sus controles *wild-type* (C). Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje de niveles de inmunodensidad respecto a los de animales control (*t*-test, Munc18-OE vs Control). Derecha: imágenes representativas (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

4.2.4. Evaluación de la expresión proteica de las proteínas que fosforilan munc18-1

La fosforilación proteica es un proceso relevante ya que permite activar o desactivar proteínas. En el caso de la fosforilación de munc18-1, existen dos proteínas capaces de realizar su activación: la quinasa dependiente de ciclina-5 o Cdk 5 (*Cyclin-dependent kinase 5*) y la proteincinasa C ó PKC (*Protein Kinase C*).

En el caso de las proteínas Cdk5 y PKC, también se realizó una curva para calcular el contenido proteico óptimo para la inmunodetección de estas dos proteínas. En ambos casos, se decidió llevar a cabo los experimentos con la cantidad de 10 μ g de proteína (Figura 4.41).

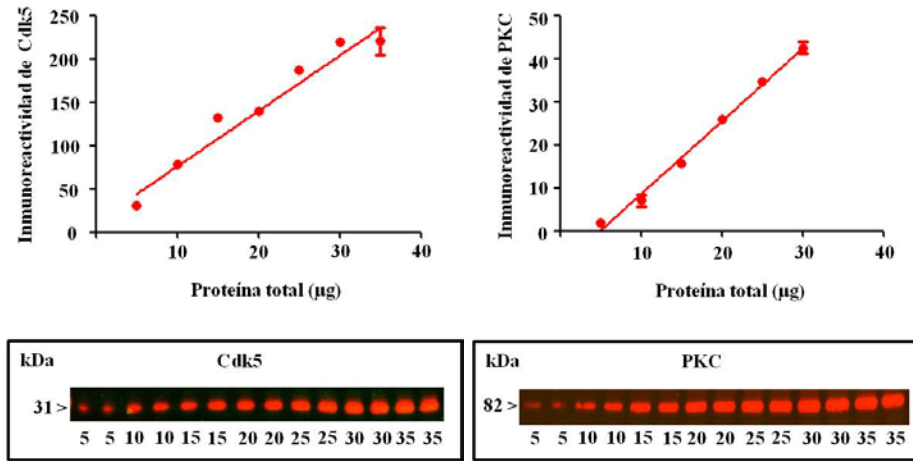


Figura 4.41. Expresión proteica de las proteínas (A) Cdk5 y (B) PKC en contenido proteico total creciente. Las gráficas muestran la relación lineal entre el contenido de proteína total y la fluorescencia que tuvieron unos valores r^2 de 0,9637 y 0,9714, respectivamente. *Abajo:* imágenes representativas de ambas proteínas.

Con respecto a la expresión de la proteína Cdk5, no se observaron diferencias estadísticamente significativas ya que tanto animales control como animales Munc18-OE presentaron datos de $100 \pm 5\%$ (*t* de Student; $t = 0,9148$; $p = 0,9176$) (Figura 4.42).

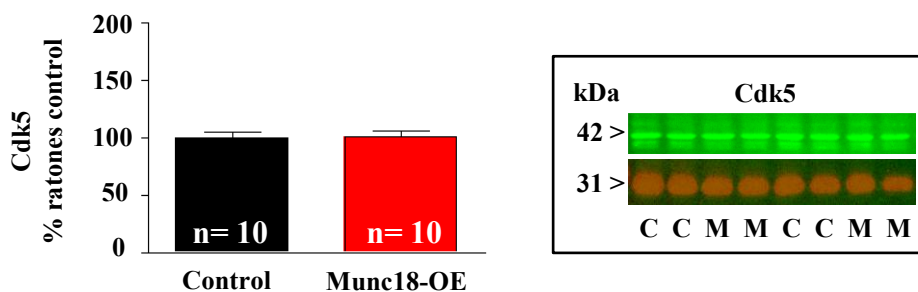


Figura 4.42. Expresión proteica de Cdk5 en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M) y sus controles *wild-type* (C). Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores de inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje de niveles de inmunodensidad respecto a los de animales control (*t*-test, Munc18-OE vs Control). *Derecha:* imágenes representativas (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

En el caso de la proteína PKC, se detectaron dos bandas cuantificables: una banda de aproximadamente 82 kDa y la otra de aproximadamente 46 kDa (Figura 4.43), pero en ningún caso el análisis estableció cambios estadísticamente significativos entre los dos grupos de animales.

En la banda a la altura aproximada de 82 kDa, los valores obtenidos en los animales control fueron de 100 ± 12 % y en los animales Munc18-OE fueron de 83 ± 13 % (*t* de Student; *t* = 0,972; *p* = 0,3501) (Figura 4.43A).

Los animales control presentaron unos valores de 100 ± 10 % y los animales Munc18-OE de 86 ± 8 % en la banda a la altura aproximada de 46 kDa (*t* de Student; *t* = 1,11; *p* = 0,2876) (Figura 4.43B).

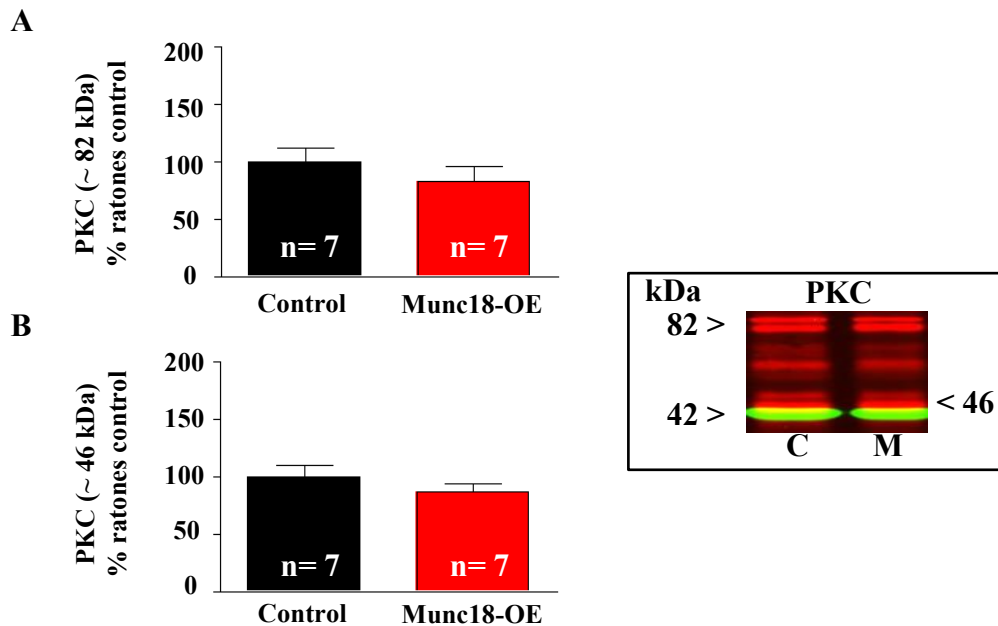


Figura 4.43. Expresión proteica de las bandas de (A) ~82 kDa y (B) ~46 kDa de PKC en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M) y sus controles *wild-type* (C). Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje de niveles de inmunodensidad respecto a los de animales control (*t*-test, Munc18-OE vs Control). Derecha: imágenes representativas (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

4.2.5. Evaluación de la expresión proteica de proteínas relacionadas con esquizofrenia

Se cuantificaron las proteínas DISC-1 (*Disrupted In Schizophrenia*), neuregulina-1, el receptor ErbB4 y PSD-95 (*Postsynaptic Density Protein-95*).

4.2.5.1. Disrupted In Schizophrenia-1 (DISC-1)

Para las proteínas relacionadas con esquizofrenia, como es la proteína DISC-1 también se realizó una curva de contenido proteico creciente para calcular las condiciones óptimas para su inmunodetección, y se decidió llevar a cabo los experimentos con la cantidad de 20 μg de proteína total (Figura 4.44).

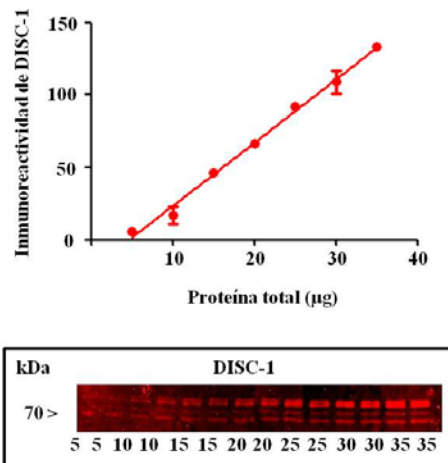


Figura 4.44. Expresión proteica de la proteína DISC-1 en contenido proteico total creciente. Las gráficas muestran la relación lineal entre en contenido de proteína total y la fluorescencia que tuvo un valor r^2 de 0,976. Abajo: imagen representativa.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión proteica de DISC-1 en los animales transgénicos con un valor de $73 \pm 14 \%$ en comparación con sus controles *wild-type* que presentaron un valor de $100 \pm 17 \%$ (t de Student; $t= 1,20$; $p= 0,2540$) (Figura 4.45).

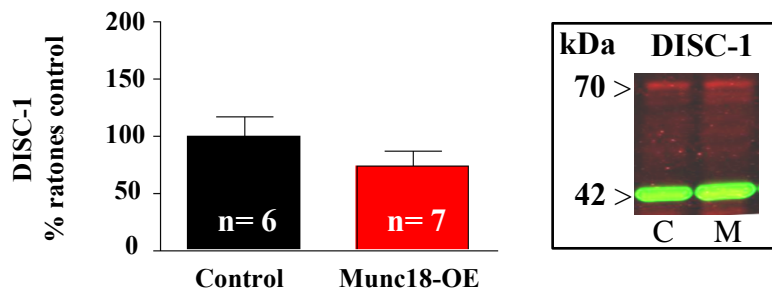


Figura 4.45. Expresión proteica de DISC-1 en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M) y sus controles *wild-type* (C). Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores de inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje de niveles de inmunodensidad respecto a los de los animales control (*t*-test, Munc18-OE vs Control). *Derecha:* imágenes representativas (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

4.2.5.2. Neuregulina-1

Para llevar a cabo la cuantificación de la proteína neuregulina-1, se realizó una curva de contenido proteico previa en la que se decidió utilizar 15 μ g de proteína total para su inmunodetección (Figura 4.46).

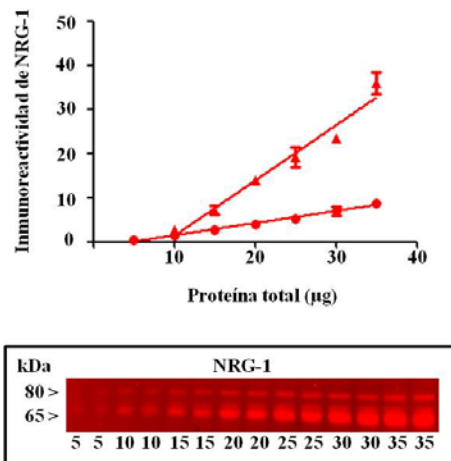


Figura 4.46. Expresión proteica de la proteína NRG-1 en contenido proteico total creciente. La gráfica muestran la relación lineal entre en contenido de proteína total y la fluorescencia que tuvieron unos valores r^2 de 0,994 y de 0,948, respectivamente. *Abajo:* imágenes representativas de ambas proteínas.

Al evaluar la expresión proteica de neuregulina-1, se cuantificaron dos bandas (80 y 65 kDa). No se observaron cambios significativos en la expresión de ninguna de

las dos formas proteicas entre los animales transgénicos y los controles *wild-type*. En la banda de aproximadamente 80 kDa, los animales control presentaron un valor de $100 \pm 11\%$ mientras que el valor de los animales Munc18-OE fue de $120 \pm 14\%$ (t de Student; $t = 1,16$; $p = 0,2696$) (Figura 4.47A). En el caso de la banda a la altura de 65 kDa, los animales control tuvieron un valor de $100 \pm 22\%$ y los animales Munc18-OE de $118 \pm 16\%$ (t de Student; $t = 0,672$; $p = 0,5146$) (Figura 4.47B).

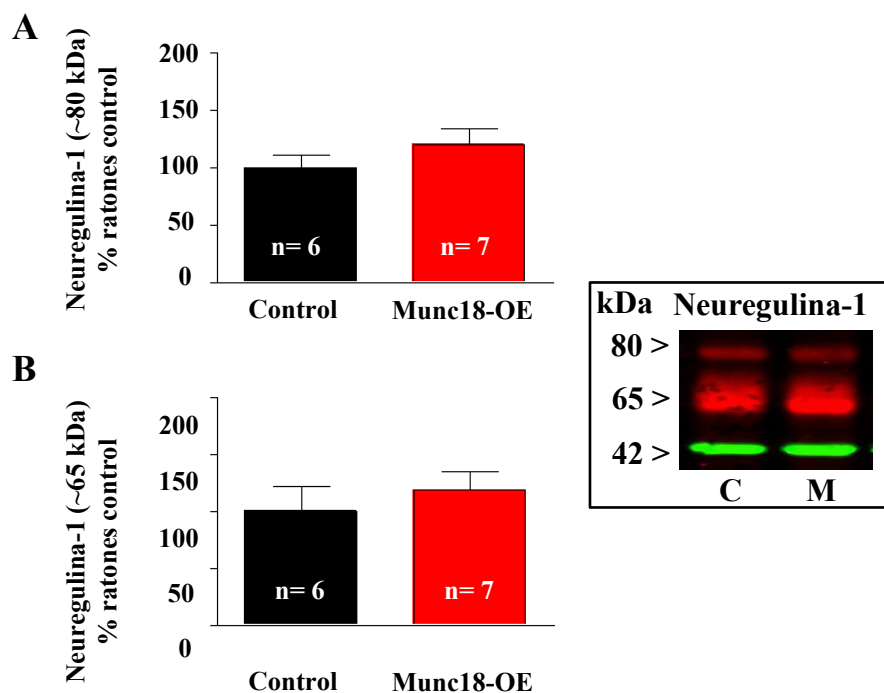


Figura 4.47. Expresión proteica de la proteína neuregulina-1 detectada en bandas de (A) 80 kDa y (B) 65 kDa en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M) y sus controles *wild-type* (C). Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores de inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje respecto a los de animales control (t -test, Munc18-OE vs Control). Derecha: imágenes representativas (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

4.2.5.3. Receptor ErbB4

En el caso del receptor ErbB4 también se realizó una curva de contenido proteico creciente para decidir las condiciones óptimas para su inmunodetección. Se decidió utilizar una concentración de 25 μg (Figura 4.48).

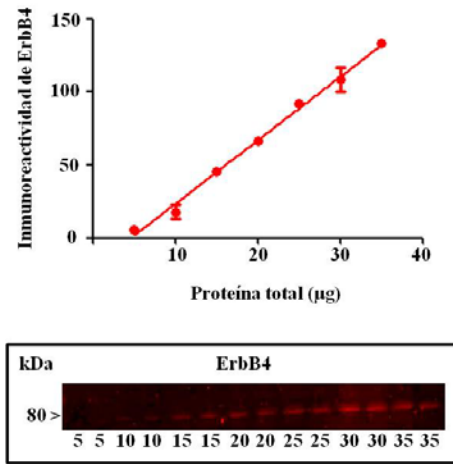


Figura 4.48. Expresión proteica del receptor ErbB4 en contenido proteico total creciente. La gráfica muestra la relación lineal entre en contenido de proteína total y la fluorescencia que tuvieron unos valores r^2 de 0,965. Abajo: imágenes representativas de ambas proteínas.

No se encontraron cambios significativos en la expresión proteica del receptor ErbB4 en los animales Munc18-OE con valores de 121 ± 15 % al compararlos con sus controles *wild-type* con valores de 100 ± 20 % (*t* de Student; $t = 0,865$; $p = 0,4056$) (Figura 4.49).

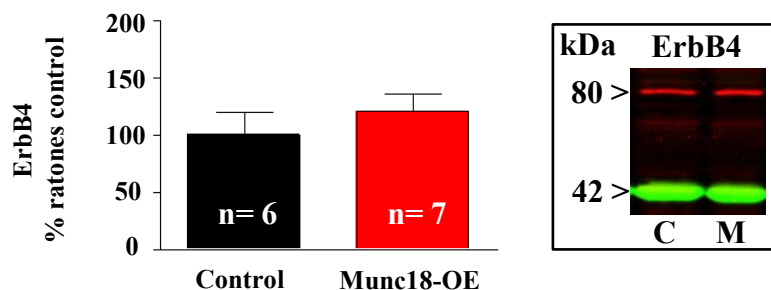


Figura 4.49. Expresión proteica de ErbB4 en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M) y sus controles *wild-type* (C). Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores de inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje respecto a los de animales control (*t*-test, Munc18-OE vs Control). Derecha: imágenes representativas (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

4.2.5.4. Proteína PSD-95

Para cuantificar la proteína PSD-95 también se realizó una curva de contenido proteico total creciente para saber la cantidad de proteína total que se debía de utilizar en los experimentos de inmunodetección. Esa cantidad fue de 15 µg (Figura 4.50).

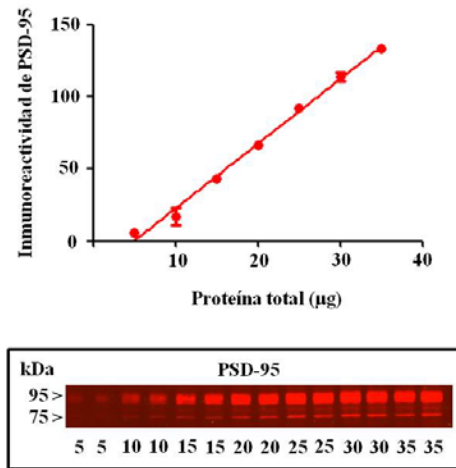


Figura 4.50. Expresión proteica de la proteína PSD-95 en contenido proteico total creciente. La gráfica muestra la relación lineal entre en contenido de proteína total y la fluorescencia que tuvo un valor r^2 de 0,978. *Abajo*: imagen representativa.

En el caso de la proteína PSD-95 no se observaron cambios estadísticamente significativos entre animales control y animales Munc18-OE ya que los animales control presentaron unos valores de $100 \pm 6 \%$ y los animales Munc18-OE de $94 \pm 6 \%$ (t de Student; $t = 0,719$; $p = 0,4814$) (Figura 4.51).

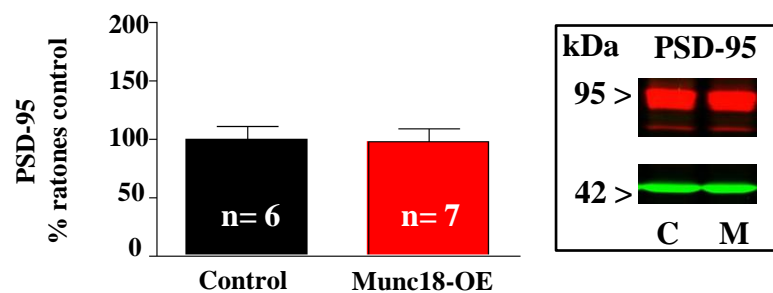


Figura 4.51. Expresión proteica de la proteína PSD-95 detectada en bandas de (A) ~ 100 kDa y (B) ~ 75 kDa en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M) y sus controles *wild-type* (C). Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje respecto a los de animales control (t -test, Munc18-OE vs Control). *Derecha*: imágenes representativas (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

4.2.5.5. Cuantificación de la expresión de proteínas relacionadas con esquizofrenia tras la administración aguda de clozapina

También se evaluó la expresión de proteínas relacionadas con la esquizofrenia tras la administración aguda de clozapina (1 mg/kg i.p) para observar el efecto del tratamiento antipsicótico.

4.2.5.5.1. Disrupted In Schizophrenia (DISC)

En el caso de la proteína DISC-1, tras realizar un análisis de varianzas de dos vías, no se observaron cambios significativos influenciados ni por el genotipo del animal ($F[1,23]= 0,7465$, $p= 0,3965$), ni por el tratamiento administrado ($F[1,23]= 0,6740$, $p= 0,4201$) ni por la interacción entre ambos factores ($F[1,23]= 1,386$, $p= 0,2511$) (Figura 4.52).

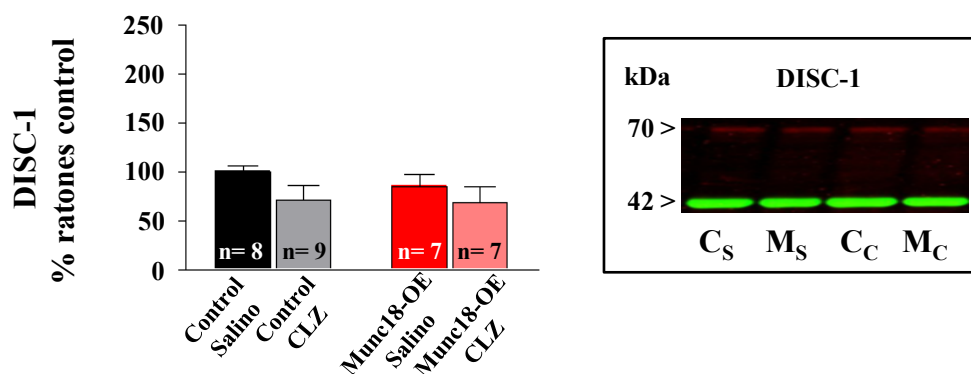


Figura 4.52. Expresión proteica de la proteína DISC-1 en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M_S) y sus controles *wild-type* (C_S) tras administración aguda de suero salino i.p. y animales Munc18-OE (M_C) y sus controles *wild-type* (C_C) tras inyección aguda de clozapina 1 mg/kg i.p. Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje de inmunodensidad respecto a los de los animales control tratados con suero salino. Derecha: imágenes representativas (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

4.2.5.5.2. Neuregulina-1

En el caso de la proteína neuregulina-1 se cuantificaron las bandas de 80 y 65 kDa. En ninguno de los casos se obtuvieron cambios estadísticamente significativos entre los grupos de estudio tras la administración aguda de clozapina.

Al realizar el análisis de la cuantificación de la banda de aproximadamente 80 kDa, el genotipo del animal no influyó en los resultados ($F[1,23]= 0,383$, $p= 0,5419$) pero sí el tratamiento administrado ($F[1,23]= 10,8$, $p= 0,0032$). La interacción entre ambos factores no afectó de manera significativa a los resultados ($F[1,23]= 1,02$, $p= 0,3241$) (Figura 4.53A).

Tras realizar el análisis de la banda inferior, ni el genotipo del animal ($F[1,26]= 0,164$, $p= 0,6890$), ni el tratamiento administrado ($F[1,26]= 1,51$, $p= 0,2309$) ni la interacción entre ambos factores ($F[1,26]= 1,04$, $p= 0,3165$) influenciaron en los resultados (Figura 4.53B).

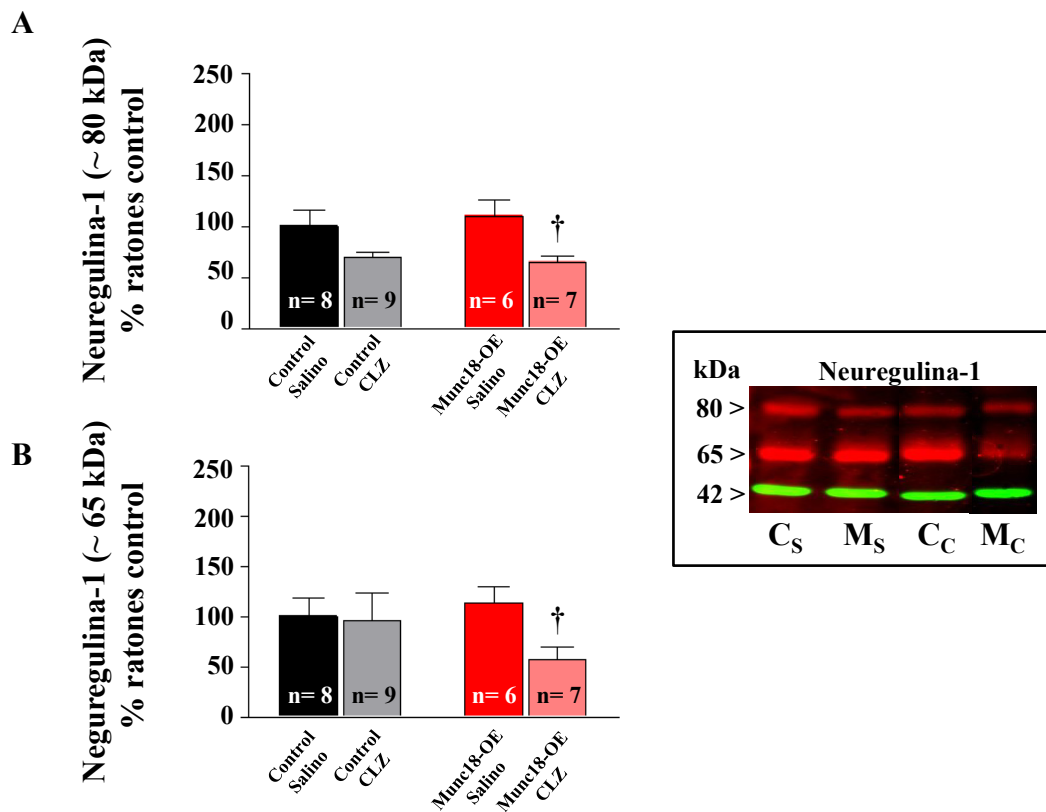


Figura 4.53. Expresión proteica de las bandas de (A) 80 kDa y (B) 65 kDa de la proteína neuregulina-1 en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M_S) y sus controles *wild-type* (C_S) tras administración aguda de suero salino i.p. y animales Munc18-OE (M_C) y sus controles *wild-type* (C_C) tras inyección aguda de clozapina 1 mg/kg i.p. Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores de inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje respecto a los de los animales control tratados con suero salino. Derecha: imágenes representativas (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

4.2.5.5.3. Receptor ErbB4

La neuregulina es el ligando del receptor tirosin-kinasa ErbB4. En la inmunodetección de este receptor ni el genotipo del animal ($F[1,25]= 0,4844$; $p= 0,4929$) ni el tratamiento administrado ($F[1,26]= 1,51$, $p= 0,2309$) ni la interacción entre ambos factores ($F[1,26]= 1,04$, $p= 0,3165$) influenciaron en los resultados (Figura 4.54).

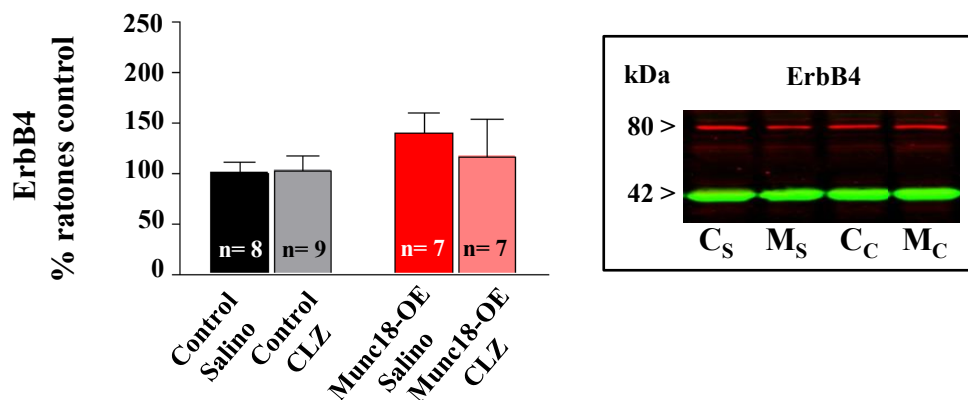


Figura 4.54. Expresión proteica del receptor ErbB4 en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M_S) y sus controles *wild-type* (C_S) tras administración aguda de suero salino i.p. y animales Munc18-OE (M_C) y sus controles *wild-type* (C_C) tras inyección aguda de clozapina 1 mg/kg i.p. Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje de niveles de inmunodensidad respecto a los de animales control tratados con salino. *Derecha*: imágenes representativas (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

4.2.5.5.4. Proteína PSD-95

En el caso de la proteína PSD-95, tras realizar un análisis de varianzas de dos vías, no se observaron cambios significativos influenciados ni por el genotipo del animal ($F[1,26]= 0,3343$, $p= 0,5681$), ni por el tratamiento administrado ($F[1,26]= 0,2719$, $p= 0,6065$) ni por la interacción entre ambos factores ($F[1,26]= 1,669$, $p= 0,2078$) (Figura 4.55).

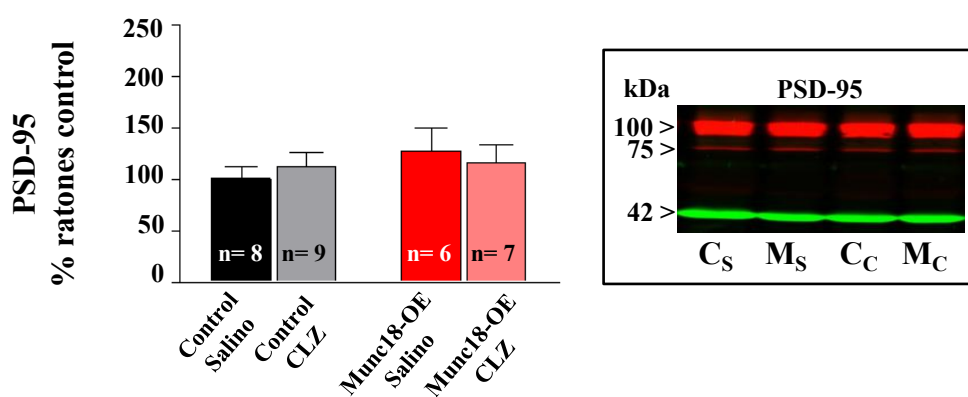


Figura 4.55. Expresión proteica de la proteína PSD-95 en corteza cerebral animales Munc18-OE (M_S) y sus controles *wild-type* (C_S) tras administración aguda de suero salino i.p. y animales Munc18-OE (M_C) y sus controles *wild-type* (C_C) tras inyección aguda de clozapina 1 mg/kg i.p. Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje de niveles de inmunodensidad respecto a los de animales control tratados con salino. *Derecha*: imágenes representativas (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

4.2.6. Evaluación de la expresión proteica de los receptores cannabinoides

Se evaluó el estado del sistema cannabinoide en el modelo animal Munc18-OE a través de sus dos receptores, CB1 y CB2.

En este caso, también se realizó previamente una curva de contenido proteico creciente para decidir la concentración de proteína total óptima para llevar a cabo la cuantificación de la inmunodetección. En ambos casos, la concentración elegida fue de 15 μ g de proteína total (Figura 4.56).

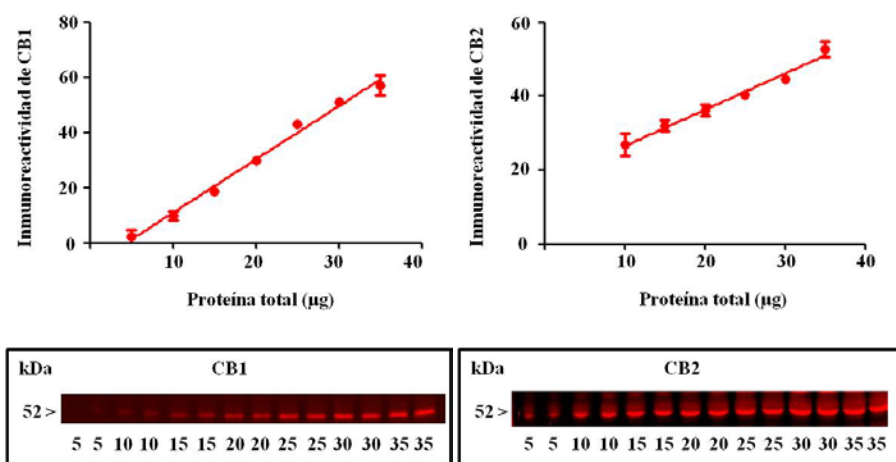


Figura 4.56. Expresión proteica de las proteínas (A) CB1 y (B) CB2 en contenido proteico total creciente. Las gráficas muestran la relación lineal entre en contenido de proteína total y la fluorescencia que tuvieron unos valores r^2 de 0,9811 y 0,942, respectivamente. *Abajo*: imágenes representativas de ambas proteínas.

En el caso del receptor cannabinoide CB1, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores mostrados por los animales control (100 ± 7 %) y los valores mostrados por los animales Munc18-OE (83 ± 10 %) (t de Student; $t= 1,37$; $p= 0,1889$) (Figura 4.57A).

En la expresión proteica del receptor CB2 tampoco se encontraron cambios estadísticamente significativos, ya que lo valores de inmunodetección de los animales control fueron 100 ± 5 % y de los valores de los animales Munc18-OE fueron 86 ± 10 % (t de Student; $t= 1,32$; $p= 0, 2118$) (Figura 4.57B).

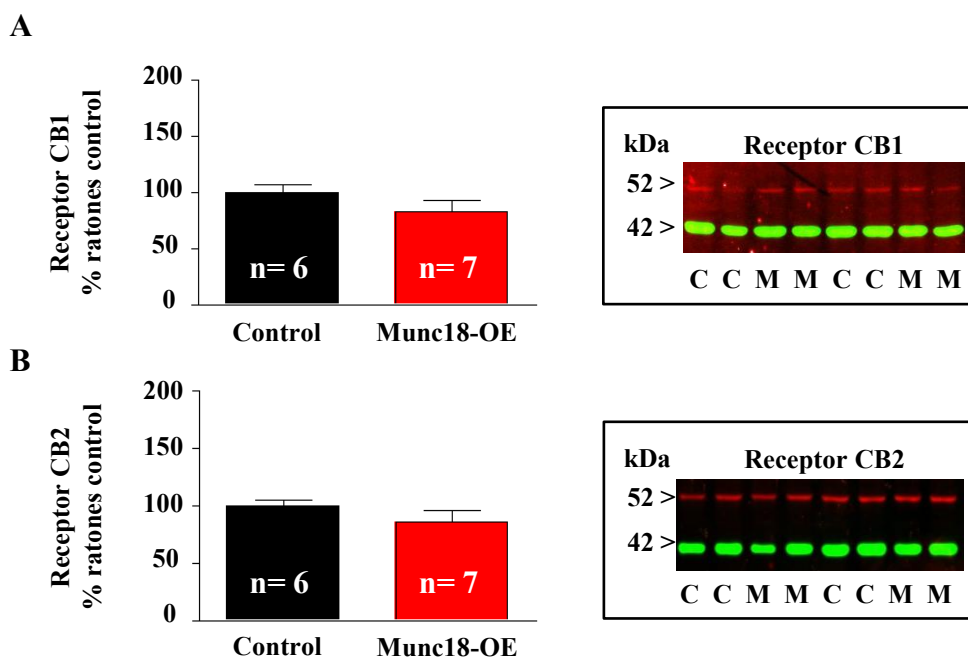


Figura 4.57. Expresión proteica de los receptores cannabinoides (A) CB₁ y (B) CB₂ en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M) y sus controles *wild-type* (C). Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje de niveles de inmunodensidad respecto a los de animales control (*t*-test, Munc18-OE vs Control). Derecha: imágenes representativas (proteína de interés en rojo y β -actina en verde).

4.2.7. Evaluación de la expresión de las proteínas de las vías apoptóticas

En este estudio también se evaluó el estado de las vías apoptóticas: el receptor Fas y las proteínas FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*), FADD fosforilada en su serina 191 y PARP-1 (*Poly (ADP-ribose) polymerase*).

En el caso del receptor Fas los animales Munc18-OE obtuvieron unos valores de 100 ± 6 % frente a los animales control que fueron de 97 ± 5 % (*t* de Student; $t= 0,51$; $p= 0,6166$) (Figura 4.58A).

La proteína apoptótica FADD se observó aumentada en los animales Munc18-OE con unos valores de 123 ± 9 % frente a los animales control que tenían unos valores de 96 ± 8 % (*t* de Student; $t= 2,19$; $p=0,0460$) (Figura 4.58B).

Los valores de inmunodetección de p-FADD detectados en los animales control fueron 102 ± 13 % y en los animales Munc18-OE 111 ± 7 %, sin obtener cambios

estadísticamente significativos en ambos grupos (t de Student; $t = 0,578$; $p = 0,5727$) (Figura 4.58C).

Por último, tampoco se observaron cambios significativos en la fracciones PARP siendo los valores de los animales control $95 \pm 6 \%$ y los valores de los animales Munc18-OE $106 \pm 8 \%$ (t de Student; $t = 1,15$; $p = 0,2742$) (Figura 4.58D).

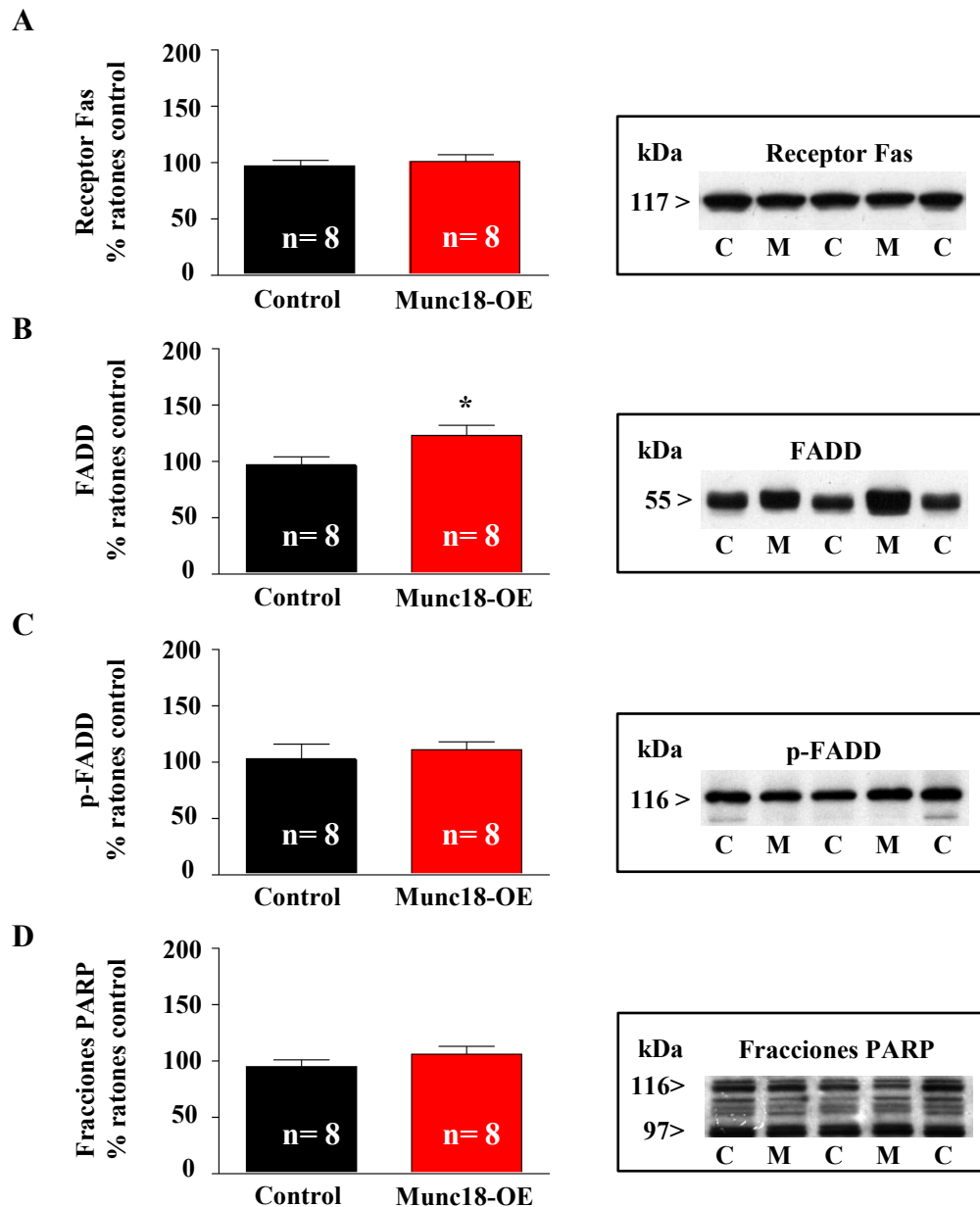


Figura 4.58. Representación gráfica e imagen representativa de la expresión proteica de las proteínas de vías apoptóticas: (A) receptor Fas, (B) FADD, (C) p-FADD y (D) fracciones de la proteína PARP en corteza cerebral de animales Munc18-OE (M) y sus controles *wild-type* (C). Las barras representan las medias \pm error estándar de los valores inmunoreactividad, y se expresan en porcentaje de niveles de inmunodensidad respecto a los de animales control. * $p < 0,05$ (t -test, Munc18-OE vs Control).

4.2.8. Evaluación del fenotipo comportamental del modelo animal Munc18-OE

4.2.8.1. Evaluación de la actividad motora

La mayoría de los paradigmas experimentales destinados al estudio del comportamiento poseen un componente motor. Por ello, resulta esencial evaluar la capacidad locomotora del modelo animal Munc18-OE para comprobar si las modificaciones genéticas a las que ha sido sometido el animal pudieran estar influyendo en sus habilidades motoras, enmascarando otros resultados dependientes de la integridad de esa actividad.

La evaluación de la actividad motora espontánea se realizó mediante la prueba del actímetro. La actividad motora de animales Munc18-OE fue significativamente menor que la actividad de los animales *wild-type* (-32%; test de *t* de Student: $p=0,0002$; $t=5,593$) (Figura 4.59).

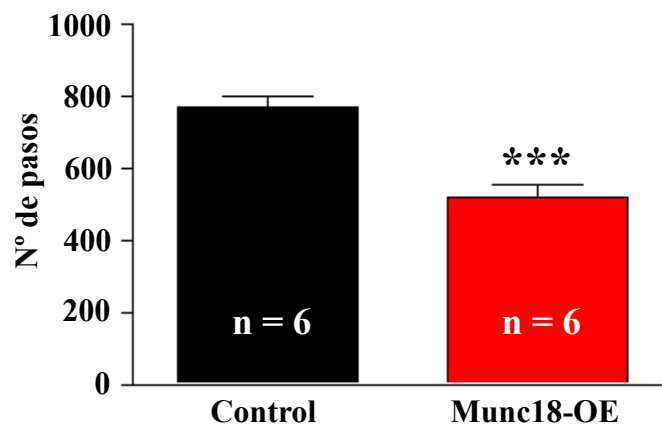


Figura 4.59. Evaluación de la actividad motora espontánea mediante actímetro de animales Munc18-OE y sus controles *wild-type*. Las columnas representan las medias \pm error estándar del tiempo. *** $p < 0,001$ (*t*-test Munc18-OE vs Control).

4.2.8.2. Evaluación de la coordinación motora

Al evaluar la coordinación motora mediante la prueba del rotarod no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de animales en el tiempo que se mantiene en la barra giratoria (en segundos) mediante el test de *t* de Student ($t=0,9150$; $p=0,38179$) (Figura 4.60).

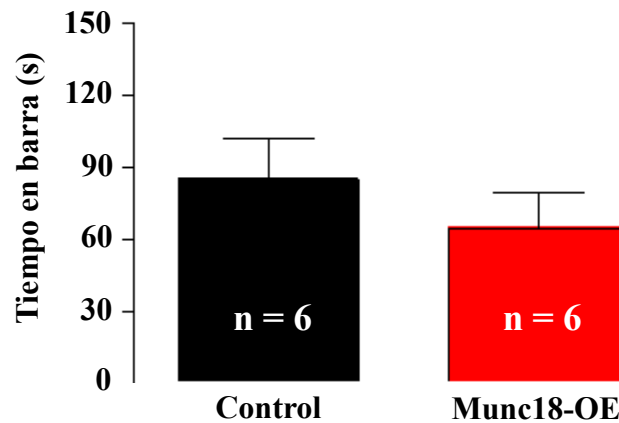


Figura 4.60. Evaluación de la coordinación motora en Rotarod de animales Munc18-OE y sus controles *wild-type*. Las columnas representan las medias \pm error estándar del tiempo que se mantiene en la barra giratoria (*t*-test, Munc18-OE vs Control).

4.2.8.2. Evaluación de la actividad exploratoria

Para determinar la actividad exploratoria de los animales modificados genéticamente, se les sometió a la prueba de la caja con agujeros durante un periodo de 5 minutos. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales Munc18-OE al compararlos con sus controles *wild-type* (*t* de Student; $t=0,5538$; $p=0,5932$;) (Figura 4.61).

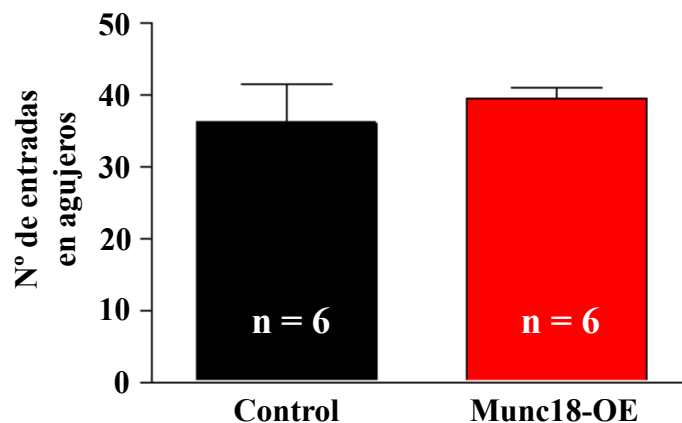


Figura 4.61. Evaluación de la capacidad exploratoria mediante la prueba de caja con agujeros en animales Munc18-OE y sus controles *wild-type*. Las columnas representan las medias \pm error estándar del número de entradas en los agujeros (*t*-test, Munc18-OE vs Control).

4.2.8.3. Evaluación del estado de ansiedad

Con objeto de estudiar el estado de ansiedad de los animales Munc18-OE se realizaron las pruebas del laberinto elevado en cruz e interacción social.

En la prueba del laberinto elevado en cruz se evaluaron dos parámetros: el número de entradas a cualquiera de los dos brazos abiertos y el tiempo de permanencia en cada brazo. El número de entradas a los brazos abiertos fue significativamente inferior en los animales Munc18-OE al compararlos con los animales *wild-type* (-73 %; *t* de Student; $t = 3,618$; $p = 0,0056$). Así mismo, se observó una disminución significativa en el tiempo de permanencia en los brazos abiertos, en los animales Munc18-OE respecto a los animales control (-86 %; *t* de Student; $t = 3,025$; $p = 0,0144$) (Figura 4.62).

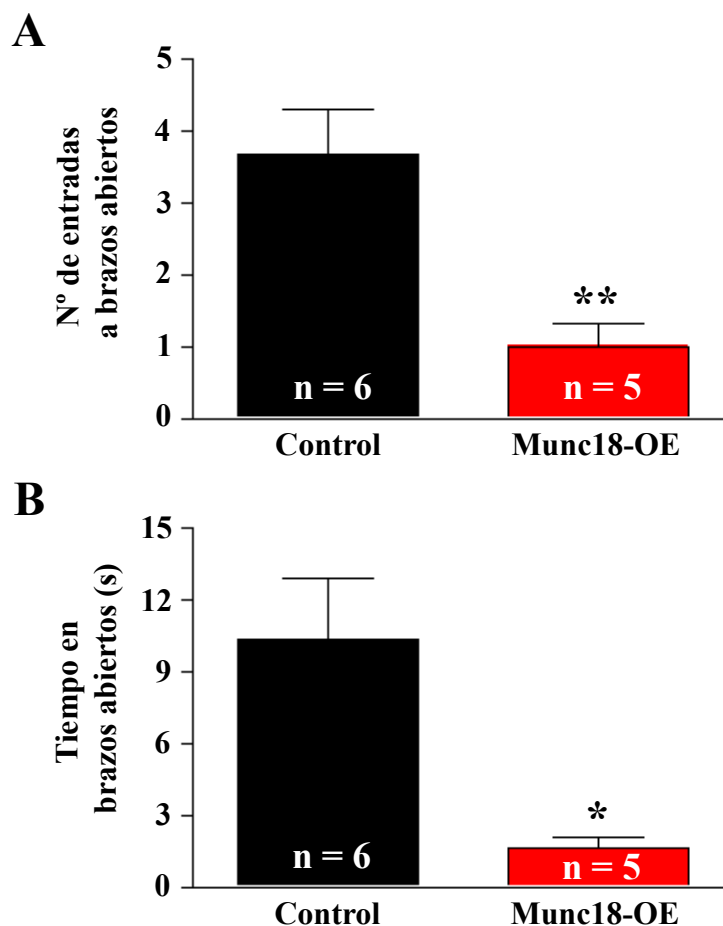


Figura 4.62. Evaluación del estado de ansiedad en animales Munc18-OE y sus controles *wild-type* en el laberinto elevado en cruz. Las columnas representan las medias \pm error estándar (A) del número de entradas a los brazos abiertos y (B) del tiempo en los brazos abiertos. * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ (*t*-test; Munc18-OE vs Control).

Respecto a la prueba de la interacción social, los resultados muestran una disminución significativa del tiempo de interacción en los animales Munc18-OE al compararlos con sus controles *wild-type* (-52%; t de Student; $t = 3,417$ $p = 0,0066$;) (Figura 4.63).

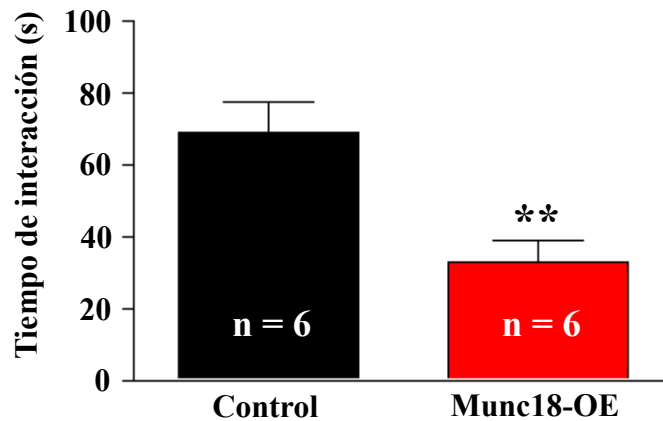


Figura 4.63. Estudio de la interacción social en animales Munc18-OE y sus controles *wild-type*. Las columnas representan las medias \pm error estándar del tiempo (en segundos) durante el que los animales interaccionan entre sí. ** $p < 0,01$ (t-test; Munc18-OE vs Control).

4.2.8.4. Evaluación del fenotipo depresivo mediante la prueba de natación forzada

Los resultados obtenidos hasta el momento sugirieron que los animales Munc18-OE presentaban un elevado estado de ansiedad. Ya que en la práctica clínica los estados depresivos suelen cursar con trastornos de ansiedad, se realizó la prueba comportamental de la natación forzada para evaluar las sintomatología depresiva.

No se encontraron cambios en el tiempo de inmovilidad en la prueba de la natación forzada entre los animales Munc18-OE y sus controles (t de Student; $t = 1,171$; $p = 0,2688$) (Figura 4.64).

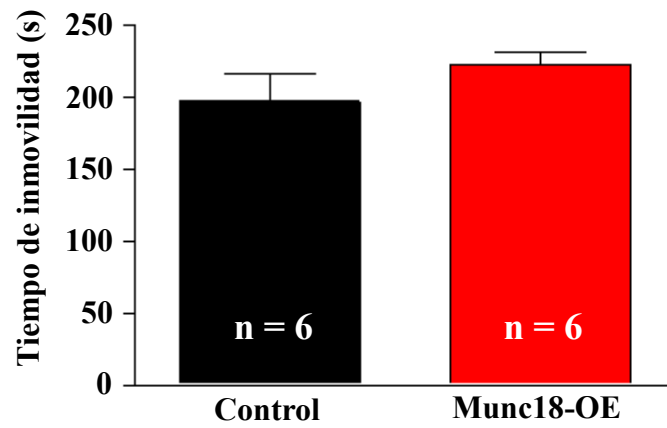


Figura 4.64. Tiempo de inmovilidad en la prueba de la natación forzada en animales Munc18-OE y sus controles *wild-type*. Las columnas representan las medias \pm error estándar del tiempo que animal está inmóvil (*t*-test, Munc18-OE vs Control).

5. DISCUSIÓN

La esquizofrenia se considera un trastorno psiquiátrico complejo ya que sus causas son heterogéneas, presenta síntomas variables y los pacientes responden de manera diferente al tratamiento. Estudios en familias relevan que se trata de una enfermedad con un alto componente genético, consecuencia de la interacción simultánea de varios genes con un tipo de herencia no mendeliana. Este trastorno se caracteriza por una alteración de la realidad y del comportamiento social, además de desorganizaciones graves de la personalidad. Se trata de una enfermedad crónica que se inicia en la adolescencia o a principios de la juventud y que afecta al 1% de la población.

En los últimos años, parte de las investigaciones en esta enfermedad se han centrado en el estudio del mecanismo de excitotoxicidad neuronal, el cual permite la liberación de neurotransmisores a la hendidura sináptica.

En el presente estudio se emplearon muestras cerebrales *postmortem* de individuos con esquizofrenia y sus controles emparejados, tanto tratados con fármacos antipsicóticos como sin tratar con el objetivo de cuantificar el contenido proteico de varias proteínas presinápticas y la posible influencia de la exposición a fármacos antipsicóticos.

Además, se evaluó también un ratón transgénico que sobreexpresaba la isoforma *munc18-1a* como posible modelo animal de esquizofrenia, demostrando la participación de esta proteína en el desarrollo de cambios tanto comportamentales como morfológicos que se asemejan a los observados en esquizofrenia. Estos resultados apoyan la hipótesis de un posible papel de alteraciones en los procesos de excitotoxicidad en la fisiopatología de la enfermedad.

5.1. EVALUACIÓN PROTEICA DE PROTEÍNAS PRESINÁPTICAS EN CORTEZA PREFRONTAL DE INDIVIDUOS CON ESQUIZOFRENIA

En este trabajo se estudió el estado de los componentes más relevantes de la maquinaria excitotóxica en la corteza prefrontal (área 9 de Brodmann-BA9) con muestras cerebrales *postmortem* de individuos con esquizofrenia y sus controles

emparejados por edad, sexo e intervalo *postmortem*. Con el fin de observar los posibles efectos del tratamiento antipsicótico, los individuos con esquizofrenia se dividieron en dos grupos, dependiendo de la presencia o ausencia de fármacos antipsicóticos en plasma en el momento de fallecimiento. Además, se incluyó una población de individuos que habían cometido suicidio sin enfermedad psiquiátrica diagnosticada para evaluar si este factor podía influir en los resultados, ya que la mayoría de los individuos con esquizofrenia habían fallecido por suicidio. Por otro lado, se incluyó una población de individuos diagnosticados con depresión mayor para analizar si los cambios encontrados en la esquizofrenia eran comunes a otros trastornos mentales. Esta población también fue dividida entre individuos tratados con fármacos antidepresivos o libres de tratamiento en plasma en el momento de la autopsia.

5.1.1. Evaluación de la expresión proteica de munc18-1 y sintaxina-1A

La proteína munc18-1 es una molécula esencial de la maquinaria excitotónica (Rizo y Südhof, 2002; Verhage y cols., 2000) que interacciona con sintaxina-1A y otras proteínas SNARE (sinaptobrevina y SNAP-25) para promover la fusión vesicular y la liberación de neurotransmisores (Toonen y Verhage, 2007; Déak y cols., 2009; Han y cols., 2010). Esta proteína tiene dos isoformas: munc18-1a (expresión neuronal) y munc18-1b (expresión ubicua), que se diferencian en los 24 aminoácidos del dominio N-terminal (Hata y Südhof, 1995; Swanson y cols., 1998).

En esta Tesis, tras caracterizar la distribución de las dos isoformas de munc18-1 en corteza prefrontal y tras observar que el intervalo *postmortem* no afectaba a su expresión, se procedió a su evaluación en condiciones patológicas. En estas dos isoformas no se observaron diferencias entre los grupos control, individuos con esquizofrenia e individuos que habían cometido suicidio.

Sin embargo, en el caso de munc18-1a, al dividir los individuos con esquizofrenia en base al tratamiento, se observó una disminución estadísticamente significativa en el grupo de individuos diagnosticados de esquizofrenia tratados con fármacos antipsicóticos tanto frente a individuos control como frente a individuos con esquizofrenia libres de tratamiento. Por otro lado, la disminución frente a los

individuos control sólo se observó en individuos tratados en el caso de la isoforma munc18-1b.

En un estudio previo basado en técnicas proteómicas se observó una regulación al alza de la proteína munc18-1 (2,5 veces, sin validar por *western blot*) en el tálamo de individuos con esquizofrenia tratados con antipsicóticos frente a individuos control (Martins-de Souza y cols., 2010). Este hallazgo también se había observado previamente en otro trabajo de proteómica validado por *western blot* en el que la expresión proteica de munc18-1 aumentó en un 18-24% en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia con presencia de clorpromazina en plasma en el momento del fallecimiento (Behan y cols., 2009). En este último estudio, el anticuerpo utilizado (anticuerpo policlonal anti-STXBP1; Synaptic Systems GmbH, Alemania) parecía indicar que la isoforma cuantificada era la munc18-1b (*Inmunogen Synaptic Systems*: péptido DTLKKLNKTDEEISS, residuos 580-594). Estos datos contrastaban con la conclusión a la que llegaron Castillo y colaboradores en 2010, quienes observaron una marcada reducción de munc18-1 de aproximadamente del 50 % en corteza cerebral de individuos con esquizofrenia. Por lo tanto, actualmente, no existe una concordancia entre los diferentes estudios llevados a cabo sobre el estado basal del contenido de munc18-1 (munc18-1a y/o munc18-1b) y el efecto antipsicótico en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia.

En lo que a la proteína sintaxina-1A se refiere, se observó un incremento estadísticamente significativo de su contenido en individuos con esquizofrenia comparándolos frente a sus controles emparejados. Este hallazgo no estaba relacionado con el efecto antipsicótico, ya que este aumento se observó en los subgrupos de individuos con esquizofrenia tratados con antipsicóticos en el momento del fallecimiento y en el grupo de individuos con esquizofrenia libres de este tipo de tratamiento.

La proteína sintaxina-1A también posee un papel central en el proceso de exocitosis, principalmente debido a su interacción con munc18-1 (Geber y cols., 2008; Han y cols., 2010; Hu y cols., 2011). De manera interesante, también se ha ligado genéticamente esta proteína con la esquizofrenia (Wong y cols., 2004), y animales que

carecen de la proteína sintaxina-1A muestran comportamientos anormales relacionados con la enfermedad como pueden ser alteraciones en la interacción social, el reconocimiento de objetos y la prueba de inhibición de latencia (Fujiwara y cols., 2010).

De manera complementaria, el grupo de Castillo y colaboradores (2010) observó una reducción en la cantidad de sintaxina fosforilada en su serina 14 (p-Ser14-sintaxina) en individuos con esquizofrenia que se podía asociar a una disminución en la formación del complejo SNARE. En dicho estudio, se observó un incremento en el contenido de sintaxina-1A total en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia. De manera similar, otros estudios *postmortem* observaron incrementos en la expresión génica y/o proteica de sintaxina en regiones corticales de individuos con esquizofrenia (Gabriel y cols., 1997; Honer y cols., 1997, 2002; Sokolov y cols., 2000). Por otro lado, en otros estudios no se observaron cambios en dos isoformas de sintaxina (1A y 1B) (33/35 kDa) en individuos con esquizofrenia bajo tratamiento antipsicótico (Scarr y cols., 2006).

5.1.2. Evaluación de la relación entre la expresión de munc18-1 y sintaxina-1A

En multitud de ocasiones se ha relacionado la proteína munc18-1 con la sintaxina. Munc18-1 interacciona con sintaxina-1A en su conformación cerrada, pero la liberación de neurotransmisores sólo se puede llevar a cabo mientras sintaxina-1A esté en su conformación abierta e interaccione con sinaptobrevina y SNAP-25. Es por ello que se decidió describir y evaluar la relación entre la expresión de las isoformas munc18-1a y munc18-1b y sintaxina-1A en la esquizofrenia realizando correlaciones entre el contenido de ambas proteínas.

En el grupo de individuos control, sintaxina-1A y munc18-1a presentaron una correlación positiva. Por el contrario, en el caso de los individuos con esquizofrenia no tratados con antipsicóticos esa correlación fue negativa, indicando que se había perdido el balance entre ambas proteínas. Al analizar la interacción de estas dos proteínas en el grupo de los individuos con esquizofrenia tratados con fármacos psicoactivos, la correlación seguía siendo negativa pero la relación no era tan acusada como en el caso anterior, sugiriendo que el efecto del tratamiento podría estar

representando un mecanismo compensatorio para contrarrestar los déficits a nivel sináptico postulados en esquizofrenia (Behan y cols., 2009; Castillo y cols., 2010).

5.1.3. Evaluación proteica del resto de proteínas presinápticas

Con respecto al resto de proteínas presinápticas analizadas, no se observaron cambios al comparar los individuos con esquizofrenia con sus respectivos controles. Estas similitudes de contenido proteico se mantuvieron al dividir los individuos con esquizofrenia entre no tratados y tratados con fármacos antipsicóticos. Sin embargo, en el caso de sinaptobrevina los individuos tratados mostraron diferencias estadísticamente significativas al compararlos con los que no habían recibido tratamiento antipsicótico.

En el presente trabajo no se observaron diferencias en la densidad de estas proteínas en el área 9 de Brodmann, resultados que concuerdan con los de otros grupos (Scarr y cols., 2006; Gray y cols., 2010). Además, el grupo de Gray y cols. (2010) tampoco observó cambios en otras áreas como BA10, BA46 y BA40 salvo en el caso de los niveles de SNAP-25 que estaban incrementados en individuos con esquizofrenia tratados con antipsicóticos. Recientemente, la proteína SNAP-25 ha adquirido interés ya que se ha relacionado con los receptores glutamatérgicos NMDA, tan involucrados en la patología esquizofrénica (Cheng y cols., 2013). Los hallazgos encontrados en este trabajo a nivel de la proteína SNAP-25 no aclaran las discrepancias que se observan entre los diferentes estudios realizados por otros grupos pero podrían sugerir que los cambios en los niveles de SNAP-25 son específicos de algunas regiones, ya que en cerebelo se encontraron niveles disminuidos (Mukaetova-Ladinska y cols., 2002) y que la alteración de los niveles de SNAP-25 podría estar solamente presente en subgrupos de individuos con esquizofrenia (Gray y cols., 2010).

En el caso de la sinaptofisina no se obtuvieron cambios significativos en la población de individuos con esquizofrenia, independientemente de la ausencia o presencia de antipsicóticos en plasma en el momento del fallecimiento. Existen estudios discrepantes, por un lado, el contenido de sinaptofisina se vio disminuido en regiones corticales y no corticales de individuos con esquizofrenia (Davidsson y cols., 1999; Eastwood y cols., 2000). Por otro lado, también existen estudios en las que no se

han observado alteraciones en las muestras corticales de individuos con esquizofrenia (sin tener en cuenta el tratamiento antipsicótico) apoyando los resultados mostrados en esta Tesis (Eastwood y cols., 2000; Scarr y cols., 2006).

Estos hallazgos aislados en el contenido de algunas proteínas presinápticas analizadas no rechazan la hipótesis que postula que los cambios a nivel sináptico son críticos en la esquizofrenia. Sin embargo, los datos de este y otros estudios sugieren que estos cambios son complejos y que se necesita investigar de manera más profunda para intentar aclarar los mecanismos que podrían estar involucrados en la patología de la esquizofrenia.

5.1.4. Evaluación del complejo SNARE

Antes de cuantificar la expresión proteica del complejo SNARE, y como en el caso de *munc18-1*, se evaluó la distribución subcelular y el efecto que tenía la degradación *postmortem*. Las distintas conformaciones (75 y 100 kDa) del complejo SNARE eran visibles en todas las fracciones subcelulares pero, como era de esperar, su expresión fue mayor en la fracción enriquecida en membranas (F2).

Las diferentes formas del complejo SNARE se pudieron identificar con los anticuerpos específicos de syntaxina-1A, sinaptobrevina y SNAP-25 como bandas inmunoreactivas de aproximadamente 75 y 110 kDa en corteza cerebral de rata y en el área 9 de Brodmann en corteza prefrontal humana. De manera notable, estas formas fueron altamente resistentes a la degradación *postmortem* (más de 102 horas), lo cual revela una alta estabilidad.

Se eligió la forma de aproximadamente 75 kDa para la cuantificación en el grupo de los individuos con esquizofrenia porque era fácilmente identificable con los anticuerpos de las tres proteínas SNARE (la forma de aproximadamente 110 kDa no se detectó con el anticuerpo anti-sinaptobrevina) y también porque era la más aproximada al peso esperado (~72 kDa) del heterotrímero (sinaptobrevina: 13 kDa, syntaxina-1A: 34 kDa y SNAP-25: 25 kDa). Sin embargo, pueden ser necesarios varios complejos SNARE para una fusión de vesículas en las sinapsis (Mohrmann y cols., 2010). Dado que el complejo está formado por cuatro motivos SNARE (dos que aporta

la proteína SNAP-25 y otros dos que aportan sinaptobrevina y syntaxina) (Rizo y Südhof, 2002), se escogió el anticuerpo contra SNAP-25 para la cuantificación del complejo SNARE. Además, el anticuerpo anti-SNAP-25 fue el que mejor reveló la presencia enriquecida del complejo SNARE de ~75 kDa en la fracción de membrana, la localización subcelular esperada.

Se observó una disminución estadísticamente significativa en los individuos con esquizofrenia frente a sus controles emparejados. De hecho, al separar esta población entre individuos tratados y no tratados con antipsicóticos, se podía asociar esta disminución con el tratamiento antipsicótico, ya que los individuos con esquizofrenia con presencia de fármacos antipsicóticos en plasma en el momento del fallecimiento mostraron niveles de complejo SNARE más bajos.

Los complejos SNARE, cuya formación está principalmente regulada por la proteína munc18-1, juegan un papel en el anclaje de las vesículas sinápticas en los terminales presinápticos y consecuentemente en el proceso de neuroexocitosis (Déak y cols., 2009; Rizo y Südhof, 2002; Toonen y Verhage, 2007).

En el contexto de las enfermedades mentales, un estudio *postmortem* previo concluyó que los complejos SNARE se incrementaban significativamente en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia y con depresión que cometieron suicidio (Honer y cols., 2002). Por el contrario, la forma de ~110 kDa se vio reducida (35%) en la corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia con bajo contenido de p-Ser14-syntaxina-1 aunque hay que tener en cuenta que solamente se analizaron cuatro casos (Castillo y cols., 2010).

Los resultados observados en este trabajo se contradicen con estudios previos sobre el complejo SNARE que señalan incrementos (Honer y cols., 2002) pero concuerdan con los que han observado disminuciones (Castillo y cols., 2010) de las diferentes formas de los complejos (110-150 kDa) en corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia.

5.1.5. Otras poblaciones

Como se ha comentado, se añadió al estudio una población de individuos sin diagnóstico de esquizofrenia que habían cometido suicidio con el fin de descartar que los cambios observados se debieran a este factor, ya que la mayoría de los individuos con esquizofrenia habían fallecido de esta manera. En ninguna de las cuantificaciones se apreciaron cambios estadísticamente significativos entre este grupo y sus controles emparejados.

Además, y tras observar los cambios obtenidos en esquizofrenia, se decidió utilizar una población de individuos diagnosticados de depresión mayor y sus respectivos controles emparejados por sexo, género e intervalo *postmortem*. Estas muestras se utilizaron con el objetivo de descartar que los cambios que se habían apreciado fuesen comunes a otros trastornos psiquiátricos. De hecho, se pudo concluir que las diferencias eran específicas de individuos con esquizofrenia porque no se obtuvieron cambios al comparar individuos con depresión mayor y sus respectivos controles, independientemente del tratamiento antidepresivo.

5.1.6. Consideraciones generales

Las discrepancias entre los estudios con cerebros *postmortem* en la regulación de la maquinaria excitotóxica en esquizofrenia (Honer y cols., 2002; Behan y cols., 2009; Castillo y cols, 2010) pueden estar relacionadas con la heterogeneidad entre individuos control e individuos con patología (raza, género y edad), la existencia de diferentes subtipos de diagnóstico, las diferentes áreas cerebrales analizadas, los diferentes enfoques utilizados incluyendo la gran variedad de anticuerpos, el número de muestras experimentales analizadas, y la exposición previa de cada individuo a los fármacos antipsicóticos.

En el presente trabajo, la comparación entre los individuos con esquizofrenia libres de tratamiento y tratados con fármacos antipsicóticos proporcionó una evidencia de que la larga exposición a estos fármacos está asociada con una regulación a la baja de munc18-1a, sinaptobrevina y posiblemente de syntaxina-1A, y consecuentemente con una disminución de la forma de ~75 kDa del complejo SNARE

en la corteza prefrontal (BA9), que podría resultar en una desestabilización/discapacidad para la liberación de neurotransmisores.

En conclusión, el presente trabajo demuestra que existen alteraciones en los componentes de la maquinaria excitotóxica que están implicadas en la patogénesis de la esquizofrenia. Un desbalance en la interacción entre las proteínas SNARE (especialmente sintaxina-1A) y munc18-1a podría ser la base de las disfunciones en las vías dopaminérgicas y glutamatérgicas a nivel cortical que se han hipotetizado en la enfermedad.

El concepto de una hipofunción dopaminérgica cortical en esquizofrenia surgió a raíz de deficiencias en la memoria de trabajo de individuos enfermos, ya que este tipo de memoria depende de una neurotransmisión de dopamina óptima en la corteza prefrontal (Weinberger y cols., 1992; Green, 1996). Además, en estudios *postmortem* se ha descrito una disminución en los niveles de expresión de la tirosina hidroxilasa, proteína de la vía de síntesis de la dopamina (Akil y cols., 2000). Por otro lado, los estudios de imagen, como es la tomografía de emisión de positrones (PET), han investigado las alteraciones en la disponibilidad del receptor D1 en las regiones corticales (Abi-Dragham y cols., 2012) y recientemente, se ha observado una deficiencia en la liberación de dopamina inducida por amfetamina en pacientes con esquizofrenia (Slifstein y cols., 2015).

Por otro lado, las disfunciones observadas en la neurotransmisión glutamatérgica han dado lugar a la hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia que se basa en que los antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA inducen los síntomas positivos, negativos y cognitivos de la esquizofrenia. Recientemente, se ha publicado una revisión sobre estudios con muestras de cerebro *postmortem* que concluye que existen alteraciones morfológicas en las dendritas de las neuronas glutamatérgicas de individuos con esquizofrenia. Además, se postula que existen cambios en los niveles de componentes del ciclo metabólico del glutamato (Hu y cols., 2015).

Los datos de estudios de imagen y de animales sugieren que los cambios en la función de dopamina pueden estar asociados a una transmisión reducida a través del

receptor NMDA. De hecho las interacciones entre glutamato y dopamina pueden ser importantes en esquizofrenia, dado que las alteraciones en un sistema repercuten en el otro (Laruelle, 2014).

Los resultados con cerebro humano *postmortem* presentados en esta Tesis han dado lugar a un artículo publicado en la revista *International Journal of Neuropsychopharmacology* contribuyendo en gran medida a esclarecer los niveles de expresión de las proteínas presinápticas tras el tratamiento con antipsicóticos (Gil-Pisa y cols., 2012).

5.2. CARACTERIZACIÓN NEUROQUÍMICA DEL MODELO ANIMAL MUNC18-OE

Los modelos animales intentan modelar las características de una enfermedad y sirven como herramienta para el estudio de sus bases biológicas. Además, son determinantes para conocer los mecanismos del organismo, la acción de los fármacos, el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos y el avance hacia los ensayos clínicos.

5.2.1. Evaluación de la expresión génica y proteica de munc18-1a y munc18-1a/b

Tras realizar la transgénesis aditiva para crear el modelo animal Munc18-OE, se realizó una caracterización para asegurar que el proceso había sido exitoso, y que el animal no sólo había insertado el transgén en su genoma, sino que también era capaz de sobreexpresar el ARNm y la proteína correspondiente.

Para ello, en primer lugar se realizaron estudios de qRT-PCR con la ayuda de sondas específicas, confirmando así la sobreexpresión de la isoforma munc18-1a. Esta sobreexpresión también se confirmó por la técnica de hibridación *in-situ* (datos mostrados en Urigüen y cols., 2013).

Mediante diferentes técnicas para la visualización de proteínas, como son el *western blot* y la inmunohistoquímica, se comprobó que el modelo animal Munc18-OE sobreexpresaba la proteína munc18-1. Gracias a la ayuda de diferentes anticuerpos se

consiguió distinguir entre la isoforma munc18-1a y munc18-1b, corroborando que la isoforma a estaba aumentada en estos animales y confirmando una vez más que la fabricación del modelo había sido exitosa (Urigüen y cols., 2013).

Sin embargo, no se observó una sobreexpresión similar de la isoforma munc18-1a en todas las regiones cerebrales analizadas. Estos resultados se pueden atribuir al diseño del animal, ya que el transgén estaba junto al promotor de EAAT3 (*Excitatory Amino Acid Transporter 3*), que es un transportador de glutamato presente en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas (Holmseth y cols., 2012). Por lo tanto, cabría esperar que a más población de este tipo de neuronas, más sobreexpresión de munc18-1a se observe en esa área cerebral. En este trabajo, la región cerebral en la que más inmunoreactividad de munc18-1a se observó fue el cerebelo, donde el transportador EAAT3 está ampliamente localizado en las células de Purkinje junto con el EAAT4 (Furuta y cols., 1997). También se apreció sobreexpresión en áreas como la corteza, región en la que la mayoría de neuronas son piramidales (glutamatérgicas) y el hipocampo (Holmseth y cols., 2012). Sin embargo, en el cuerpo estriado no se obtuvieron diferencias significativas en la inmunoreactividad de munc18-1a, debido a que es un área con expresión mayoritariamente de interneuronas GABAérgicas y colinérgicas y que la densidad de neuronas glutamatérgicas es menor que en la corteza prefrontal (Flórez, 2008).

Hasta la fecha, no se han podido crear animales que carezcan de munc18-1, ya que un ratón que no contenga esta proteína no es viable, lo que supone que esta proteína es esencial para la supervivencia, muriendo los animales *knock-out* a los pocos días de nacer (Verhage y cols., 2000). Voets y colaboradores (2001) al no poder disponer de animales viables, utilizaron células cromafin de embriones de 18 días carentes de munc18-1 y observaron que en las células carentes de la proteína el número de vesículas que podían ser estimuladas para la liberación y el número de vesículas morfológicamente ancladas era menor (Voets y cols., 2001). Por su parte, en los ratones heterocigotos (munc18-1^{+/-}), que mostraron una reducción del 50% en la expresión proteica, al analizar la cantidad de otras proteínas presinápticas no se obtuvieron cambios estadísticamente significativos (Toonen y cols., 2006). Estos

resultados concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo, confirmando que la expresión proteica de munc18-1 no interfiere en los niveles de las demás proteínas presinápticas.

En el trabajo de Toonen y colaboradores se observó que la sobreexpresión de munc18-1 en cultivos celulares no afectaba la morfología neuronal ni en neuronas glutamatérgicas ni en neuronas GABAérgicas (Toonen y cols., 2006). Además, utilizaron animales que sobreexpresaban munc18-1 (Munc18^{OE}) en los que se observó un incremento de la liberación de acetilcolina con respecto a sus homólogos salvajes. El tamaño de la zona activa del botón sináptico, la densidad presináptica y el perímetro de las vesículas no difirieron entre los distintos genotipos del estudio, indicando que los niveles de munc18-1 no influye en la morfología general ni en el tamaño de la sinapsis, pero sí lo hizo el número de vesículas aumentando los niveles de la proteína. Estos autores concluyeron que la eficacia de la transmisión sináptica, tanto de sinapsis excitatorias como inhibitorias, dependía de los niveles de munc18-1 (Toonen y cols., 2006).

Hasta la fecha se han propuesto varias funciones atribuibles a munc18-1: 1) chaperona molecular de syntaxina-1, permitiendo la expresión apropiada de syntaxina-1 en la membrana plasmática (Rowe y cols., 1999, 2001; Medine y cols., 2007; Arunachalam y cols., 2008; McEwen y Kaplan, 2008; Malintan y cols., 2009); 2) el anclaje de vesícula mediada por la formación del complejo SNARE (Shen y cols., 2007, 2010; Rodkey y cols., 2008; Taresté y cols., 2008; Südhof y Rothman, 2009) y 3) el acoplamiento de las vesículas a la membrana plasmática (Shen y cols., 2007, 2010; Rodkey y cols., 2008; Taresté y cols., 2008; Südhof y Rothman, 2009). Sin embargo, aún quedan muchas dudas que disipar sobre las funciones de esta proteína.

5.2.1.1. Cuantificación de la expresión proteica de munc18-1a y munc18-1b tras la administración aguda del antipsicótico clozapina

En la actualidad, la esquizofrenia se trata con fármacos antipsicóticos, tanto típicos como atípicos. Dentro del grupo de los atípicos el más representativo es la

clozapina. Este fármaco se une a varios receptores de neurotransmisores, principalmente a receptores serotoninérgicos 5-HT₂ y receptores dopaminérgicos de la familia D₂ (Richelson y cols., 2000). En ambos casos actúa como antagonista y bloquea preferentemente el receptor dopaminérgico D₄, interfiriendo en menor medida en la unión de la dopamina en D₁, D₂, D₃ y D₅. Además, la clozapina posee acciones antihistamínicas (produce sedación), anticolinérgica muscarínica (en cierto grado antiparkinsoniana), bloqueante α_1 (efectos cardiovasculares) y α_2 adrenérgica (facilitadora de la liberación de dopamina en el estriado).

La clozapina se considera, aún hoy, el fármaco más eficaz entre los antipsicóticos, pero también uno de los que mayores efectos secundarios presenta (ganancia de peso, somnolencia, sialorrea). Algunos de los efectos indeseables son además potencialmente graves (crisis comiciales dosis-dependientes, agranulocitosis), lo que obliga al clínico a una monitorización del paciente (Ruiz-Doblado y cols., 2010).

Tras el tratamiento agudo con 1 mg/kg i.p de clozapina se observó una disminución de la expresión del ARNm correspondiente a la isoforma munc18-1a en los animales Munc18-OE comparado con los animales que habían sido tratados con suero salino. En el caso de los animales control, también se observó una disminución en el contenido de esta proteína pero no llegó a ser estadísticamente significativa.

En otro estudio y tras tratamiento agudo con clozapina, no se han observado cambios significativos en la expresión de munc18-1 mediante *microarray*. Sin embargo, la expresión a nivel de ARNm de Sec1/munc18-1 se vio disminuida en un 20% tras tratamiento crónico con clozapina en corteza prefrontal de rata, pero aumentada en corteza parietal. Estos cambios no se observaron al utilizar el antipsicótico típico haloperidol (Kontkanen y cols., 2002).

En lo referente a niveles proteicos, en el modelo animal Munc18-OE una dosis aguda de clozapina (1 mg/kg) ha sido capaz de normalizar los niveles proteicos de munc18-1a hasta los niveles control. Esta regulación a la baja también se ha observado en las muestras de cerebro *postmortem* de individuos con esquizofrenia que presentaban niveles de fármacos antipsicóticos en plasma en el momento del fallecimiento utilizados en la primera parte de este estudio. Además, comparando la

expresión de la isoforma munc18-1b, al igual que sucede en las muestras humanas incluidas en este trabajo, no se observaron diferencias significativas entre individuos control, individuos con esquizofrenia tratados y no tratados con fármacos antipsicóticos.

En pacientes, la velocidad de aparición de los efectos de la clozapina es variable según el tipo de síntomas. En general, el uso de antipsicóticos de manera aguda revierte puntualmente la sintomatología psicótica. Son varias las publicaciones que existen sobre la administración aguda de clozapina y el cambio a nivel génico, proteico y funcional. Al administrar una única dosis de clozapina, se encontró un aumento significativo en la expresión proteica de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AAAD: *Aromatic Amino Acid Decarboxylase*) en estriado de ratón, que se mantuvo a lo largo del tiempo (Neff y cols., 2006). Tras una única dosis de clozapina de 20 mg/kg, también se observaron cambios en la expresión de numerosos factores de transcripción de la familia de los receptores nucleares analizados por hibridación *in-situ* (Langlois y cols., 2001).

Estos resultados sobre la regulación a la baja de munc18-1a tras el tratamiento antipsicótico abren un camino hacia una nueva diana molecular, lo que hace esencial la existencia de modelos animales como el Munc18-OE y abre nuevas puertas a futuros experimentos.

5.2.2. Cuantificación de las proteínas presinápticas en corteza cerebral del modelo animal Munc18-OE

La liberación de neurotransmisores involucra la fusión de vesículas con la membrana plasmática en respuesta a los aumentos de las concentraciones de calcio intracelular (Voets y cols., 2001). Para que este proceso pueda llevarse a cabo juegan un papel varias proteínas presinápticas. La expresión de varias de ellas se evaluó en el modelo animal Munc18-OE.

Dentro de las proteínas presinápticas participantes en la liberación de neurotransmisores se encuentran las proteínas SNARE: sintaxina-1A, SNAP-25 y sinaptobrevina. Éstas interactúan formando un complejo de hélices α llamado complejo SNARE en el que las proteínas de la membrana plasmática, sintaxina y SNAP-

25, se acoplan con sinaptobrevina, que está anclada en la membrana vesicular, para que ambas membranas se puedan fusionar (Smyth y cols., 2010). Este proceso está regulado por multitud de proteínas localizadas en el botón sináptico que ayudan a que se pueda llevar a cabo la liberación de neurotransmisores, entre ellas se encuentra la proteína munc18-1 (Smyth y cols., 2010). Esta proteína interactúa con sintaxina-1A cuando está en su conformación cerrada haciendo que el motivo SNARE quede escondido. De esta manera, se limita la capacidad de sintaxina-1A para interactuar con las otras dos proteínas SNARE, impidiendo la formación del complejo. Esta interacción está mediada por los dominios -1 y -3a de munc18-1; la cavidad central formada por estos dos dominios proporciona una hendidura para el enlace con sintaxina-1 (Han y cols., 2011).

Al interactuar munc18-1 con el complejo SNARE a través de la proteína sintaxina-1A, se decidió evaluar el estado de las tres proteínas que conforman este complejo en el modelo animal Munc18-OE. En ninguno de los casos, la inserción del transgén supuso alguna diferencia en el estado basal de estas proteínas analizadas al comparar los animales Munc18-OE y sus respectivos controles.

En otro estudio, se utilizaron células cromafines de embriones mutantes carentes de munc18-1 (ya que los animales no son viables) para analizar las proteínas presinápticas mediante *western blot*. En estas células, los niveles de sintaxina-1A/B disminuyeron significativamente mientras que los de SNAP-25 y sinaptobrevina no se vieron alterados. La sintaxina-1A fue capaz de interactuar con las otras dos proteínas que forman el complejo SNARE en ausencia de munc18-1. Teniendo en cuenta que los animales carentes de munc18-1 no liberaban neurotransmisores, estos complejos SNARE que se formaban no debían de ser funcionales ó estar posicionados en una localización errónea (Toonen y cols., 2005). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en gusanos mutantes carentes de unc-18 (proteína homóloga de munc18-1) en los que también se apreció un descenso en el nivel de sintaxina-1 (Bryant y James, 2001; Toonen y cols., 2005).

La disminución de los niveles de sintaxina en neuronas carentes de munc18-1 confirma la interacción entre ambas proteínas. Existen varias hipótesis sobre la causa

que lleva a la bajada de expresión de esta proteína, entre las que se sugiere que munc18-1 es una chaperona que se requiere para el plegamiento de sintaxina-1 (Rowe y cols., 1999; Toonen y cols., 2005). De todas formas, esta afirmación no parece probable porque la sintaxina-1 se pliega y se acopla bien cuando está formando el complejo SNARE. La otra alternativa es que los niveles bajos de sintaxina-1 cuando no hay munc18-1 pueden ser debidos a la falta de liberación de neurotransmisores (Verhage y cols., 2000 Toonen y cols. 2005) ya que los niveles de sintaxina-1 pueden ser influenciados por la actividad neuronal.

Se han transfectado células cromafin bovinas para que sobreexpresen munc18-1 y no se han detectado cambios en los niveles de sintaxina-1, al igual que se ha observado en el modelo animal Munc18-OE (Voets y cols., 2001).

La fosforilación de sintaxina-1A en su serina 14 parece inhibir la interacción con munc18-1 en células de neuroblastoma que concluye en una marcada reducción en la secreción (Rickman y Duncan, 2010). Recientemente, se ha visto reducida la cantidad de sintaxina-1 fosforilada en su serina 14 (p-Ser14-sintaxina), pero no la cantidad total de sintaxina-1 en el área 10 de Brodmann de individuos con esquizofrenia. Esta reducción estuvo asociada con una disminución en la formación del complejo SNARE de ~110kDa (Castillo y cols., 2010).

En el caso de la sinaptobrevina, también hay autores que proponen que interacciona con munc18-1 posicionando a esta proteína correctamente en el momento de la fusión de las dos membranas (Xu y cols., 2010). De hecho, la función de munc18-1 en la fusión involucra interacciones con las proteínas SNARE, como se ha comentado anteriormente. Es por ello, que se han propuesto tres tipos de interacción entre estas proteínas: la interacción binaria munc18-1 y la conformación cerrada de sintaxina-1, la interacción de munc18-1 con la región N-terminal de sintaxina abierta para que pueda darse la formación del complejo y la interacción de munc18-1 con la región C-terminal de sinaptobrevina. Como se ha mencionado con anterioridad, los embriones carentes de munc18-1 mantuvieron los niveles de sinaptobrevina similares a los animales control (Voets y cols., 2001) como se ha observado también en el presente trabajo.

Con respecto a la tercera proteína que forma el complejo SNARE, la SNAP-25, en células PC12 que tenían una expresión reducida de munc18-1 no mostraron cambios en la expresión de esta proteína (Arunachalam y cols., 2008), por lo que se puede suponer que los cambios en la expresión de munc18-1, tanto al alza como a la baja, no afectan a los niveles de SNAP-25.

Además, también se consideró importante cuantificar los niveles de las proteínas sensores de calcio sinaptotagmina y sinaptofisina en los animales objeto de este estudio, dada su importancia en el proceso de la exocitosis. En este aspecto, tampoco hubo cambios al comparar el modelo animal Munc18-OE con sus respectivos homólogos salvajes. Estos resultados están en la línea del estudio en el que se observó que el nivel de munc18-1 no variaba los niveles de sinaptofisina (Toonen y cols., 2006).

La activación de Cdk5 también regula la interacción entre munc18-1 y sintaxina-1A y se comporta como un supresor de la liberación de neurotransmisores ya que fosforila munc18-1 (Kim y Ryan, 2010). En esta Tesis no se han observado diferencias entre animales que sobreexpresan munc18-1a y sus respectivos controles pero en cerebro humano se ha detectado una disminución de la proteína Cdk5 en individuos con esquizofrenia que presentaban niveles de fármacos antipsicóticos en plasma en el momento del fallecimiento (Ramos-Miguel y cols., 2013).

Los resultados de las proteínas presinápticas analizadas (munc18-1a, munc18-1b, sintaxina-1A, sinaptobrevina, SNAP-25, sinaptotagmina y sinaptofisina) que se han obtenido en el presente estudio sobre el modelo animal Munc18-OE son concordantes a los observados en la primera parte de este trabajo donde no se encontraron cambios en muestras cerebrales de individuos diagnosticados de esquizofrenia.

5.2.3. Cuantificación de las proteínas relacionadas con esquizofrenia en corteza cerebral del modelo animal Munc18-OE

Aunque los genes que más se han relacionado con la esquizofrenia en estudios de asociación en genoma entero (Genome-wide association studies o GWAS) incluyen el que codifica el receptor dopaminérgico D₂ (diana de todos los fármacos antipsicóticos efectivos) y los que codifican los receptores glutamatérgicos (Schizophrenia Working

Group of the Psychiatric Genomics Consortium, 2014), también se ha establecido relación otros genes codificantes.

5.2.3.1. DISC-1

Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC-1) es una proteína relacionada con la susceptibilidad a padecer trastornos psiquiátricos. La asociación entre el gen DISC-1 y la esquizofrenia se ha propuesto en varias investigaciones pero dada la complejidad y la amplia diversidad de las funciones de la proteína aún no se han establecido interacciones claras (Millar y cols., 2000; Soares y cols., 2011).

En el caso de los animales Munc18-OE no se observaron cambios cuando se compararon con sus homónimos salvajes, sugiriendo que esta proteína no se vio afectada por la adición del transgén y la sobreexpresión de munc18-1a.

Aunque las funciones de DISC-1 no están del todo claras, se sugiere que es una proteína andamio que interactúa con varios tipos de proteínas como factores de transcripción, fosfodiesterasas y proteínas implicadas en la organización citosquelética (Millar y cols., 2003; Kamiya y cols., 2008; Yin y cols., 2012). Se han realizado estudios tanto en cultivos celulares como en *Drosophila melanogaster* y ratones que sugieren que esta proteína puede estar relacionada con la migración, posicionamiento y diferenciación de neuronas, así como con la extensión de neuritas (Kamiya y cols., 2005; Yin y cols., 2012). En células inmaduras, DISC-1 se encuentra en los microtúbulos y en el núcleo, donde interactúa con factores de transcripción de la familia CREB. Por el contrario, en células maduras esta proteína se localiza en el complejo PSD y el núcleo (Jaaro-Peled y cols., 2009). Desgraciadamente, la falta de un ratón que carezca de esta proteína dificulta determinar el papel exacto de DISC-1 *in vivo*.

Los ratones mutantes con una delección de 25 pares de bases en el exón 6 del gen de la DISC-1 exhiben un menor número de espinas sinápticas en el giro dentado, déficits en la plasticidad de las sinapsis y una memoria de trabajo alterada (Kvajo y cols., 2008). La falta de esta proteína completa en neuronas jóvenes en animales adultos conlleva su mal posicionamiento y una formación acelerada de espinas dendríticas y sinapsis (Yin y cols., 2012) y una reducción en la inmunoreactividad de

parvalbumina, que es un marcador de un tipo de interneuronas, en la corteza cerebral (Niwa y cols., 2010).

5.2.3.2. NRG1, receptor ErbB4 y PSD-95

Los genes de la neuroregulina 1 (NRG1) y su receptor, ErbB4, se han identificado como susceptibles para padecer esquizofrenia en varios estudios (Stefansson y cols., 2002; Yin y cols., 2012).

En el modelo Munc18-OE no se apreciaron cambios en la expresión proteica ni de NRG1 ni de su receptor, el ErbB4. Estos resultados sugieren que la manipulación genética que han sufrido estos animales no interviene en el estado de dichas proteínas, aunque ambas estén involucradas en esquizofrenia.

Dada la complejidad de la estructura, el perfil de expresión y las vías de señalización del producto de este gen, NRG1 parece tener diversas funciones. Dos de las más importante son la migración cortical de las interneuronas GABAérgicas (y por ello, podría contribuir a la patología del neurodesarrollo de las interneuronas observada en esquizofrenia) (Flames y cols., 2004) y la regulación de la mielinización (Michailov y cols., 2004). Por lo tanto, una expresión reducida de NRG1 puede dar lugar a hipomielización y una menor velocidad de transmisión (Michailov y cols., 2004). De hecho, se describió que un desbalance en la expresión de las isoformas de NRG1 podría causar déficits a nivel sináptico que comúnmente están asociados con la esquizofrenia (Marin y Rico, 2013). Concretamente, el grupo de Yin y colaboradores (2013) demostró que la expresión al alza de neuregulina 1 causa disfunciones a nivel sináptico y déficits comportamentales similares a los observados en esquizofrenia. Estas alteraciones pueden ser revertidas normalizando los niveles de neuregulina-1, abriendo nuevas posibilidades para el tratamiento de la esquizofrenia (Yin y cols., 2013).

La expresión del receptor ErbB4 está enriquecida en interneuronas GABAérgicas, que están consideradas como los elementos que controlan la hiperexcitabilidad en el cerebro. Durante el desarrollo, la vía NRG1-ErbB4 parece que juega un papel en la formación de neuronas excitatorias en dichas interneuronas (Fazzari y cols., 2010; Marin, 2012), pudiendo contribuir a la patología del

neurodesarrollo de las interneuronas observada en esquizofrenia y comentada anteriormente. Este fenómeno puede ser debido a que la falta del receptor ErbB4 implica déficits en su activación, en la síntesis de GABA y/ o en la formación de sinapsis inhibitorias (del Pino y cols., 2013).

En un estudio llevado a cabo con muestras de cerebro *postmortem* de pacientes con esquizofrenia, se apreció una activación de ErbB4 inducida por NRG1 incrementada y una activación del receptor NMDA disminuida comparados con los individuos control. Es por ello que se sugiere que la cascada NRG1-ErbB4 juega un papel en los cerebros adultos de pacientes con esquizofrenia (Hahn y cols., 2006). Los estudios *in vitro* sugieren que la señalización a través de NRG1-ErbB4 puede regular la migración neuronal y la expresión génica de los receptores NMDA y GABA (Mei y Xiong, 2008; Yin y cols., 2012).

Las cascadas de NRG1-ErbB4 y DISC-1 juegan papeles en varios aspectos del desarrollo pre- y perinatal, así como en la maduración cerebral postnatal. A nivel celular, estas tres proteínas median directamente la transcripción génica en el núcleo (Sardi y cols., 2006; Sawamura y cols., 2008). Las proteínas ErbB4 y DISC-1 están localizados en el dominio PDZ de las sinapsis glutamatérgicas (Kirkpatrick y cols., 2006;) donde existen otros factores susceptibles para la esquizofrenia, como son RGS4, CAPON y la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (Jaaro-Peled y cols., 2009). Esta última enzima se cuantificó en el modelo animal Munc18-OE y nos se observaron cambios estadísticamente significativos al compararlos con sus homónimos salvajes (datos mostrados en Urigüen y cols., 2013).

Lamentablemente, un factor técnico que dificulta la interpretación de las cascadas NRG1-ErbB4 y DISC-1 es la existencia de una amplia diversidad de variantes de NRG1 y DISC-1 (Jaaro-Peled y cols., 2009), aunque la comparación entre los fenotipos de modelos animales creados a partir de estas proteínas presentan varias similitudes, como por ejemplo ventrículos lateral más grandes y una densidad de espinas dendríticas más baja en las neuronas piramidales.

Otro enfoque que se ha estudiado es el papel que ejerce NRG1 en los receptores NMDA. Se sabe que un punto de interacción es la proteína postsináptica

PSD-95, la cual se asocia con ErbB4 y los receptores NMDA en las sinapsis excitatorias. Concretamente, un estudio de Gu y colaboradores (2005) mostró evidencias de que NRG1 regulaba las funciones de los receptores NMDA en cerebro adulto. Una exposición de NRG1 disminuía la corriente del receptor y la actividad del canal en las neuronas piramidales, debido al aumento de la internalización de receptores. Estos resultados poseen gran relevancia ya que en esquizofrenia se ha sugerido que existe una disminución de este receptor glutamatérgico.

Por último, en el modelo animal Munc18-OE también se analizaron los niveles de la proteína PSD-95 que, como se ha comentado anteriormente, directamente no se ha relacionado con la esquizofrenia pero que interacciona con el receptor de NRG-1 (ErbB4) y con los receptores ionotrópicos de glutamato NMDA. En esta ocasión, tampoco se obtuvieron cambios estadísticamente significativos al cuantificar las dos bandas visibles (100 y 75 kDa) que se obtenían al incubar con el anticuerpo contra la proteína PSD-95 entre animales control y animales transgénicos.

La proteína PSD-95 es un componente del complejo PDZ que está asociada a receptores y elementos del citoesqueleto en las sinapsis, pero sus funciones siguen siendo desconocidas. Se ha observado que una sobreexpresión de esta molécula hace madurar a las sinapsis glutamatérgicas en neuronas hipocámpales. La expresión de PSD-95 intensificó la agrupación postsináptica y la actividad de los receptores glutamatérgicos, además de la maduración del terminal presináptico y el aumento del número y del tamaño de las espinas dendríticas. Estos resultados demostraron que PSD-95 fue capaz de organizar el desarrollo sináptico y cabe la posibilidad de que participe en la estabilidad y la plasticidad sináptica (El-Din El-Husseini, 2000).

Las alteraciones en los receptores glutamatérgicos NMDA se han implicado en los trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia (hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia). El bloqueo de estos canales en individuos sanos producen comportamientos similares a los síntomas y los déficits cognitivos de la esquizofrenia y este antagonismo de estos receptores exagera los síntomas en individuos con esquizofrenia (Gilmour y cols., 2012). Al administrar antagonistas de los receptores

NMDA a animales se producen cambios en la transmisión dopaminérgica similar a la descrita en pacientes con esquizofrenia (Jentsch y Roth, 1999).

Los receptores NMDA están involucrados en procesos de aprendizaje y memoria y, recientemente, se han relacionado con plasticidad y excitabilidad neuronal y alteraciones sinápticas (Yamamoto y cols., 2015). Es por ello que se decidió evaluar la expresión proteica de las subunidades que conforman los receptores glutamatérgicos NMDA (NR1 y NR2) en el modelo animal Munc18-OE. Mientras que los ratones transgénicos no presentaron alteraciones en dichas subunidades comparadas con los ratones control, se observó una regulación al alza en la evaluación de las formas fosforiladas de estas subunidades (datos mostrados en Urigüen y cols., 2013). Estos resultados concuerdan con estudios en los que se han observado niveles aumentados de dichas subunidades en corteza de pacientes que sufrían esquizofrenia (Dracheva y cols., 2001).

5.2.3.3. Cuantificación de la expresión proteica de las proteínas relacionadas con esquizofrenia tras la administración aguda del antipsicótico clozapina

5.2.3.3.1. DISC-1

El tratamiento agudo con clozapina (1 mg/kg) en los animales Munc18-OE no alteró de manera significativa los niveles proteicos de *Disrupted In Schizophrenia-1* (DISC-1) al compararlos con los de sus homónimos salvajes.

De manera diferente, en el estudio de Chiba y colaboradores del año 2006, la expresión de DISC-1 en la corteza prefrontal e hipocampo de ratón se incrementó por los fármacos antipsicóticos atípicos. En dicho trabajo, se utilizaron antipsicóticos típicos (haloperidol) y atípicos (olanzapina, risperidona y clozapina) durante un tratamiento crónico de 21 días. Concretamente, se analizó la expresión del ARNm en corteza y se observó un aumento en los niveles de DISC-1 en animales tratados con los antipsicóticos atípicos olanzapina y risperidona. El tratamiento con clozapina tendía a incrementar los niveles de DISC-1, pero sin llegar a ser significativo. Este mismo experimento se realizó también en hipocampo donde se observó que olanzapina era

capaz de aumentar los niveles de ARNm de DISC-1. Estos hallazgos sugieren que los niveles de expresión de ARNm de DISC-1 están incrementados por la administración crónica de algunos fármacos antipsicóticos en la corteza y el hipocampo de ratón y que esta proteína podría estar modulada por el tratamiento antipsicótico. Las incongruencias observadas en los diferentes estudios pueden ser debidas a que en el presente trabajo se ha utilizado una administración aguda de clozapina mientras que el grupo de Chiba y colaboradores administró esta sustancia de manera crónica.

5.2.3.3.2. *NRG1, receptor ErbB4 y PSD-95*

Como se ha comentado anteriormente, la proteína NRG1 posee multitud de isoformas pero en este trabajo solamente se cuantificaron dos bandas mediante la técnica de *western blot*. En la cuantificación de ambas bandas, de aproximadamente 80 y 65 kDa, no se observaron cambios estadísticamente significativos. En el caso de su receptor ErbB4 tampoco se apreciaron diferencias entre animales Munc18-OE y sus controles.

Varios estudios han concluido que los animales carentes del receptor ErbB4 se comportan de manera alterada, mostrando hiperactividad en el campo abierto, el laberinto en Y, así como déficits en la inhibición prepulso o PPI (Barros y cols., 2009) y en la interacción social (Kato y cols., 2011). Estas diferencias en el comportamiento pueden ser normalizadas por el tratamiento antipsicótico (Stefansson y cols., 2002). Además, la clozapina es capaz de revertir otras anormalidades en animales que carecen de receptor ErbB4, incluyendo una disminución en la ansiedad y actividades agresivas (Barros y cols., 2009). En el caso del modelo animal Munc18-OE, y como ya se ha comentado, se ha observado también un comportamiento hiperactivo en el laberinto elevado en cruz y alteraciones en la prueba de PPI que se revertían tras la administración aguda de clozapina 1,5 mg/kg i.p. (datos mostrados en Urigüen y cols., 2013).

En vista de la relación entre la señalización NRG-1 y ErbB4, el tratamiento antipsicótico y la esquizofrenia, se han realizado estudios para aclarar si los antipsicóticos atípicos son capaces de regular dicha señalización y si esta regulación contribuye a controlar los síntomas de la enfermedad (Pan y cols., 2011). En un estudio

in vivo, un tratamiento de cuatro semanas con haloperidol incrementó la expresión de NRG1 y ErbB4, mientras que la clozapina redujo la expresión de las isoformas de neuregulina-1 en corteza de ratas (Wang y cols., 2008) pero no aumentó su expresión en hipocampo.

A pesar de que existen multitud de estudios, los mecanismos por los que los fármacos antipsicóticos pueden afectar a esta vía son aún desconocidos (Pan y cols., 2011). Junto a la duración del tratamiento, se consideran otros factores para explicar las incongruencias entre estudios, ya que todos no han utilizado el mismo tipo de tejido ni los mismos fármacos. Debido a que estos últimos poseen diferentes características farmacológicas podrían estar interviniendo de distinta manera en la señalización NRG1-ErbB4 (Deng y cols., 2013).

No existen evidencias de que los fármacos antipsicóticos se unan directamente a los receptores ErbB4 ya que está claro que esta clase de fármacos poseen alta afinidad por receptores acoplados a proteínas G como los dopaminérgicos o los serotoninérgicos (Kapur y Mamo, 2003). Es por ello, que se deben enfocar las futuras investigaciones en aclarar los mecanismos que pueden influir en la regulación tanto de la señalización NRG-1-ErbB4 como de otros sistemas de neurotransmisión y otros genes candidatos.

En el caso de la proteína de andamiaje PSD-95, no se encontraron diferencias significativas entre los cuatro grupos de experimentación (animales control tratados con suero salino, animales control tratados con clozapina 1 mg/kg, animales Munc18-OE tratados con suero salino y animales Munc18-OE tratados con clozapina 1 mg/kg). Es decir, que ni el genotipo ni el tratamiento fueron capaces de cambiar los niveles de dicha proteína.

Existen estudios que demuestran que los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, que son esenciales para la acción de los fármacos antipsicóticos atípicos y los alucinógenos de tipo LSD (González-Maeso y cols., 2007), pueden interactuar con la proteína PSD-95, esencial en la regulación de la señalización glutamatérgica mediada por los receptores ionotrópicos (Nicoll y cols., 2006). Estos datos *in vitro* sugieren que PSD-95 podría tener un papel en la regulación de dichos receptores *in vivo* sujetándolos a la

membrana plasmática y regulando su tráfico y función. De hecho, la delección de la proteína PSD-95 alteró la señalización y expresión de estos dos receptores serotoninérgicos, sugiriendo que la interacción es esencial para el correcto funcionamiento de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}, incluyendo su capacidad de mediar las acciones de alucinógenos y fármacos antipsicóticos (Abbas y cols., 2009).

En vista de estos hallazgos sería interesante indagar el estado del sistema serotoninérgico en el modelo animal Munc18-OE.

5.2.4. Cuantificación de los receptores cannabinoides en corteza del modelo animal Munc18-OE

El consumo de cannabis, particularmente durante la adolescencia, se ha asociado a un incremento en la severidad de los síntomas de la esquizofrenia, un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad y una edad más temprana de aparición (Galvez-Buccollini y cols., 2012). Estas asociaciones se atribuyen a alteraciones que se han observado en la señalización a través del sistema endocannabinoide en la corteza prefrontal, como por ejemplo alteraciones en la expresión del receptor CB1 en esquizofrenia (Eggen y cols., 2008).

Los receptores cannabinoides CB1 se expresan en regiones cerebrales que se han visto alteradas en esquizofrenia, como el hipocampo o los ganglios basales. Los estudios con muestras *postmortem* han demostrado un incremento en la densidad del receptor CB1, particularmente en la corteza prefrontal dorsolateral de individuos con esquizofrenia (Dean y cols., 2001).

Gracias a los animales *knock-out*, se sabe que la ausencia del receptor CB1 incrementa la actividad motora, mientras que los animales que carecen de este receptor presentan déficits en el paradigma de la inhibición prepulso de la respuesta de sobresalto (Marongiu y cols., 2012). Por su parte, los ratones *knock-out* del receptor CB2 exhibieron una menor actividad locomotora espontánea y una sensibilidad a la cocaína incrementada en la prueba del campo abierto. Además, estos animales presentaron una respuesta disminuida en el PPI, que es una alteración observada en

individuos con esquizofrenia (Braff y cols., 2001). De manera interesante, esta alteración se vio revertida tras el tratamiento crónico con el antipsicótico risperidona.

Debido a que el consumo de cannabis parece estar asociado, en ocasiones, a la aparición de cuadros psicóticos y a que los receptores cannabinoides se han visto alterados en esquizofrenia, se decidió cuantificar los niveles de los receptores cannabinoides CB1 y CB2 en los animales Munc18-OE. Los animales transgénicos no presentaron alteraciones en la evaluación de la expresión proteica de estos receptores.

5.2.5. Cuantificación de las proteínas de las vías apoptóticas en corteza del modelo animal Munc18-OE

La apoptosis es un mecanismo importante para la remodelación de tejidos durante el desarrollo y la vida adulta. La vía extrínseca de la apoptosis involucra interacciones mediadas por receptores de muerte, miembros de la familia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNF). En esta familia se encuentra el receptor Fas que cuando su ligando (Fas L) se une puede desencadenar varios procesos celulares no apoptóticos, incluyendo la proliferación y la supervivencia (Peter y cols., 2007; Choi y cols., 2009). Aunque las interacciones Fas- FasL pueden inducir apoptosis en algunos tipos celulares, también son capaces de proteger a las células y regular la regeneración tisular (Choi y cols., 2009).

El receptor Fas interacciona con FADD en la vía extrínseca de la apoptosis (Chinnaiyan y cols., 1995). Esta proteína es multifuncional y puede inducir tanto acciones apoptóticas como no-apoptóticas. El complejo Fas/FADD media las señales no apoptóticas en el sistema nervioso central, que pueden influir en la plasticidad sináptica (Ramos-Miguel y cols., 2010).

La neuropatología de la esquizofrenia parece estar caracterizada por déficits sinápticos y pérdida de neuritas sin una pérdida neuronal general. Estudios estructurales de resonancia magnética indican que la pérdida de volumen de la sustancia gris es progresiva, por lo menos hasta el primer episodio psicótico. Se ha sugerido que la actividad apoptótica contribuye a estos déficits ya que el proceso de

apoptosis se ha identificado como un mecanismo que puede producir pérdida de sinapsis y neuritas (Glantz y cols., 2006). Aunque los mecanismos involucrados en la reducción del volumen cortical en esquizofrenia son bastante desconocidos, varios estudios sugieren un papel de las proteínas de las vías apoptóticas en estos déficits (Benes y cols., 2003; Jarskog y cols., 2004). Una regulación alterada de las cascadas apoptóticas reduce la viabilidad neuronal y glial a lo largo del neurodesarrollo y podría contribuir a la déficits volumétricos y funcionales característicos de pacientes con esquizofrenia.

En un estudio reciente con muestras cerebrales *postmortem*, no se observaron alteraciones en la cantidad de FADD (tanto a nivel de expresión génica como proteica), p-FADD (formas monomérica y oligoméricas) y el ratio p-FADD/FADD en los individuos con esquizofrenia, independientemente de la ausencia o presencia de fármacos antipsicóticos en plasma en el momento del fallecimiento (García-Fuster y cols., 2014). En un trabajo previo, tampoco se encontraron diferencias en la expresión de ARNm en la corteza prefrontal de individuos con esquizofrenia (Catts y Weickert, 2012).

Para evaluar el estado apoptótico, se analizaron en los animales Munc18-OE las vías tanto extrínseca como intrínseca de la apoptosis. En la vía extrínseca, la activación del receptor de Fas permite el reclutamiento de la proteína FADD (*Fas Associated Death Domain*). En los animales Munc18-OE se observó una regulación al alza de esta proteína pero no de su forma activa, pFADD. Tampoco se obtuvieron cambios significativos ni en la cantidad del receptor Fas ni en la de PARP, una proteína involucrada en último paso de la activación de las vías apoptóticas.

Aunque las consecuencias de que la apoptosis esté desregulada en esquizofrenia aún son desconocidas, el hecho de que los mecanismos apoptóticos pueden influir en la conectividad sináptica y la complejidad neuronal respalda la hipótesis de la alteración de la apoptosis en esquizofrenia. Aunque todavía se desconocen lo que significa unos marcadores apoptóticos alterados, estos descubrimientos pueden esclarecer la complejidad de la esquizofrenia, haciendo que puedan ser posibles intervenciones farmacológicas (Glantz y cols., 2006).

5.2.6. Evaluación funcional del modelo animal Munc18-OE

La esquizofrenia es una enfermedad exclusivamente humana. Sin embargo, un modelo animal que presente similitudes comportamentales puede ser importante para comprender los posibles sustratos neurológicos implicados en esta patología.

El resultado del análisis de la actividad motora espontánea mediante la realización de la prueba del actímetro sugirió que la sobreexpresión de munc18-1a producía una disminución de la respuesta motora de los animales Munc18-OE. Por el contrario, en la prueba del Rotarod no se obtuvieron diferencias entre estos animales y sus respectivos controles, por lo que la coordinación motora parecía no estar afectada por la mutación. Estos resultados apuntan a que el modelo animal Munc18-OE tiene un comportamiento más hiperactivo con una actividad motora alterada en comparación con los animales salvajes.

En cuanto a la evaluación de la actividad exploratoria, se realizó mediante la prueba de la caja con agujeros. Es un test ampliamente utilizado en comportamiento de tipo ansioso en roedores (Yen y cols., 2013; Hansen y cols., 2014). Los animales Munc18-OE no mostraron diferencias frente a sus homónimos salvajes, sugiriendo que la adición del transgén no influyó en su capacidad de exploración.

Para analizar el comportamiento depresivo del modelo animal Munc18-OE, los animales se sometieron a la prueba de la natación forzada o test de Porsolt (Porsolt y cols., 1977), que se utiliza para detectar sustancias potencialmente antidepresivas, ya que la inmovilidad del animal se interpreta como una desesperación conductual. En esta prueba no se observaron efectos significativos en cuanto a genotipo del animal se refiere, no habiendo diferencias significativas entre animales salvajes y transgénicos, sugiriendo que la sobreexpresión de munc18-1a no es un factor a la hora de desarrollar alteraciones emocionales. En la actualidad existe una gran controversia a la hora de interpretar los resultados de esta prueba: clásicamente la inmovilidad se ha caracterizado de manera negativa representando la pérdida de esperanza del animal. Sin embargo, existe un debate entre los investigadores ya que algunos sugieren que a más tiempo de inmovilidad, el animal demuestra más aprendizaje adaptándose positivamente al medio. El animal aprende que no puede escapar, conservando así su energía hasta la finalización de la prueba (Petit-Demouliere y cols., 2005).

La prueba del laberinto elevado en cruz proporciona una buena aproximación del grado de ansiedad del animal basándose en la frecuencia y en la duración que éste está en los brazos abiertos. De esta forma, se permite evaluar los efectos ansiogénicos de fármacos y hormonas esteroideas y definir las áreas cerebrales y mecanismos relacionados con el comportamiento ansioso (Walf y Frye, 2007). Los animales Munc18-OE no entraron tantas veces y durante tanto tiempo como los ratones salvajes en los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz, sugiriendo, así, un grado de ansiedad más elevado en su comportamiento ya que la prueba se fundamenta en la aversión que muestran los roedores por la altura y los espacios abiertos. Esta aversión se asocia al aumento de corticosterona en sangre, la paralización y al aumento de la defecación (Pellow y cols., 1985) que son indicadores de un aumento de la ansiedad en roedores (Urigüen y cols., 1999).

La comunicación social se ve afectada en pacientes con trastornos neuropsiquiátricos. Es por ello este déficit debe de ser evaluado en los modelos animales diseñados para el estudio de estas enfermedades (Ferhat y cols., 2015). Los ratones son animales sociales que utilizan señales visuales, olfatorias y táctiles para comunicarse entre ellos. Una de las pruebas de comportamiento más utilizada en animales es la interacción social, que consiste en situar a dos animales de distintas jaulas en un espacio desconocido y cuantificar el tiempo que interactúan entre ellos. En el caso de los animales Munc18-OE el nivel de interacción era menor que en los animales control.

Los resultados de este modelo animal de esquizofrenia presentados en esta Tesis han dado lugar a un artículo publicado en la revista *Translational Psychiatry* contribuyendo a descifrar los componentes clave de la esquizofrenia y la respuesta al tratamiento (Urigüen y cols., 2013).

5.3. FUTURO

La regulación a la baja de munc18-1a asociada al tratamiento con fármacos antipsicóticos descrita en esta Tesis abre una nueva ventana para el desarrollo de nuevas dianas moleculares. No obstante, sería de gran interés reproducir los hallazgos

observados en otra población de muestras de pacientes con esquizofrenia e individuos control emparejados.

De igual manera, la búsqueda de marcadores a nivel periférico que se modifiquen con el tratamiento con fármacos antipsicóticos sería de gran ayuda para contribuir al seguimiento de la evolución de la enfermedad y poder mejorar la calidad de vida de los pacientes. Así mismo, sería altamente recomendable un estudio de expresión génica y polimorfismos en humanos tanto a nivel cerebral como periférico ya que de esta manera se podrían establecer genotipos de riesgo e interacciones genotipo-fenotipo.

La creación de modelos animales en Psiquiatría tiene sus limitaciones, ya que se trata de reproducir en un animal conductas humanas muy complejas. A pesar de todo, se utilizan para comprender las bases biológicas de las enfermedades y estudiar nuevos tratamientos. Evidentemente, el estudio del modelo animal Munc18-OE está incompleto ya que se necesitarían evaluar otros parámetros de su caracterización tanto a nivel de su neuroquímica como de su comportamiento. Además, sería interesante realizar estudios electrofisiológicos para observar las propiedades eléctricas de sus neuronas.

Además, tendría interés observar la expresión de las diferentes proteínas presinápticas en estos animales tras administrar un antipsicótico de manera crónica prestando especial atención a las isoformas munc18-1a y munc18-1b.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos tras los ensayos de inmunodetección que se han desarrollado en el presente estudio con muestras cerebrales *postmortem* se puede concluir que:

- 1.** El tratamiento con antipsicóticos induce una reducción del contenido proteico de la isoforma munc18-1a en los individuos con esquizofrenia frente a los individuos control.
- 2.** En individuos con esquizofrenia existe un aumento del contenido proteico de sintaxina-1, independientemente de la presencia o no de tratamiento antipsicótico.
- 3.** Existe una correlación positiva entre las proteínas sintaxina-1A y munc18-1a en individuos control mientras que dicha correlación es negativa en individuos con esquizofrenia. El desbalance de la interacción entre proteínas del complejo SNARE (principalmente sintaxina-1A) y la proteína munc18-1a podría estar implicado en las disfunciones corticales de la neurotransmisión glutamatérgica y dopaminérgica que se han postulado como hipótesis para la esquizofrenia.
- 4.** Las alteraciones encontradas en los diferentes componentes de la maquinaria excitotónica son exclusivas de la esquizofrenia y no generales de otras enfermedades mentales tal y como demuestra el hecho de que no se producen cambios en las proteínas presinápticas estudiadas en muestras de cerebro *postmortem* de individuos con depresión.
- 5.** El tratamiento con antipsicóticos induce una reducción del contenido proteico de la forma de ~75 kDa del complejo SNARE en los individuos con esquizofrenia frente a los individuos control.
- 6.** La regulación a la baja de munc18-1a y la forma de ~75 kDa del complejo SNARE asociada al tratamiento antipsicótico abre una nueva vía para el desarrollo de nuevas dianas moleculares relacionadas con la actividad farmacológica del tratamiento antipsicótico.

De los resultados obtenidos en la caracterización neuroquímica y comportamental del modelo animal Munc18-OE se puede concluir que:

7. La creación del animal Munc18-OE ha sido exitosa ya que estos animales sobreexpresan el ARNm y la proteína correspondiente a la isoforma munc18-1a. Esta sobreexpresión se normaliza tras una administración aguda del fármaco antipsicótico clozapina.

8. Las proteínas presinápticas que forman el complejo SNARE, syntaxina-1A, SNAP-25 y sinaptobrevina, y las proteínas sensores de calcio, sinaptotagmina y sinaptifisina, no están alteradas en el modelo animal Munc18-OE.

9. Las proteínas que se relacionan con esquizofrenia, DISC-1, neuregulina-1 y sus receptor ErbB4 y PSD-95, tampoco presentan cambios en dicho modelo. Una única dosis de clozapina no cambió la expresión de estas proteínas.

10. La expresión de los receptores cannabinoides no está alterada sugiriendo que el sistema cannabinoide endógeno no está alterado en el modelo animal Munc18-OE.

11. En cuanto a las vías apoptóticas, existe un aumento de la proteína apoptótica FADD en el modelo animal Munc18-OE, lo que cual podría contribuir a la pérdida de volumen cerebral observada en animal Munc18-OE.

12. A nivel comportamental, el modelo animal Munc18-OE presenta hiperactividad y alto grado de ansiedad. Además, estos animales presentan déficits sociales. Sin embargo, la coordinación, la capacidad exploratoria y el estado de depresión no están alterados.

13. La proteína munc18-1 juega un papel importante en el desarrollo de diferencias comportamentales, neuroquímicas y anatómicas que pueden parecerse a los presentes en esquizofrenia.

7. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abbas, A. I., P. N. Yadav, W. D. Yao, M. I. Arbuckle, S. G. Grant, M. G. Caron y B. L. Roth (2009). "PSD-95 is essential for hallucinogen and atypical antipsychotic drug actions at serotonin receptors." *J Neurosci* 29(22): 7124-7136.
- Abi-Dargham, A., O. Mawlawi, I. Lombardo, R. Gil, D. Martinez, Y. Huang, D. R. Hwang, J. Keilp, L. Kochan, R. Van Heertum, J. M. Gorman y M. Laruelle (2002). "Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia." *J Neurosci* 22(9): 3708-3719.
- Abi-Dargham, A., X. Xu, J. L. Thompson, R. Gil, L. S. Kegeles, N. Urban, R. Narendran, D. R. Hwang, M. Laruelle y M. Slifstein (2012). Increased prefrontal cortical D(1) receptors in drug naive patients with schizophrenia: a PET study with [(1)(1)C]NNC112. *J Psychopharmacol*. 26: 794-805.
- Akil, M., C. L. Edgar, J. N. Pierri, S. Casali y D. A. Lewis (2000). Decreased density of tyrosine hydroxylase-immunoreactive axons in the entorhinal cortex of schizophrenic subjects. *Biol Psychiatry*. 47: 361-370.
- Alappat, E. C., C. Feig, B. Boyerinas, J. Volkland, M. Samuels, A. E. Murmann, A. Thorburn, V. J. Kidd, C. A. Slaughter, S. L. Osborn, A. Winoto, W. J. Tang y M. E. Peter (2005). "Phosphorylation of FADD at serine 194 by CKIalpha regulates its nonapoptotic activities." *Mol Cell* 19(3): 321-332.
- Arango, C., M. Rapado-Castro, S. Reig, J. Castro-Fornieles, A. Gonzalez-Pinto, S. Otero, I. Baeza, C. Moreno, M. Graell, J. Janssen, M. Parellada, D. Moreno, N. Bargallo y M. Desco (2012). "Progressive brain changes in children and adolescents with first-episode psychosis." *Arch Gen Psychiatry* 69(1): 16-26.
- Arunachalam, L., L. Han, N. G. Tassew, Y. He, L. Wang, L. Xie, Y. Fujita, E. Kwan, B. Davletov, P. P. Monnier, H. Y. Gaisano y S. Sugita (2008). "Munc18-1 is critical for plasma membrane localization of syntaxin1 but not of SNAP-25 in PC12 cells." *Mol Biol Cell* 19(2): 722-734.
- Ashton, C. H. y P. B. Moore (2011). "Endocannabinoid system dysfunction in mood and related disorders." *Acta Psychiatr Scand* 124(4): 250-261.

B

- Balu, D. T. y J. T. Coyle (2011). "Neuroplasticity signaling pathways linked to the pathophysiology of schizophrenia." *Neurosci Biobehav Rev* 35(3): 848-870.
- Balu, D. T. y J. T. Coyle (2015) "The NMDA receptor 'glycine modulatory site' in schizophrenia: dserine, glycine, and beyond". *Curr Opin Pharmacol* 20C, 109-115.
- Barakauskas, V. E., C. L. Beasley, A. M. Barr, A. R. Ypsilanti, H. Y. Li, A. E. Thornton, H. Wong, G. Rosokilja, J. J. Mann, B. Mancevski, Z. Jakovski, N. Davceva, B. Ilievski, A. J. Dwork, P.

- Falkai y W. G. Honer (2010). "A novel mechanism and treatment target for presynaptic abnormalities in specific striatal regions in schizophrenia." Neuropsychopharmacology 35(5): 1226-1238.
- Barnett, D. G. y J. A. Bibb (2011). "The role of Cdk5 in cognition and neuropsychiatric and neurological pathology." Brain Res Bull 85(1-2): 9-13.
- Barros, C. S., B. Calabrese, P. Chamero, A. J. Roberts, E. Korzus, K. Lloyd, L. Stowers, M. Mayford, S. Halpain y U. Muller (2009). "Impaired maturation of dendritic spines without disorganization of cortical cell layers in mice lacking NRG1/ErbB signaling in the central nervous system." Proc Natl Acad Sci 106(11): 4507-4512.
- Behan, A. T., C. Byrne, M. J. Dunn, G. Cagney y D. R. Cotter (2009). "Proteomic analysis of membrane microdomain-associated proteins in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder reveals alterations in LAMP, STXBP1 and BASP1 protein expression." Mol Psychiatry 14(6): 601-613.
- Bellon, A. (2007). "New genes associated with schizophrenia in neurite formation: a review of cell culture experiments." Mol Psychiatry 12(7): 620-629.
- Benes, F. M., J. Walsh, S. Bhattacharyya, A. Sheth y S. Berretta (2003). "DNA fragmentation decreased in schizophrenia but not bipolar disorder." Arch Gen Psychiatry 60(4): 359-364.
- Blackwood, D. H., A. Fordyce, M. T. Walker, D. M. St Clair, D. J. Porteous y W. J. Muir (2001). "Schizophrenia and affective disorders—cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family." Am J Hum Genet 69(2): 428-433.
- Bock, J. B. y R. H. Scheller (1999). "SNARE proteins mediate lipid bilayer fusion." Proc Natl Acad Sci 96(22): 12227-12229.
- Bonifacino, J. S. y B. S. Glick (2004). "The mechanisms of vesicle budding and fusion." Cell 116(2): 153-166.
- Bouaboula, M., C. Poinot-Chazel, B. Bourrie, X. Canat, B. Calandra, M. Rinaldi-Carmona, G. Le Fur y P. Casellas (1995). "Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1." Biochem J 312 (Pt 2): 637-641.
- Bowie, C. H. P. (2006). Schizophrenia from a neuropsychiatric perspective., Mt. Sinai J. Med.
- Braff, D. L., M. A. Geyer y N. R. Swerdlow (2001). "Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies." Psychopharmacology 156(2-3): 234-258.
- Brandon, N. J., J. K. Millar, C. Korth, H. Sive, K. K. Singh y A. Sawa (2009). "Understanding the role of DISC1 in psychiatric disease and during normal development." J Neurosci 29(41): 12768-12775.

- Brandon, N. J. y A. Sawa (2011). "Linking neurodevelopmental and synaptic theories of mental illness through DISC1." Nat Rev Neurosci 12(12): 707-722.
- Brophy, K., Z. Hawi, A. Kirley, M. Fitzgerald y M. Gill (2002). "Synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) and attention deficit hyperactivity disorder (ADHD): evidence of linkage and association in the Irish population." Mol Psychiatry 7(8): 913-917.
- Bryant, N. J. y D. E. James (2001). "Vps45p stabilizes the syntaxin homologue Tlg2p and positively regulates SNARE complex formation." EMBO J 20(13): 3380-3388.
- Budd, R. C., W. C. Yeh y J. Tschopp (2006). "cFLIP regulation of lymphocyte activation and development." Nat Rev Immunol 6(3): 196-204.
- Burgoyne, R. D., J. W. Barclay, L. F. Ciufo, M. E. Graham, M. T. Handley y A. Morgan (2009). "The functions of Munc18-1 in regulated exocytosis." Ann N Y Acad Sci 1152: 76-86.
- Burkhardt, P., D. A. Hattendorf, W. I. Weis y D. Fasshauer (2008). "Munc18a controls SNARE assembly through its interaction with the syntaxin N-peptide." EMBO J 27(7): 923-933.

C

- Calhoun, M. E., M. Jucker, L. J. Martin, G. Thinakaran, D. L. Price y P. R. Mouton (1996). "Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses." J Neurocytol 25(12): 821-828.
- Carlsson, A., N. Waters, S. Holm-Waters, J. Tedroff, M. Nilsson y M. L. Carlsson (2001). "Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence." Annu Rev Pharmacol Toxicol 41: 237-260.
- Casanova, M. F. (1997). "Functional and anatomical aspects of prefrontal pathology in schizophrenia." Schizophr Bull 23(3): 517-519.
- Castillo, M. A., S. Ghose, C. A. Tamminga y P. G. Ulery-Reynolds (2010). "Deficits in syntaxin 1 phosphorylation in schizophrenia prefrontal cortex." Biol Psychiatry 67(3): 208-216.
- Catts, V. S. y C. S. Weickert (2012). "Gene expression analysis implicates a death receptor pathway in schizophrenia pathology." PLoS One 7(4): e35511.
- Chacon, M. A. y L. M. Boulanger (2013). "MHC class I protein is expressed by neurons and neural progenitors in mid-gestation mouse brain." Mol Cell Neurosci 52: 117-127.
- Chakrabarti, A., E. S. Onaivi y G. Chaudhuri (1995). "Cloning and sequencing of a cDNA encoding the mouse brain-type cannabinoid receptor protein." DNA Seq 5(6): 385-388.
- Chapman, E. R. (2008). "How does synaptotagmin trigger neurotransmitter release?" Annu Rev Biochem 77: 615-641.

- Cheema, Z. F., S. B. Wade, M. Sata, K. Walsh, F. Sohrabji y R. C. Miranda (1999). "Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB." *J Neurosci* 19(5): 1754-1770.
- Chen, X., J. Lu, I. Dulubova y J. Rizo (2008). "NMR analysis of the closed conformation of syntaxin-1." *J Biomol NMR* 41(1): 43-54.
- Cheng, J., W. Liu, L. J. Duffney y Z. Yan (2013). "SNARE proteins are essential in the potentiation of NMDA receptors by group II metabotropic glutamate receptors." *J Physiol* 591(Pt 16): 3935-3947.
- Chiba, S., R. Hashimoto, S. Hattori, M. Yohda, B. Lipska, D. R. Weinberger y H. Kunugi (2006). "Effect of antipsychotic drugs on DISC1 and dysbindin expression in mouse frontal cortex and hippocampus." *J Neural Transm* 113(9): 1337-1346.
- Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari y V. M. Dixit (1995). "FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis." *Cell* 81(4): 505-512.
- Choi, D., A. Radziszewska, S. A. Schroer, N. Liadis, Y. Liu, Y. Zhang, P. P. Lam, L. Sheu, Z. Hao, H. Y. Gaisano y M. Woo (2009). "Deletion of Fas in the pancreatic beta-cells leads to enhanced insulin secretion." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297(6): E1304-1312.
- Cijsouw, T., J. P. Weber, J. H. Broeke, J. A. Broek, D. Schut, T. Kroon, I. Saarloos, M. Verhage y R. F. Toonen (2014). "Munc18-1 redistributes in nerve terminals in an activity- and PKC-dependent manner." *J Cell Biol* 204(5): 759-775.
- Clapcote, S. J., T. V. Lipina, J. K. Millar, S. Mackie, S. Christie, F. Ogawa, J. P. Lerch, K. Trimble, M. Uchiyama, Y. Sakuraba, H. Kaneda, T. Shiroishi, M. D. Houslay, R. M. Henkelman, J. G. Sled, Y. Gondo, D. J. Porteous y J. C. Roder (2007). "Behavioral phenotypes of Disc1 missense mutations in mice." *Neuron* 54(3): 387-402.
- Consortium., S. W. G. o. t. P. G. (2014). Biological insights from 108 schizophrenia-associated genetic loci. *Nature*. England. 511: 421-427.

D

- D'Souza, D. C., E. Perry, L. MacDougall, Y. Ammerman, T. Cooper, Y. T. Wu, G. Braley, R. Gueorguieva y J. H. Krystal (2004). "The psychotomimetic effects of intravenous delta-9-tetrahydrocannabinol in healthy individuals: implications for psychosis." *Neuropsychopharmacology* 29(8): 1558-1572.
- Danial, N. N. y S. J. Korsmeyer (2004). "Cell death: critical control points." *Cell* 116(2): 205-219.

- Davidsson, P., J. Gottfries, N. Bogdanovic, R. Ekman, I. Karlsson, C. G. Gottfries y K. Blennow (1999). "The synaptic-vesicle-specific proteins rab3a and synaptophysin are reduced in thalamus and related cortical brain regions in schizophrenic brains." Schizophr Res 40(1): 23-29.
- de Wit, H. (2010). "Molecular mechanism of secretory vesicle docking." Biochem Soc Trans 38(Pt 1): 192-198.
- Deak, F., Y. Xu, W. P. Chang, I. Dulubova, M. Khvotchev, X. Liu, T. C. Sudhof y J. Rizo (2009). "Munc18-1 binding to the neuronal SNARE complex controls synaptic vesicle priming." J Cell Biol 184(5): 751-764.
- Dean, B., S. Sundram, R. Bradbury, E. Scarr y D. Copolov (2001). "Studies on [3H]CP-55940 binding in the human central nervous system: regional specific changes in density of cannabinoid-1 receptors associated with schizophrenia and cannabis use." Neuroscience 103(1): 9-15.
- Del Pino, I., C. Garcia-Frigola, N. Dehorter, J. R. Brotons-Mas, E. Alvarez-Salvado, M. Martinez de Lagran, G. Ciceri, M. V. Gabaldon, D. Moratal, M. Dierssen, S. Canals, O. Marin y B. Rico (2013). "ErbB4 deletion from fast-spiking interneurons causes schizophrenia-like phenotypes." Neuron 79(6): 1152-1168.
- Deng, C., B. Pan, M. Engel y X. F. Huang (2013). "Neuregulin-1 signalling and antipsychotic treatment: potential therapeutic targets in a schizophrenia candidate signalling pathway." Psychopharmacology 226(2): 201-215.
- Diao, J., Z. Su, X. Lu, T. Y. Yoon, Y. K. Shin y T. Ha (2010). "Single-Vesicle Fusion Assay Reveals Munc18-1 Binding to the SNARE Core Is Sufficient for Stimulating Membrane Fusion." ACS Chem Neurosci 1(3): 168-174.
- Dracheva, S., S. A. Marras, S. L. Elhakem, F. R. Kramer, K. L. Davis y V. Haroutunian (2001). "N-methyl-D-aspartic acid receptor expression in the dorsolateral prefrontal cortex of elderly patients with schizophrenia." Am J Psychiatry 158(9): 1400-1410.
- Dudok, J. J., A. J. Groffen, R. F. Toonen y M. Verhage (2011). "Deletion of Munc18-1 in 5-HT neurons results in rapid degeneration of the 5-HT system and early postnatal lethality." PLoS One 6(11): e28137.
- Dulubova, I., S. Sugita, S. Hill, M. Hosaka, I. Fernandez, T. C. Sudhof y J. Rizo (1999). "A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18." EMBO J 18(16): 4372-4382.

E

- Eastwood, S. L., N. J. Cairns y P. J. Harrison (2000). "Synaptophysin gene expression in schizophrenia. Investigation of synaptic pathology in the cerebral cortex." Br J Psychiatry 176: 236-242.

- Eggan, S. M., T. Hashimoto y D. A. Lewis (2008). Reduced cortical cannabinoid 1 receptor messenger RNA and protein expression in schizophrenia. Arch Gen Psychiatry 65: 772-784.
- Eisenberg, D. P. y K. F. Berman (2010). "Executive function, neural circuitry, and genetic mechanisms in schizophrenia." Neuropsychopharmacology 35(1): 258-277.
- El-Husseini, A. E., E. Schnell, D. M. Chetkovich, R. A. Nicoll y D. S. Bredt (2000). "PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses." Science 290(5495): 1364-1368.
- Erhardt, S., L. Schwieler, L. Nilsson, K. Linderholm y G. Engberg (2007). "The kynurenic acid hypothesis of schizophrenia." Physiol Behav 92(1-2): 203-209.
- Ernst, J. A. y A. T. Brunger (2003). "High resolution structure, stability, and synaptotagmin binding of a truncated neuronal SNARE complex." J Biol Chem 278(10): 8630-8636.
- Escudero, I. y M. Johnstone (2014). "Genetics of schizophrenia." Curr Psychiatry Rep 16(11): 502.

F

- Fazzari, P., A. V. Paternain, M. Valiente, R. Pla, R. Lujan, K. Lloyd, J. Lerma, O. Marin y B. Rico (2010). "Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling." Nature 464(7293): 1376-1380.
- Ferdinand, R. F., F. Sondeijker, J. van der Ende, J. P. Selten, A. Huizink y F. C. Verhulst (2005). "Cannabis use predicts future psychotic symptoms, and vice versa." Addiction 100(5): 612-618.
- Fergusson, D. M., L. J. Horwood y E. M. Ridder (2005). "Tests of causal linkages between cannabis use and psychotic symptoms." Addiction 100(3): 354-366.
- Ferhat, A. T., A. M. Le Sourd, F. de Chaumont, J. C. Olivo-Marin, T. Bourgeron y E. Ey (2015). Social communication in mice - are there optimal cage conditions? PLoS One 10: e0121802.
- Fernandez, I., J. Ubach, I. Dulubova, X. Zhang, T. C. Sudhof y J. Rizo (1998). "Three-dimensional structure of an evolutionarily conserved N-terminal domain of syntaxin 1A." Cell 94(6): 841-849.
- Fernandez-Chacon, R., A. Konigstorfer, S. H. Gerber, J. Garcia, M. F. Matos, C. F. Stevens, N. Brose, J. Rizo, C. Rosenmund y T. C. Sudhof (2001). "Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability." Nature 410(6824): 41-49.
- Flames, N., J. E. Long, A. N. Garratt, T. M. Fischer, M. Gassmann, C. Birchmeier, C. Lai, J. L. Rubenstein y O. Marin (2004). "Short- and long-range attraction of cortical GABAergic interneurons by neuregulin-1." Neuron 44(2): 251-261.

- Fletcher, A. I., R. Shuang, D. R. Giovannucci, L. Zhang, M. A. Bittner y E. L. Stuenkel (1999). "Regulation of exocytosis by cyclin-dependent kinase 5 via phosphorylation of Munc18." J Biol Chem 274(7): 4027-4035.
- Flórez, J, Armijo JA, Mediavilla, A. *Farmacología Humana* (2008). Elsevier Masson, 5ª edición
- Fujiwara, T., T. Mishima, T. Kofuji, T. Chiba, K. Tanaka, A. Yamamoto y K. Akagawa (2006). "Analysis of knock-out mice to determine the role of HPC-1/syntaxin 1A in expressing synaptic plasticity." J Neurosci 26(21): 5767-5776.
- Fujiwara, T., M. Snada, T. Kofuji, T. Yoshikawa y K. Akagawa (2010). "HPC-1/syntaxin 1A gene knockout mice show abnormal behavior possibly related to a disruption in 5-HTergic systems." Eur J Neurosci 32(1): 99-107.
- Furuta, A., L. J. Martin, C. L. Lin, M. Dykes-Hoberg y J. D. Rothstein (1997). "Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4." Neuroscience 81(4): 1031-1042.

G

- Gabriel, S. M., V. Haroutunian, P. Powchik, W. G. Honer, M. Davidson, P. Davies y K. L. Davis (1997). "Increased concentrations of presynaptic proteins in the cingulate cortex of subjects with schizophrenia." Arch Gen Psychiatry 54(6): 559-566.
- Galiegue, S., S. Mary, J. Marchand, D. Dussossoy, D. Carriere, P. Carayon, M. Bouaboula, D. Shire, G. Le Fur y P. Casellas (1995). "Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations." Eur J Biochem 232(1): 54-61.
- Galvez-Buccollini, J. A., A. C. Proal, V. Tomaselli, M. Trachtenberg, C. Coconcea, J. Chun, T. Manschreck, J. Fleming y L. E. Delisi (2012). Association between age at onset of psychosis and age at onset of cannabis use in non-affective psychosis. Schizophr Res. Netherlands, Published by Elsevier B.V. 139: 157-160.
- Garcia, E. P., P. S. McPherson, T. J. Chilcote, K. Takei y P. De Camilli (1995). "rbSec1A and B colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin." J Cell Biol 129(1): 105-120.
- Garcia, R. A., K. Vasudevan y A. Buonanno (2000). "The neuregulin receptor ErbB-4 interacts with PDZ-containing proteins at neuronal synapses." Proc Natl Acad Sci 97(7): 3596-3601.
- Garcia-Fuster, M. J., R. Diez-Alarcia, M. Ferrer-Alcon, R. La Harpe, J. J. Meana y J. A. Garcia-Sevilla (2014). "FADD adaptor and PEA-15/ERK1/2 partners in major depression and schizophrenia postmortem brains: basal contents and effects of psychotropic treatments." Neuroscience 277: 541-551.

- Gassmann, M., F. Casagrande, D. Orioli, H. Simon, C. Lai, R. Klein y G. Lemke (1995). "Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor." Nature 378(6555): 390-394.
- Gebhard, C., B. E. Stahl, Y. Shi, G. G. Camici, A. Akhmedov, L. Hoegger, C. Lohmann, C. M. Matter, P. O. Hassa, M. O. Hottiger, T. Malinski, T. F. Luscher y F. C. Tanner (2011). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects from oxidative stress induced endothelial dysfunction." Biochem Biophys Res Commun 414(4): 641-646.
- Gerber, S. H., J. C. Rah, S. W. Min, X. Liu, H. de Wit, I. Dulubova, A. C. Meyer, J. Rizo, M. Arancillo, R. E. Hammer, M. Verhage, C. Rosenmund y T. C. Sudhof (2008). "Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion." Science 321(5895): 1507-1510.
- Gerlai, R., P. Pisacane y S. Erickson (2000). "Heregulin, but not ErbB2 or ErbB3, heterozygous mutant mice exhibit hyperactivity in multiple behavioral tasks." Behav Brain Res 109(2): 219-227.
- Gianfrancesco, F. D., K. Rajagopalan, M. Sajatovic y R. H. Wang (2006). "Treatment adherence among patients with bipolar or manic disorder taking atypical and typical antipsychotics." J Clin Psychiatry 67(2): 222-232.
- Gil-Pisa, I., Munarriz-Cuezva, E., Meana, J.J. Sistema glutamatérgico y esquizofrenia. En: "Esquizofrenia: sociogénesis, psicogénesis y condicionamiento biológico" (2010). J. Ezcurra, M. Gutiérrez Fraile, A. González-Pinto (Eds.). Grupo Aula Médica, S.L., pp 63-93.
- Gil-Pisa, I., E. Munarriz-Cuezva, A. Ramos-Miguel, L. Uriguen, J. J. Meana y J. A. Garcia-Sevilla (2012). "Regulation of munc18-1 and syntaxin-1A interactive partners in schizophrenia prefrontal cortex: down-regulation of munc18-1a isoform and 75 kDa SNARE complex after antipsychotic treatment." Int J Neuropsychopharmacol 15(5): 573-588.
- Gilmour, G., S. Dix, L. Fellini, F. Gastambide, N. Plath, T. Steckler, J. Talpos y M. Tricklebank (2012). NMDA receptors, cognition and schizophrenia—testing the validity of the NMDA receptor hypofunction hypothesis. Neuropharmacology 62: 1401-1412.
- Giuffrida, A., F. M. Leweke, C. W. Gerth, D. Schreiber, D. Koethe, J. Faulhaber, J. Klosterkotter y D. Piomelli (2004). "Cerebrospinal anandamide levels are elevated in acute schizophrenia and are inversely correlated with psychotic symptoms." Neuropsychopharmacology 29(11): 2108-2114.
- Glantz, L. A., J. H. Gilmore, J. A. Lieberman y L. F. Jarskog (2006). "Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia." Schizophr Res 81(1): 47-63.
- Gogos, J. A. y D. J. Gerber (2006). "Schizophrenia susceptibility genes: emergence of positional candidates and future directions." Trends Pharmacol Sci 27(4): 226-233.
- Gonzalez-Maeso, J., N. V. Weisstaub, M. Zhou, P. Chan, L. Ivic, R. Ang, A. Lira, M. Bradley-Moore, Y. Ge, Q. Zhou, S. C. Sealfon y J. A. Gingrich (2007). "Hallucinogens recruit

specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior." Neuron 53(3): 439-452.

Gottesman II. (1991). *Schizophrenia Genesis: The Origins of Madness*. New York: Freeman.

Gray, L. J., B. Dean, H. C. Kronsbein, P. J. Robinson y E. Scarr (2010). "Region and diagnosis-specific changes in synaptic proteins in schizophrenia and bipolar I disorder." Psychiatry Res 178(2): 374-380.

Green, A. I. (2005). "Schizophrenia and comorbid substance use disorder: effects of antipsychotics." J Clin Psychiatry 66 Suppl 6: 21-26.

Green, M. F. (1996). "What are the functional consequences of neurocognitive deficits in schizophrenia?" Am J Psychiatry 153(3): 321-330.

Gu, Z., Q. Jiang, A. K. Fu, N. Y. Ip y Z. Yan (2005). "Regulation of NMDA receptors by neuregulin signaling in prefrontal cortex." J Neurosci 25(20): 4974-4984.

Gurling, H. M., G. Kalsi, J. Brynjolfson, T. Sigmundsson, R. Sherrington, B. S. Mankoo, T. Read, P. Murphy, E. Blaveri, A. McQuillin, H. Petursson y D. Curtis (2001). "Genomewide genetic linkage analysis confirms the presence of susceptibility loci for schizophrenia, on chromosomes 1q32.2, 5q33.2, and 8p21-22 and provides support for linkage to schizophrenia, on chromosomes 11q23.3-24 and 20q12.1-11.23." Am J Hum Genet 68(3): 661-673.

H

Hahn, C. G., H. Y. Wang, D. S. Cho, K. Talbot, R. E. Gur, W. H. Berrettini, K. Bakshi, J. Kamins, K. E. Borgmann-Winter, S. J. Siegel, R. J. Gallop y S. E. Arnold (2006). "Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia." Nat Med 12(7): 824-828.

Hajos, N., C. Ledent y T. F. Freund (2001). "Novel cannabinoid-sensitive receptor mediates inhibition of glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus." Neuroscience 106(1): 1-4.

Halim, N. D., C. S. Weickert, B. W. McClintock, T. M. Hyde, D. R. Weinberger, J. E. Kleinman y B. K. Lipska (2003). "Presynaptic proteins in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia and rats with abnormal prefrontal development." Mol Psychiatry 8(9): 797-810.

Han, G. A., N. T. Malintan, B. M. Collins, F. A. Meunier y S. Sugita (2010). "Munc18-1 as a key regulator of neurosecretion." J Neurochem 115(1): 1-10.

Han, G. A., N. T. Malintan, N. M. Saw, L. Li, L. Han, F. A. Meunier, B. M. Collins y S. Sugita (2011). "Munc18-1 domain-1 controls vesicle docking and secretion by interacting with syntaxin-1 and chaperoning it to the plasma membrane." Mol Biol Cell 22(21): 4134-4149.

- Hansen, R. T., 3rd, M. Conti y H. T. Zhang (2014). "Mice deficient in phosphodiesterase-4A display anxiogenic-like behavior." Psychopharmacology 231(15): 2941-2954.
- Harrison, P. J. y D. R. Weinberger (2005). "Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence." Mol Psychiatry 10(1): 40-68; image 45.
- Hata, Y., C. A. Slaughter y T. C. Sudhof (1993). "Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin." Nature 366(6453): 347-351.
- Hata, Y. y T. C. Sudhof (1995). "A novel ubiquitous form of Munc-18 interacts with multiple syntaxins. Use of the yeast two-hybrid system to study interactions between proteins involved in membrane traffic." J Biol Chem 270(22): 13022-13028.
- Hodgkinson, C. A., D. Goldman, J. Jaeger, S. Persaud, J. M. Kane, R. H. Lipsky y A. K. Malhotra (2004). "Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1): association with schizophrenia, schizoaffective disorder, and bipolar disorder." Am J Hum Genet 75(5): 862-872.
- Holmseth, S., Y. Dehnes, Y. H. Huang, V. V. Follin-Arbelet, N. J. Grutle, M. N. Mylonakou, C. Plachez, Y. Zhou, D. N. Furness, D. E. Bergles, K. P. Lehre y N. C. Danbolt (2012). "The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS." J Neurosci 32(17): 6000-6013.
- Honea, R., T. J. Crow, D. Passingham y C. E. Mackay (2005). "Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies." Am J Psychiatry 162(12): 2233-2245.
- Honer, W. G., P. Falkai, T. A. Bayer, J. Xie, L. Hu, H. Y. Li, V. Arango, J. J. Mann, A. J. Dwork y W. S. Trimble (2002). "Abnormalities of SNARE mechanism proteins in anterior frontal cortex in severe mental illness." Cereb Cortex 12(4): 349-356.
- Honer, W. G., P. Falkai, C. Young, T. Wang, J. Xie, J. Bonner, L. Hu, G. L. Boulianne, Z. Luo y W. S. Trimble (1997). "Cingulate cortex synaptic terminal proteins and neural cell adhesion molecule in schizophrenia." Neuroscience 78(1): 99-110.
- Hu, S. H., M. P. Christie, N. J. Saez, C. F. Latham, R. Jarrott, L. H. Lua, B. M. Collins y J. L. Martin (2011). "Possible roles for Munc18-1 domain 3a and Syntaxin1 N-peptide and C-terminal anchor in SNARE complex formation." Proc Natl Acad Sci 108(3): 1040-1045.
- Hu, W., M. L. MacDonald, D. E. Elswick y R. A. Sweet (2015). "The glutamate hypothesis of schizophrenia: evidence from human brain tissue studies." Ann N Y Acad Sci 1338: 38-57.
- Huang, Y. Z., S. Won, D. W. Ali, Q. Wang, M. Tanowitz, Q. S. Du, K. A. Pelkey, D. J. Yang, W. C. Xiong, M. W. Salter y L. Mei (2000). "Regulation of neuregulin signaling by PSD-95 interacting with ErbB4 at CNS synapses." Neuron 26(2): 443-455.

I

Ibrahim, H. M., A. J. Hogg, Jr., D. J. Healy, V. Haroutunian, K. L. Davis y J. H. Meador-Woodruff (2000). "Ionotropic glutamate receptor binding and subunit mRNA expression in thalamic nuclei in schizophrenia." Am J Psychiatry 157(11): 1811-1823.

Irie, M., Y. Hata, M. Takeuchi, K. Ichtchenko, A. Toyoda, K. Hirao, Y. Takai, T. W. Rosahl y T. C. Sudhof (1997). "Binding of neuroligins to PSD-95." Science 277(5331): 1511-1515.

J

Jaaro-Peled, H., A. Hayashi-Takagi, S. Seshadri, A. Kamiya, N. J. Brandon y A. Sawa (2009). "Neurodevelopmental mechanisms of schizophrenia: understanding disturbed postnatal brain maturation through neuregulin-1-ErbB4 and DISC1." Trends Neurosci 32(9): 485-495.

Jablensky, A. (2000). "Epidemiology of schizophrenia: the global burden of disease and disability." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 250(6): 274-285.

Jarskog, L. F., E. S. Selinger, J. A. Lieberman y J. H. Gilmore (2004). "Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation." Am J Psychiatry 161(1): 109-115.

Javitt, D. C. y S. R. Zukin (1991). "Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia." Am J Psychiatry 148(10): 1301-1308.

Jentsch, J. D. y R. H. Roth (1999). The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. Neuropsychopharmacology 20: 201-225.

Johnson, R. D., P. L. Oliver y K. E. Davies (2008). "SNARE proteins and schizophrenia: linking synaptic and neurodevelopmental hypotheses." Acta Biochim Pol 55(4): 619-628.

K

Kamiya, A., P. L. Tan, K. Kubo, C. Engelhard, K. Ishizuka, A. Kubo, S. Tsukita, A. E. Pulver, K. Nakajima, N. G. Cascella, N. Katsanis y A. Sawa (2008). "Recruitment of PCM1 to the centrosome by the cooperative action of DISC1 and BBS4: a candidate for psychiatric illnesses." Arch Gen Psychiatry 65(9): 996-1006.

Kane, J.M. & McGlashem, T.H (1995). Treatment of schizophrenia. Lancet, 346: 820-825.

- Kandel, R.E, Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (2002) *Principios de Neurociencia*. 4ª Edición. McGrawHill/ Interamerica de España S.A. ISBN: 84-486-0311-7
- Kapur, S. y D. Mamo (2003). "Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 27(7): 1081-1090.
- Kato, T., Y. Abe, H. Sotoyama, A. Kakita, R. Kominami, S. Hirokawa, M. Ozaki, H. Takahashi y H. Nawa (2011). "Transient exposure of neonatal mice to neuregulin-1 results in hyperdopaminergic states in adulthood: implication in neurodevelopmental hypothesis for schizophrenia." Mol Psychiatry 16(3): 307-320.
- Kennedy, M. B. (1993). "The postsynaptic density." Curr Opin Neurobiol 3(5): 732-737.
- Kennedy, M. B. (1998). "Signal transduction molecules at the glutamatergic postsynaptic membrane." Brain Res Brain Res Rev 26(2-3): 243-257.
- Kim, S. H. y T. A. Ryan (2010). "CDK5 serves as a major control point in neurotransmitter release." Neuron 67(5): 797-809.
- Koh, T. W. y H. J. Bellen (2003). "Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release." Trends Neurosci 26(8): 413-422.
- Kontkanen, O., P. Toronen, M. Lakso, G. Wong y E. Castren (2002). "Antipsychotic drug treatment induces differential gene expression in the rat cortex." J Neurochem 83(5): 1043-1053.
- Kornau, H. C., L. T. Schenker, M. B. Kennedy y P. H. Seeburg (1995). "Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95." Science 269(5231): 1737-1740.
- Krystal, J. H., L. P. Karper, J. P. Seibyl, G. K. Freeman, R. Delaney, J. D. Bremner, G. R. Heninger, M. B. Bowers, Jr. y D. S. Charney (1994). "Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses." Arch Gen Psychiatry 51(3): 199-214.
- Kucerova, J., K. Tabiova, F. Drago y V. Micale (2014). "Therapeutic potential of cannabinoids in schizophrenia." Recent Pat CNS Drug Discov 9(1): 13-25.
- Kumar, V. B., R. I. Viji, M. S. Kiran y P. R. Sudhakaran (2007). "Endothelial cell response to lactate: implication of PAR modification of VEGF." J Cell Physiol 211(2): 477-485.
- Kuoppamaki, M., T. Seppala, E. Syvalahti y J. Hietala (1994). "Regulation of serotonin 5-HT_{2C} receptors in the rat choroid plexus after acute clozapine treatment." Eur J Pharmacol 269(2): 201-208.
- Kvajo, M., H. McKellar, P. A. Arguello, L. J. Drew, H. Moore, A. B. MacDermott, M. Karayiorgou y J. A. Gogos (2008). "A mutation in mouse *Disc1* that models a schizophrenia risk allele leads to specific alterations in neuronal architecture and cognition." Proc Natl Acad Sci 105(19): 7076-7081.

L

- Lahti, A. C., M. A. Weiler, B. A. Tamara Michaelidis, A. Parwani y C. A. Tamminga (2001). "Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers." Neuropsychopharmacology 25(4): 455-467.
- Lang, T. y R. Jahn (2008). "Core proteins of the secretory machinery." Handb Exp Pharmacol(184): 107-127.
- Langlois, M. C., G. Beaudry, H. Zekki, C. Rouillard y D. Levesque (2001). "Impact of antipsychotic drug administration on the expression of nuclear receptors in the neocortex and striatum of the rat brain." Neuroscience 106(1): 117-128.
- Laruelle, M. (2014). "Schizophrenia: from dopaminergic to glutamatergic interventions." Curr Opin Pharmacol 14: 97-102.
- Legallic, S., J. Bou, S. Haouzir, G. Allio, C. Demily, M. Petit, T. Frebourg, F. Thibaut y D. Champion (2009). "No pathogenic rearrangement within the DISC 1 gene in psychosis." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 150b(1): 148-150.
- Lejoyeux, M., A. Basquin, M. Koch, H. Embouazza, F. Chalvin y M. Ilongo (2014). "Cannabis Use and Dependence among French Schizophrenic Inpatients." Front Psychiatry 5: 82.
- Lewis, D. A. y G. Gonzalez-Burgos (2000). "Intrinsic excitatory connections in the prefrontal cortex and the pathophysiology of schizophrenia." Brain Res Bull 52(5): 309-317.
- Link, E., L. Edelman, J. H. Chou, T. Binz, S. Yamasaki, U. Eisel, M. Baumert, T. C. Sudhof, H. Niemann y R. Jahn (1992). "Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis." Biochem Biophys Res Commun 189(2): 1017-1023.
- Liu, Y., Y. Sugiura y W. Lin (2011). "The role of synaptobrevin1/VAMP1 in Ca²⁺-triggered neurotransmitter release at the mouse neuromuscular junction." J Physiol 589(Pt 7): 1603-1618.
- Lopez-Bendito, G., A. Cautinat, J. A. Sanchez, F. Bielle, N. Flames, A. N. Garratt, D. A. Talmage, L. W. Role, P. Charnay, O. Marin y S. Garel (2006). "Tangential neuronal migration controls axon guidance: a role for neuregulin-1 in thalamocortical axon navigation." Cell 125(1): 127-142.

M

- Ma, C., W. Li, Y. Xu y J. Rizo (2011). "Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex." Nat Struct Mol Biol 18(5): 542-549.

- Mackie, K., Y. Lai, R. Westenbroek y R. Mitchell (1995). "Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor." J Neurosci 15(10): 6552-6561.
- Malintan, N. T., T. H. Nguyen, L. Han, C. F. Latham, S. L. Osborne, P. J. Wen, S. J. Lim, S. Sugita, B. M. Collins y F. A. Meunier (2009). "Abrogating Munc18-1-SNARE complex interaction has limited impact on exocytosis in PC12 cells." J Biol Chem 284(32): 21637-21646.
- Malsam, J., S. Kreye y T. H. Sollner (2008). "Membrane fusion: SNAREs and regulation." Cell Mol Life Sci 65(18): 2814-2832.
- Marco, E. M., M. S. Garcia-Gutierrez, F. J. Bermudez-Silva, F. A. Moreira, F. Guimaraes, J. Manzanares y M. P. Viveros (2011). "Endocannabinoid system and psychiatry: in search of a neurobiological basis for detrimental and potential therapeutic effects." Front Behav Neurosci 5: 63.
- Marek, G. J., B. Behl, A. Y. Beshpalov, G. Gross, Y. Lee y H. Schoemaker (2010). "Glutamatergic (N-methyl-D-aspartate receptor) hypofrontality in schizophrenia: too little juice or a miswired brain?" Mol Pharmacol 77(3): 317-326.
- Marin, O. (2012). Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. Nat Rev Neurosci. 13: 107-120.
- Marin, O. y B. Rico (2013). "A new beginning for a broken mind: balancing neuregulin 1 reverses synaptic dysfunction." Neuron 78(4): 577-579.
- Marongiu, M. F., D. Poddie, S. Porcu, M. F. Manchinu, M. P. Castelli, V. Sogos, V. Bini, R. Frau, E. Caredda, M. Collu y M. S. Ristaldi (2012). Reversible disruption of pre-pulse inhibition in hypomorphnic-inducible and reversible CB1^{-/-} mice. PLoS One 7: e35013.
- Martins-de-Souza, D., G. Maccarrone, T. Wobrock, I. Zerr, P. Gormanns, S. Reckow, P. Falkai, A. Schmitt y C. W. Turck (2010). "Proteome analysis of the thalamus and cerebrospinal fluid reveals glycolysis dysfunction and potential biomarkers candidates for schizophrenia." J Psychiatr Res 44(16): 1176-1189.
- Mattei, D., Schweibold, R. y Wolf S.A. (2015). "Brain in flames-animal models of psychosis: utility and limitations". Neuropsychiatric Disease and Treatment 11: 1313-1329
- Maximov, A. y T. C. Sudhof (2005). "Autonomous function of synaptotagmin 1 in triggering synchronous release independent of asynchronous release." Neuron 48(4): 547-554.
- McEwen, J. M. y J. M. Kaplan (2008). "UNC-18 promotes both the anterograde trafficking and synaptic function of syntaxin." Mol Biol Cell 19(9): 3836-3846.
- McGonigle, P. (2014). "Animal models of CNS disorders". Biochemical Pharmacology 87: 140-149
- McMahon, H. T., V. Y. Bolshakov, R. Janz, R. E. Hammer, S. A. Siegelbaum y T. C. Sudhof (1996). "Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release." Proc Natl Acad Sci 93(10): 4760-4764.

- Medine, C. N., C. Rickman, L. H. Chamberlain y R. R. Duncan (2007). "Munc18-1 prevents the formation of ectopic SNARE complexes in living cells." J Cell Sci 120(Pt 24): 4407-4415.
- Mei, L. y W. C. Xiong (2008). "Neuregulin 1 in neural development, synaptic plasticity and schizophrenia." Nat Rev Neurosci 9(6): 437-452.
- Michailov, G. V., M. W. Sereda, B. G. Brinkmann, T. M. Fischer, B. Haug, C. Birchmeier, L. Role, C. Lai, M. H. Schwab y K. A. Nave (2004). "Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness." Science 304(5671): 700-703.
- Mill, J., S. Curran, L. Kent, A. Gould, L. Hockett, S. Richards, E. Taylor y P. Asherson (2002). "Association study of a SNAP-25 microsatellite and attention deficit hyperactivity disorder." Am J Med Genet 114(3): 269-271.
- Millar, J. K., S. Christie y D. J. Porteous (2003). "Yeast two-hybrid screens implicate DISC1 in brain development and function." Biochem Biophys Res Commun 311(4): 1019-1025.
- Millar, J. K., J. C. Wilson-Annan, S. Anderson, S. Christie, M. S. Taylor, C. A. Semple, R. S. Devon, D. M. St Clair, W. J. Muir, D. H. Blackwood y D. J. Porteous (2000). "Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia." Hum Mol Genet 9(9): 1415-1423.
- Mishima, T., T. Fujiwara, T. Kofuji y K. Akagawa (2012). "Impairment of catecholamine systems during induction of long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses in HPC-1/syntaxin 1A knock-out mice." J Neurosci 32(1): 381-389.
- Misura, K. M., R. H. Scheller y W. I. Weis (2000). "Three-dimensional structure of the neuronal Sec1-syntaxin 1a complex." Nature 404(6776): 355-362.
- Mohrmann, R., H. de Wit, M. Verhage, E. Neher y J. B. Sorensen (2010). "Fast vesicle fusion in living cells requires at least three SNARE complexes." Science 330(6003): 502-505.
- Morrison, P. D., V. Zois, D. A. McKeown, T. D. Lee, D. W. Holt, J. F. Powell, S. Kapur y R. M. Murray (2009). "The acute effects of synthetic intravenous Delta9-tetrahydrocannabinol on psychosis, mood and cognitive functioning." Psychol Med 39(10): 1607-1616.
- Mukaetova-Ladinska, E., J. Hurt, W. G. Honer, C. R. Harrington y C. M. Wischik (2002). "Loss of synaptic but not cytoskeletal proteins in the cerebellum of chronic schizophrenics." Neurosci Lett 317(3): 161-165.
- Murthy, V. N. y P. De Camilli (2003). "Cell biology of the presynaptic terminal." Annu Rev Neurosci 26: 701-728.

N

- Neff, N. H., T. A. Wemlinger, A. M. Duchemin y M. Hadjiconstantinou (2006). "Clozapine modulates aromatic L-amino acid decarboxylase activity in mouse striatum." J Pharmacol Exp Ther 317(2): 480-487.
- Nestler, E. J. y S. E. Hyman (2010). "Animal models of neuropsychiatric disorders." Nat Neurosci 13(10): 1161-1169.
- Newell, K. A., C. Deng y X. F. Huang (2006). "Increased cannabinoid receptor density in the posterior cingulate cortex in schizophrenia." Exp Brain Res 172(4): 556-560.
- Nicoll, R. A., S. Tomita y D. S. Bredt (2006). "Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors." Science 311(5765): 1253-1256.
- Niwa, M., A. Kamiya, R. Murai, K. Kubo, A. J. Gruber, K. Tomita, L. Lu, S. Tomisato, H. Jaaro-Peled, S. Seshadri, H. Hiyama, B. Huang, K. Kohda, Y. Noda, P. O'Donnell, K. Nakajima, A. Sawa y T. Nabeshima (2010). Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. Neuron. United States. 65: 480-489.
- Nystuen, A. M., J. K. Schwendinger, A. J. Sachs, A. W. Yang y N. B. Haider (2007). "A null mutation in VAMP1/synaptobrevin is associated with neurological defects and prewean mortality in the lethal-wasting mouse mutant." Neurogenetics 8(1): 1-10.

O

- O'Connor, V. y A. G. Lee (2002). "Synaptic vesicle fusion and synaptotagmin: 2B or not 2B?" Nat Neurosci 5(9): 823-824.
- O'Tuathaigh, C. M. y J. L. Waddington (2010). "Mutant mouse models: phenotypic relationships to domains of psychopathology and pathobiology in schizophrenia." Schizophr Bull 36(2): 243-245.
- Ortega-Alvaro, A., A. Aracil-Fernandez, M. S. Garcia-Gutierrez, F. Navarrete y J. Manzanares (2011). "Deletion of CB2 cannabinoid receptor induces schizophrenia-related behaviors in mice." Neuropsychopharmacology 36(7): 1489-1504.
- Owen, M. J., N. M. Williams y M. C. O'Donovan (2004). "Dysbindin-1 and schizophrenia: from genetics to neuropathology." J Clin Invest 113(9): 1255-1257.

P

- Pan, B., X. F. Huang y C. Deng (2011). "Antipsychotic treatment and neuregulin 1-ErbB4 signalling in schizophrenia." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 35(4): 924-930.

- Papanastasiou, E., F. Gaughran y S. Smith (2011). "Schizophrenia as segmental progeria." J R Soc Med 104(11): 475-484.
- Pellow, S., P. Chopin, S. E. File y M. Briley (1985). "Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat." J Neurosci Methods 14(3): 149-167.
- Peter, M. E., R. C. Budd, J. Desbarats, S. M. Hedrick, A. O. Hueber, M. K. Newell, L. B. Owen, R. M. Pope, J. Tschopp, H. Wajant, D. Wallach, R. H. Wiltrott, M. Zornig y D. H. Lynch (2007). "The CD95 receptor: apoptosis revisited." Cell 129(3): 447-450.
- Petit-Demouliere, B., F. Chenu y M. Bourin (2005). "Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity." Psychopharmacology 177(3): 245-255.
- Pevsner, J., S. C. Hsu, J. E. Braun, N. Calakos, A. E. Ting, M. K. Bennett y R. H. Scheller (1994). "Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex." Neuron 13(2): 353-361.
- Poirier, M. A., W. Xiao, J. C. Macosko, C. Chan, Y. K. Shin y M. K. Bennett (1998). "The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle." Nat Struct Biol 5(9): 765-769.
- Porsolt, R. D., A. Bertin y M. Jalfre (1977). "Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants." Arch Int Pharmacodyn Ther 229(2): 327-336.
- Power, R. A., K. J. Verweij, M. Zuhair, G. W. Montgomery, A. K. Henders, A. C. Heath, P. A. Madden, S. E. Medland, N. R. Wray y N. G. Martin (2014). "Genetic predisposition to schizophrenia associated with increased use of cannabis." Mol Psychiatry 19(11): 1201-1204.
- Pulver, A. E. (2000). "Search for schizophrenia susceptibility genes." Biol Psychiatry 47(3): 221-230.
- Pulver, A. E., V. K. Lasseter, L. Kasch, P. Wolyniec, G. Nestadt, J. L. Blouin, M. Kimberland, R. Babb, S. Vourlis, H. Chen y et al. (1995). "Schizophrenia: a genome scan targets chromosomes 3p and 8p as potential sites of susceptibility genes." Am J Med Genet 60(3): 252-260.

R

- Ramos-Miguel, A., S. Esteban y J. A. Garcia-Sevilla (2010). The time course of unconditioned morphine-induced psychomotor sensitization mirrors the phosphorylation of FADD and MEK/ERK in rat striatum: role of PEA-15 as a FADD-ERK binding partner in striatal plasticity. Eur Neuropsychopharmacol. Netherlands. 20: 49-64.
- Ramos-Miguel, A., M. J. Garcia-Fuster, L. F. Callado, R. La Harpe, J. J. Meana y J. A. Garcia-Sevilla (2009). "Phosphorylation of FADD (Fas-associated death domain protein) at serine 194 is increased in the prefrontal cortex of opiate abusers: relation to mitogen activated protein kinase, phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa, and Akt signaling pathways involved in neuroplasticity." Neuroscience 161(1): 23-38.

- Ramos-Miguel, A., J. J. Meana y J. A. Garcia-Sevilla (2013). "Cyclin-dependent kinase-5 and p35/p25 activators in schizophrenia and major depression prefrontal cortex: basal contents and effects of psychotropic medications." Int J Neuropsychopharmacol 16(3): 683-689.
- Rapp, C., A. Walter, E. Studerus, H. Bugra, C. Tamagni, M. Rothlisberger, S. Borgwardt, J. Aston y A. Riecher-Rossler (2013). "Cannabis use and brain structural alterations of the cingulate cortex in early psychosis." Psychiatry Res 214(2): 102-108.
- Rathore, S. S., E. G. Bend, H. Yu, M. Hammarlund, E. M. Jorgensen y J. Shen (2010). "Syntaxin N-terminal peptide motif is an initiation factor for the assembly of the SNARE-Sec1/Munc18 membrane fusion complex." Proc Natl Acad Sci 107(52): 22399-22406.
- Reich, A., C. Spering y J. B. Schulz (2008). "Death receptor Fas (CD95) signaling in the central nervous system: tuning neuroplasticity?" Trends Neurosci 31(9): 478-486.
- Richelson, E. y T. Souder (2000). "Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors focus on newer generation compounds." Life Sci 68(1): 29-39.
- Rickman, C. y R. R. Duncan (2010). "Munc18/Syntaxin interaction kinetics control secretory vesicle dynamics." J Biol Chem 285(6): 3965-3972.
- Rizo, J. y C. Rosenmund (2008). "Synaptic vesicle fusion." Nat Struct Mol Biol 15(7): 665-674.
- Rizo, J. y T. C. Sudhof (2002). "Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion." Nat Rev Neurosci 3(8): 641-653.
- Rizo, J. y T. C. Sudhof (2012). "The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices—guilty as charged?" Annu Rev Cell Dev Biol 28: 279-308.
- Roche, R., L. Hoareau, S. Bes-Houtmann, M. P. Gonthier, C. Laborde, J. F. Baron, Y. Haffaf, M. Cesari y F. Festy (2006). "Presence of the cannabinoid receptors, CB1 and CB2, in human omental and subcutaneous adipocytes." Histochem Cell Biol 126(2): 177-187.
- Rodkey, T. L., S. Liu, M. Barry y J. A. McNew (2008). "Munc18a scaffolds SNARE assembly to promote membrane fusion." Mol Biol Cell 19(12): 5422-5434.
- Rothman, J.E. (1994). "Mechanisms of intracellular protein transport". Nature 372, 55 - 63
- Rowe, J., F. Calegari, E. Taverna, R. Longhi y P. Rosa (2001). "Syntaxin 1A is delivered to the apical and basolateral domains of epithelial cells: the role of munc-18 proteins." J Cell Sci 114(Pt 18): 3323-3332.
- Rowe, J., N. Corradi, M. L. Malosio, E. Taverna, P. Halban, J. Meldolesi y P. Rosa (1999). "Blockade of membrane transport and disassembly of the Golgi complex by expression of syntaxin 1A in neurosecretion-incompetent cells: prevention by rbSEC1." J Cell Sci 112 (Pt 12): 1865-1877.

S

- Sardi, S. P., J. Murtie, S. Koirala, B. A. Patten y G. Corfas (2006). "Presenilin-dependent ErbB4 nuclear signaling regulates the timing of astrogenesis in the developing brain." Cell 127(1): 185-197.

- Sawamura, N., T. Ando, Y. Maruyama, M. Fujimuro, H. Mochizuki, K. Honjo, M. Shimoda, H. Toda, T. Sawamura-Yamamoto, L. A. Makuch, A. Hayashi, K. Ishizuka, N. G. Cascella, A. Kamiya, N. Ishida, T. Tomoda, T. Hai, K. Furukubo-Tokunaga y A. Sawa (2008). "Nuclear DISC1 regulates CRE-mediated gene transcription and sleep homeostasis in the fruit fly." Mol Psychiatry 13(12): 1138-1148, 1069.
- Scarr, E. y B. Dean (2012). "Altered neuronal markers following treatment with mood stabilizer and antipsychotic drugs indicate an increased likelihood of neurotransmitter release." Clin Psychopharmacol Neurosci 10(1): 25-33.
- Scarr, E., L. Gray, D. Keriakous, P. J. Robinson y B. Dean (2006). "Increased levels of SNAP-25 and synaptophysin in the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar I disorder." Bipolar Disord 8(2): 133-143.
- Schiavo, G., F. Benfenati, B. Poulain, O. Rossetto, P. Polverino de Laureto, B. R. DasGupta y C. Montecucco (1992). "Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin." Nature 359(6398): 832-835.
- Schiavo, G., G. Stenbeck, J. E. Rothman y T. H. Sollner (1997). "Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses." Proc Natl Acad Sci 94(3): 997-1001.
- Schmitt, U., N. Tanimoto, M. Seeliger, F. Schaeffel y R. E. Leube (2009). "Detection of behavioral alterations y learning deficits in mice lacking synaptophysin." Neuroscience 162(2): 234-243.
- Sciolino, N. R., M. Bortolato, S. A. Eisenstein, J. Fu, F. Oveisi, A. G. Hohmann y D. Piomelli (2010). "Social isolation and chronic handling alter endocannabinoid signaling and behavioral reactivity to context in adult rats." Neuroscience 168(2): 371-386.
- Scott, F. L., B. Stec, C. Pop, M. K. Dobaczewska, J. J. Lee, E. Monosov, H. Robinson, G. S. Salvesen, R. Schwarzenbacher y S. J. Riedl (2009). "The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering." Nature 457(7232): 1019-1022.
- Sellmann, C., L. Villarin Pildain, A. Schmitt, F. Leonardi-Essmann, P. F. Durrenberger, R. Spanagel, T. Arzberger, H. Kretzschmar, M. Zink, O. Gruber, M. Herrera-Marschitz, R. Reynolds, P. Falkai, P. J. Gebicke-Haerter y F. Matthaus (2014). "Gene expression in superior temporal cortex of schizophrenia patients." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 264(4): 297-309.
- Shen, J., S. S. Rathore, L. Khandan y J. E. Rothman (2010). "SNARE bundle and syntaxin N-peptide constitute a minimal complement for Munc18-1 activation of membrane fusion." J Cell Biol 190(1): 55-63.
- Shen, J., D. C. Tareste, F. Paumet, J. E. Rothman y T. J. Melia (2007). "Selective activation of cognate SNAREpins by Sec1/Munc18 proteins." Cell 128(1): 183-195.
- Shire, D., C. Carillon, M. Kaghad, B. Calandra, M. Rinaldi-Carmona, G. Le Fur, D. Caput y P. Ferrara (1995). "An amino-terminal variant of the central cannabinoid receptor resulting from alternative splicing." J Biol Chem 270(8): 3726-3731.

- Slifstein, M., E. van de Giessen, J. Van Snellenberg, J. L. Thompson, R. Narendran, R. Gil, E. Hackett, R. Girgis, N. Ojeil, H. Moore, D. D'Souza, R. T. Malison, Y. Huang, K. Lim, N. Nabulsi, R. E. Carson, J. A. Lieberman y A. Abi-Dargham (2015). Deficits in prefrontal cortical and extrastriatal dopamine release in schizophrenia: a positron emission tomographic functional magnetic resonance imaging study. *JAMA Psychiatry* 72: 316-324.
- Smyth, A. M., R. R. Duncan y C. Rickman (2010). "Munc18-1 and syntaxin1: unraveling the interactions between the dynamic duo." *Cell Mol Neurobiol* 30(8): 1309-1313.
- Soares, D. C., B. C. Carlyle, N. J. Bradshaw y D. J. Porteous (2011). "DISC1: Structure, Function, and Therapeutic Potential for Major Mental Illness." *ACS Chem Neurosci* 2(11): 609-632.
- Sokolov, B. P., A. A. Tcherepanov, V. Haroutunian y K. L. Davis (2000). "Levels of mRNAs encoding synaptic vesicle and synaptic plasma membrane proteins in the temporal cortex of elderly schizophrenic patients." *Biol Psychiatry* 48(3): 184-196.
- Sollner, T., M. K. Bennett, S. W. Whiteheart, R. H. Scheller y J. E. Rothman (1993). "A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion." *Cell* 75(3): 409-418.
- Stahl, S. M. (2006). Positive findings for negative symptoms of schizophrenia: no longer untreatable? *Acta Psychiatr Scand.* 114: 301-302.
- Steeds, H., Crahart-Harris, R.L. y Stone, J.M. (2015) "Drug models in schizophrenia". *Ther Adv Psychopharmacol* Vol. 5(1) 43-58
- Stefansson, H., E. Sigurdsson, V. Steinthorsdottir, S. Bjornsdottir, T. Sigmundsson, S. Ghosh, J. Brynjolfsson, S. Gunnarsdottir, O. Ivarsson, T. T. Chou, O. Hjaltason, B. Birgisdottir, H. Jonsson, V. G. Gudnadottir, E. Gudmundsdottir, A. Bjornsson, B. Ingvarsson, A. Ingason, S. Sigfusson, H. Hardardottir, R. P. Harvey, D. Lai, M. Zhou, D. Brunner, V. Mutel, A. Gonzalo, G. Lemke, J. Sainz, G. Johannesson, T. Andresson, D. Gudbjartsson, A. Manolescu, M. L. Frigge, M. E. Gurney, A. Kong, J. R. Gulcher, H. Petursson y K. Stefansson (2002). "Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia." *Am J Hum Genet* 71(4): 877-892.
- Steinecke, A., C. Gampe, C. Valkova, C. Kaether y J. Bolz (2012). "Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) is necessary for the correct migration of cortical interneurons." *J Neurosci* 32(2): 738-745.
- Steward, L. J., M. D. Kennedy, B. J. Morris y J. A. Pratt (2004). "The atypical antipsychotic drug clozapine enhances chronic PCP-induced regulation of prefrontal cortex 5-HT2A receptors." *Neuropharmacology* 47(4): 527-537.
- Strasser, A., P. J. Jost y S. Nagata (2009). "The many roles of FAS receptor signaling in the immune system." *Immunity* 30(2): 180-192.
- Sudhof, T. C. (2004). "The synaptic vesicle cycle." *Annu Rev Neurosci* 27: 509-547.
- Sudhof, T. C., M. Baumert, M. S. Perin y R. Jahn (1989). "A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to *Drosophila*." *Neuron* 2(5): 1475-1481.

- Sudhof, T. C. y J. Rizo (2011). "Synaptic vesicle exocytosis." Cold Spring Harb Perspect Biol 3(12).
- Sudhof, T. C. y J. E. Rothman (2009). "Membrane fusion: grappling with SNARE y SM proteins." Science 323(5913): 474-477.
- Sullivan, P. F., K. S. Kendler y M. C. Neale (2003). "Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies." Arch Gen Psychiatry 60(12): 1187-1192.
- Sutton, R. B., D. Fasshauer, R. Jahn y A. T. Brunger (1998). "Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution." Nature 395(6700): 347-353.
- Swanson, D. A., J. M. Steel y D. Valle (1998). "Identification and characterization of the human ortholog of rat STXBP1, a protein implicated in vesicle trafficking and neurotransmitter release." Genomics 48(3): 373-376.

T

- Talmage, D. A. (2008). "Mechanisms of neuregulin action." Novartis Found Symp 289: 74-84; discussion 84-93.
- Tareste, D., J. Shen, T. J. Melia y J. E. Rothman (2008). "SNAREpin/Munc18 promotes adhesion and fusion of large vesicles to giant membranes." Proc Natl Acad Sci 105(7): 2380-2385.
- Tischbirek, C. H., E. M. Wenzel, F. Zheng, T. Huth, D. Amato, S. Trapp, A. Denker, O. Welzel, K. Lueke, A. Svetlitchny, M. Rauh, J. Deusser, A. Schwab, S. O. Rizzoli, A. W. Henkel, C. P. Muller, C. Alzheimer, J. Kornhuber y T. W. Groemer (2012). "Use-dependent inhibition of synaptic transmission by the secretion of intravesicularly accumulated antipsychotic drugs." Neuron 74(5): 830-844.
- Toonen, R. F., K. J. de Vries, R. Zalm, T. C. Sudhof y M. Verhage (2005). "Munc18-1 stabilizes syntaxin 1, but is not essential for syntaxin 1 targeting and SNARE complex formation." J Neurochem 93(6): 1393-1400.
- Toonen, R. F. y M. Verhage (2003). "Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes." Trends Cell Biol 13(4): 177-186.
- Toonen, R. F. y M. Verhage (2007). "Munc18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control." Trends Neurosci 30(11): 564-572.
- Toonen, R. F., K. Wierda, M. S. Sons, H. de Wit, L. N. Cornelisse, A. Brussaard, J. J. Plomp y M. Verhage (2006). "Munc18-1 expression levels control synapse recovery by regulating readily releasable pool size." Proc Natl Acad Sci 103(48): 18332-18337.
- Tourneur, L. y G. Chiochia (2010). "FADD: a regulator of life and death." Trends Immunol 31(7): 260-269.

U

United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2013. New York

Urigüen, L., Oliva, J.M., Ortiz, S., Pérez, S., Palomo, T. y Manzanares, J. Modelos animales de trastornos afectivos. En: "Avances Neurocientíficos y Realidad Clínica VI. El espectro bipolar" Palomo, T., Beninger, R.J., Jiménez-Arriero, M.A. y Huertas, E. (1999). Fundación Cerebro y Mente. Editorial CYM. ISBN: 84-921848-7-6.), pp 137-176.

Uriguen, L., M. J. Garcia-Fuster, L. F. Callado, B. Morentin, R. La Harpe, V. Casado, C. Lluís, R. Franco, J. A. Garcia-Sevilla y J. J. Meana (2009). "Immunodensity and mRNA expression of A2A adenosine, D2 dopamine, and CB1 cannabinoid receptors in postmortem frontal cortex of subjects with schizophrenia: effect of antipsychotic treatment." Psychopharmacology 206(2): 313-324.

Uriguen, L., I. Gil-Pisa, E. Munarriz-Cuezva, E. Berrocoso, J. Pascau, M. L. Soto-Montenegro, A. Gutierrez-Adan, B. Pintado, J. L. Madrigal, E. Castro, P. Sanchez-Blazquez, J. E. Ortega, M. J. Guerrero, M. Ferrer-Alcon, J. A. Garcia-Sevilla, J. A. Mico, M. Desco, J. C. Leza, A. Pazos, J. Garzon y J. J. Meana (2013). "Behavioral, neurochemical and morphological changes induced by the overexpression of munc18-1a in brain of mice: relevance to schizophrenia." Transl Psychiatry 3: e221.

V

Valmiki, M. G. y J. W. Ramos (2009). "Death effector domain-containing proteins." Cell Mol Life Sci 66(5): 814-830.

Valverde, O. y M. Torrens (2012). "CB1 receptor-deficient mice as a model for depression." Neuroscience 204: 193-206.

Verderio, C., D. Pozzi, E. Pravettoni, F. Inverardi, U. Schenk, S. Coco, V. Proux-Gillardeaux, T. Galli, O. Rossetto, C. Frassoni y M. Matteoli (2004). "SNAP-25 modulation of calcium dynamics underlies differences in GABAergic and glutamatergic responsiveness to depolarization." Neuron 41(4): 599-610.

Verhage, M., A. S. Maia, J. J. Plomp, A. B. Brussaard, J. H. Heeroma, H. Vermeer, R. F. Toonen, R. E. Hammer, T. K. van den Berg, M. Missler, H. J. Geuze y T. C. Sudhof (2000). "Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion." Science 287(5454): 864-869.

Verhage, M. y R. F. Toonen (2007). "Regulated exocytosis: merging ideas on fusing membranes." Curr Opin Cell Biol 19(4): 402-408.

Vigano, D., C. Guidali, S. Petrosino, N. Realini, T. Rubino, V. Di Marzo y D. Parolaro (2009). "Involvement of the endocannabinoid system in phencyclidine-induced cognitive deficits modelling schizophrenia." Int J Neuropsychopharmacol 12(5): 599-614.

Virag, L. y C. Szabo (2002). "The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors." *Pharmacol Rev* 54(3): 375-429.

W

Walf, A. A. y C. A. Frye (2007). "The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents." *Nat Protoc* 2(2): 322-328.

Wang, X. D., Y. A. Su, C. M. Guo, Y. Yang y T. M. Si (2008). "Chronic antipsychotic drug administration alters the expression of neuregulin 1beta, ErbB2, ErbB3, and ErbB4 in the rat prefrontal cortex and hippocampus." *Int J Neuropsychopharmacol* 11(4): 553-561.

Weinberger, D. R., K. F. Berman y D. G. Daniel (1992). "Mesoprefrontal cortical dopaminergic activity and prefrontal hypofunction in schizophrenia." *Clin Neuropharmacol* 15 Suppl 1 Pt A: 568A-569A.

Wilson, R. I. y R. A. Nicoll (2002). "Endocannabinoid signaling in the brain." *Science* 296(5568): 678-682.

Wong, A. H., J. Trakalo, O. Likhodi, M. Yusuf, A. Macedo, M. H. Azevedo, T. Klempan, M. T. Pato, W. G. Honer, C. N. Pato, H. H. Van Tol y J. L. Kennedy (2004). "Association between schizophrenia and the syntaxin 1A gene." *Biol Psychiatry* 56(1): 24-29.

Wong, A. H. y H. H. Van Tol (2003). "Schizophrenia: from phenomenology to neurobiology." *Neurosci Biobehav Rev* 27(3): 269-306.

Wu, M. N., K. L. Schulze, T. E. Lloyd y H. J. Bellen (2001). The ROP-syntaxin interaction inhibits neurotransmitter release. *Eur J Cell Biol.* 80: 196-199.

X

Xu, Y., L. Su y J. Rizo (2010). "Binding of Munc18-1 to synaptobrevin and to the SNARE four-helix bundle." *Biochemistry* 49(8): 1568-1576.

Y

Yamamoto, H., Y. Hagino, S. Kasai y K. Ikeda (2015). Specific Roles of NMDA Receptor Subunits in Mental Disorders. *Curr Mol Med.* 15: 193-205.

Yen, Y. C., E. Anderzhanova, M. Bunck, J. Schuller, R. Landgraf y C. T. Wotjak (2013). "Co-segregation of hyperactivity, active coping styles, and cognitive dysfunction in mice selectively bred for low levels of anxiety." *Front Behav Neurosci* 7: 103.

- Yin, D. M., Y. J. Chen, Y. S. Lu, J. C. Bean, A. Sathyamurthy, C. Shen, X. Liu, T. W. Lin, C. A. Smith, W. C. Xiong y L. Mei (2013). "Reversal of behavioral deficits and synaptic dysfunction in mice overexpressing neuregulin 1." Neuron 78(4): 644-657.
- Yin, D. M., Y. J. Chen, A. Sathyamurthy, W. C. Xiong y L. Mei (2012). "Synaptic dysfunction in schizophrenia." Adv Exp Med Biol 970: 493-516.
- Young-Pearse, T. L., S. Suth, E. S. Luth, A. Sawa y D. J. Selkoe (2010). "Biochemical and functional interaction of disrupted-in-schizophrenia 1 and amyloid precursor protein regulates neuronal migration during mammalian cortical development." J Neurosci 30(31): 10431-10440.

Z

- Zavitsanou, K., T. Garrick y X. F. Huang (2004). "Selective antagonist [3H]SR141716A binding to cannabinoid CB1 receptors is increased in the anterior cingulate cortex in schizophrenia." Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 28(2): 355-360.
- Zilly, F. E., J. B. Sorensen, R. Jahn y T. Lang (2006). "Munc18-bound syntaxin readily forms SNARE complexes with synaptobrevin in native plasma membranes." PLoS Biol 4(10): e330.
- Zimmerberg, J., S. A. Akimov y V. Frolov (2006). Synaptotagmin: fusogenic role for calcium sensor? Nat Struct Mol Biol. 13: 301-303.

8. PUBLICACIONES

Regulation of munc18-1 and syntaxin-1A interactive partners in schizophrenia prefrontal cortex: down-regulation of munc18-1a isoform and 75 kDa SNARE complex after antipsychotic treatment

Itziar Gil-Pisa^{1,2*}, Eva Munarriz-Cueva^{1,2*}, Alfredo Ramos-Miguel¹, Leyre Urigüen², J. Javier Meana² and Jesús A. García-Sevilla¹

¹ Laboratorio de Neurofarmacología, IUNICS, Universitat de les Illes Balears and Red Temática de Investigación Cooperativa en Salud (RETICS-RTA), Palma de Mallorca, Spain

² Departamento de Farmacología, Universidad del País Vasco (UIPV/EHU) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), Leioa, Spain

Abstract

Munc18-1 and syntaxin-1 are crucial interacting molecules for synaptic membrane fusion and neurotransmitter release. Contrasting abnormalities of several proteins of the exocytotic machinery, including the formation of SNARE (synaptobrevin, SNAP-25 and syntaxin-1) complexes, have been reported in schizophrenia. This study quantified in the dorsolateral prefrontal cortex (PFC, Brodmann area 9) the immunoccontent of munc18-1a/b isoforms, syntaxin-1A, other presynaptic proteins (synaptotagmin, synaptophysin), and SNARE complexes, as well as the effects of psychoactive drug exposure, in schizophrenia (SZ, $n=24$), non-schizophrenia suicide (SD, $n=13$) and major depression (MD, $n=15$) subjects compared to matched controls ($n=39$). SZ was associated with normal expression of munc18-1a/b and increased syntaxin-1A (+44%). The presence of antipsychotic drugs reduced the basal content of munc18-1a isoform (−23%) and synaptobrevin (−32%), and modestly reduced that of up-regulated syntaxin-1A (−16%). Munc18-1a and syntaxin-1A protein expression correlated positively in controls but showed a markedly opposite pattern in SZ, regardless of antipsychotic treatment. Thus, the ratio of syntaxin-1A to munc18-1a showed a net increase in SZ (+53/114%). The SNARE complex (75 kDa) was found unaltered in antipsychotic-free and reduced (−28%) in antipsychotic-treated SZ subjects. None of these abnormalities were observed in SD and MD subjects, unexposed or exposed to psychoactive drugs. The results reveal some exocytotic dysfunctions in SZ that are probably related to an imbalance of the interaction between munc18-1a and SNARE (mainly syntaxin-1A) complex. Moreover, antipsychotic drug treatment is associated with lower content of key proteins of the exocytotic machinery, which could result in a destabilization/impairment of neurosecretion.

Received 6 October 2010; Reviewed 25 December 2010; Revised 27 April 2011; Accepted 7 May 2011;
First published online 14 June 2011

Key words: Major depression, munc18-1, post-mortem human brain, psychotropic drugs, schizophrenia, SNARE complex, syntaxin-1A.

Introduction

Schizophrenia (SZ) is a chronic, disabling and heterogeneous psychiatric disorder affecting about 1% of the

population worldwide (Jablensky, 1997). The pathogenesis and treatment of SZ is a continued focus of research (Marek *et al.* 2010), which recently has been focused on dysfunctions of brain molecules involved in the intricate process of neuroexocytosis (Johnson *et al.* 2008; Südhof & Starke, 2008).

Intensive research in the field of neurotransmitter release has established the minimal protein requirements for the docking, priming and fusion of synaptic vesicles providing a clear understanding of the exocytotic process (de Wit, 2010; Malsam *et al.* 2008;

Address for correspondence: Professor J. A. García-Sevilla, Laboratory of Neuropharmacology, IUNICS, University of the Balearic Islands, Cra. Valldemossa km 7.5, Palma de Mallorca E-07122, Spain.

Tel.: 34 971 173148 Fax: 34 971 173184

Email: jesus.garcia-sevilla@uib.es

* These authors contributed equally to this work.

Murthy & De Camilli, 2003; Rizo & Rosenmund, 2008; Rizo & Südhof, 2002; Südhof, 2004). Briefly, the fusion of opposing synaptic membranes in neurons is driven by the formation of SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors), a highly stable heterotrimeric complex built with the vesicular protein synaptobrevin and the plasma membrane proteins SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa) and syntaxin-1 (Rizo & Südhof, 2002; Söllner *et al.* 1993; Südhof & Rothman, 2009). This process is regulated by munc18-1, the major brain isoform of the Sec1/munc18 protein family (Burgoyne *et al.* 2009; Han *et al.* 2010; Jahn, 2000; Toonen & Verhage, 2007). Brain munc18-1 was originally identified as a binding partner for syntaxin-1 (Hata *et al.* 1993), and this key and complex interaction placed munc18-1 as a central component of the exocytotic machinery (Gulyás-Kovács *et al.* 2007; Han *et al.* 2010; Rickman & Duncan, 2010). Thus, the genetic deletion of munc18-1 in mice (tested at embryonic day 18 because of lethality at birth) resulted in abrogation of neurotransmitter release in the neocortex (Verhage *et al.* 2000) and reduced secretion in chromaffin cells (Voets *et al.* 2001). Moreover, in munc18-1-deficient mice brain syntaxin-1A, but not synaptobrevin and SNAP-25, was markedly decreased (70%) demonstrating the physiological relevance of munc18-1/syntaxin-1 interaction (Toonen *et al.* 2005). Munc18-1 also has the ability to bind neuronal SNARE complexes containing syntaxin-1 (Dulubova *et al.* 2007; Toonen *et al.* 2005) and synaptobrevin (Xu *et al.* 2010). Munc18-1 therefore participates in membrane fusion in cooperation with SNARE proteins, which is a crucial factor for priming synaptic vesicles to a release-ready state (Deák *et al.* 2009; Toonen & Verhage, 2007). The mechanisms underlying the interactions between munc18-1 and SNAREs, and especially with syntaxin-1 (open/closed conformation) are still debated (Han *et al.* 2010; Hu *et al.* 2011; Rathore *et al.* 2010).

Abnormalities of munc18-1 and/or SNARE proteins (leading to dysfunctional neurosecretion) might participate in the pathogenesis of SZ underlying, in part, the dysfunctions of dopaminergic and glutamatergic systems, the aberrant synaptic plasticity including developmental brain defects, and impaired cognitive functions (Eisenberg & Berman, 2010; Goldman-Rakic & Selemon, 1997; Honea *et al.* 2005; Marek *et al.* 2010). Contrasting results have been reported on the aberrant expression of SNARE proteins in SZ post-mortem brains (reviewed in Johnson *et al.* 2008). For example, syntaxin (mRNA or protein) was found increased (Gabriel *et al.* 1997; Honer *et al.* 1997;

Sokolov *et al.* 2000), unchanged (Castillo *et al.* 2010; Gabriel *et al.* 1997; Halim *et al.* 2003; Honer *et al.* 2002) or decreased (Barakauskas *et al.* 2010) in SZ cortical and/or striatal regions. In SZ ventromedial caudate, the amount of syntaxin interacting with SNAP-25 was indeed greater, suggesting an increased SNARE complex (Barakauskas *et al.* 2010). However, a reduced SNARE complex related to a deficit of syntaxin-1 phosphorylation has also been reported in SZ prefrontal cortex (Castillo *et al.* 2010). Furthermore, recent contrasting studies in SZ prefrontal cortex have shown increases of munc18-1 (STXBP1, syntaxin binding protein 1) in membrane microdomains of grey matter (Behan *et al.* 2009) or decreases of munc18-1 co-immunoprecipitated along with syntaxin-1 (Castillo *et al.* 2010). On the other hand, the synaptic hypothesis of SZ might also shed some light on the mechanisms of action of antipsychotic drugs (Marek *et al.* 2010). However, the long-term effects of psychoactive drugs on the expression munc18-1, syntaxin-1 and other SNARE proteins in brains of SZ subjects and laboratory rats are not fully concordant (e.g. see Barakauskas *et al.* 2010; Behan *et al.* 2009; Castillo *et al.* 2010).

Against this complex background, the present post-mortem brain (prefrontal cortex) study was designed to: (1) quantify in parallel the contents of munc18-1a/b isoforms, syntaxin-1A and other presynaptic proteins in schizophrenia (SZ), non-schizophrenia suicide (SD) and major depression (MD) subjects compared to matched controls; (2) determine the possible convergence of munc18-1 and syntaxin-1 protein expression; (3) assess the status of SNARE complexes; and (4) investigate the influence of psychoactive drug exposure on these targets. This investigation unravels the imbalance in the munc18-1a/syntaxin-1A interaction in SZ prefrontal cortex, and demonstrates that antipsychotic drugs can reduce the brain content of key proteins of the exocytotic machinery.

Materials and methods

Subject selection and post-mortem brain samples

Human brains were obtained at autopsies performed in the Basque Institute of Legal Medicine, Bilbao (Spain), and in the Romand University Center of Legal Medicine – Geneva (Switzerland). The bodies had been stored in a refrigerator (+4 °C) until autopsy. The study was developed in compliance with ethical and research policies for post-mortem brain studies (Basque Institute of Legal Medicine, and Department of Psychiatry, University of Geneva) and approved by the Internal Review Boards of the indicated

Table 1. Demographic characteristics and mean brain pH of subjects with schizophrenia, non-schizophrenia suicide, major depression, and their respective matched controls

Groups and subgroups	Gender	Age (yr)	PMI (h)	Brain pH
Control (C, <i>n</i> = 24)	5F/19M	39 ± 2	23 ± 3	6.35 ± 0.08
Schizophrenia (SZ, <i>n</i> = 24)	5F/19M	39 ± 3	23 ± 3	6.46 ± 0.04
Antipsychotic-free [SZ(-), <i>n</i> = 12]	2F/10M	34 ± 3	26 ± 4	
Antipsychotic-treated [SZ(+), <i>n</i> = 12]	3F/9M	43 ± 4	20 ± 6	
Non-schizophrenia suicide (SD, <i>n</i> = 13)	4F/9M	46 ± 4	27 ± 3	6.32 ± 0.03
Control (C, <i>n</i> = 15)	9F/6M	47 ± 3	21 ± 3	6.44 ± 0.05
Major depression (MD, <i>n</i> = 15)	9F/6M	46 ± 3	22 ± 3	6.32 ± 0.06
Antidepressant-free [MD(-), <i>n</i> = 5]	4F/1M	55 ± 6	25 ± 5	
Antidepressant-treated [MD(+), <i>n</i> = 10]	5F/5M	42 ± 3	20 ± 4	

M, Male; F, female; PMI, post-mortem interval.

See Supplementary Tables S1 and S2 for individual subjects and medication at the time of death.

Data (age, PMI) are mean ± S.E.M. values (*n*, number of subjects).

institutions. Caucasian subjects who had died by suicide, violent or natural causes, with or without indication of psychiatric disorder, were initially selected for the study. The included subjects (future cases and controls) were subjected to a retrospective search for previous clinical diagnoses (DSM-IV; APA, 1994; see also Deep-Soboslay *et al.* 2005) and treatments by using examiner's information and records of hospitals and mental health centres (subjects with comorbidity were excluded). Subjects with SZ were matched to controls in a paired design. A non-SZ suicide group (SD) was established to control for the suicide factor (main diagnoses in this group: adjustment disorder and personality disorder; major depression was excluded). Subjects with major depression (MD) were also selected for comparison and similarly matched to controls. Drug screening was performed at the National Institute of Toxicology (Madrid) and the STS 390 Unit (Geneva), using standard procedures (García-Fuster *et al.* 2008). SZ and MD subgroups were selected according to the absence or presence of antipsychotic or antidepressant drugs in blood and/or urine samples. Control subjects were chosen from the collected brains as described in Urigüen *et al.* (2009) to match subjects in the SZ, SD and MD groups. Control subjects, who mainly died by accidental or violent causes, showed no evidence of psychiatric or neurological disorder. The groups of subjects, including mean brain pH values, are presented in Table 1 (see Supplementary Tables S1 and S2 for individual subjects and medication at the time of death). Post-mortem brains from medical examiners' offices provide the

best standards of tissue quality for this type of study (Stan *et al.* 2006).

Samples of grey matter of the central area of the superior and middle frontal gyri [dorsolateral prefrontal cortex (PFC); Brodmann's area 9 (BA 9)] (Rajkowska & Goldman-Rakic, 1995) were obtained as described previously (Urigüen *et al.* 2009). White matter was also collected to assess the expression of munc18-1a/b isoforms and SNARE complexes. The PFC was chosen because it is involved in cognitive functions (Fuster, 2001; Miller & Cohen, 2001) that are impaired in SZ (Bozikas *et al.* 2006), possibly as a result of grey-matter reduction (Honea *et al.* 2005). Brain samples were stored at -70 °C until required. Sudden deaths display normal pH values with minor influences on genes, proteins and/or enzymatic reactions (Gawryluk *et al.* 2011; Li *et al.* 2004; see also Urigüen *et al.* 2009 for mRNAs in the current SZ and SD brain samples indicating good tissue quality).

Effect of post-mortem interval (PMI) on brain target proteins

The time period from death to the storage of brain specimens (PMI; determined by the medical examiner) is a well-known potential confounding variable (González-Maeso *et al.* 2002; Grange-Midroit *et al.* 2002; Stan *et al.* 2006). An independent series of healthy subjects (eight men, four women) with different PMIs (range 5–102 h) was used to assess the effect of this factor on target protein content in PFC/BA 9. These healthy subjects were chosen as indicated

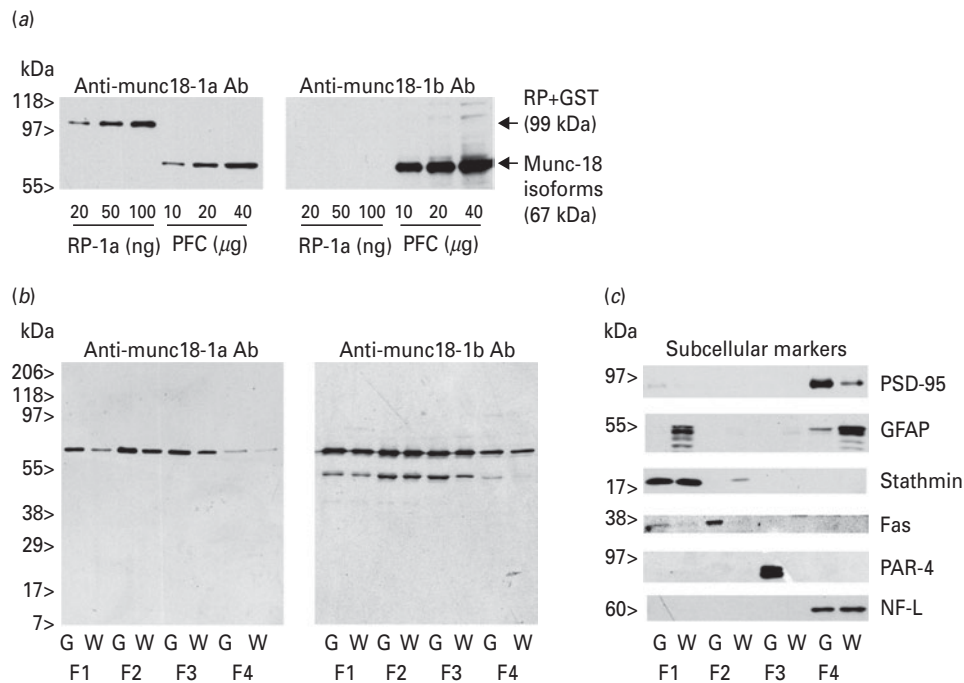


Fig. 1. (a) Representative immunoblots depicting labelling of munc18-1a and munc18-1b proteins in the human prefrontal cortex (PFC) (pool of 22 PFC/BA 9 control samples: 10–40 μ g protein), and full-length recombinant GST-tagged munc18-1a (RP-1a; samples: 20–100 ng protein) by using isoform selective anti-munc18-1 antibodies (Ab). Note that RP-1a protein (99 kDa) was recognized by the anti-munc18-1a Ab only (no RP-1a detection with anti-munc18-1b Ab even in overexposed films). Each Ab specifically revealed the presence of the corresponding munc18-1 isoform (monomeric species of 67 kDa). (b) Subcellular localization of munc18-1a and munc18-1b isoforms in grey (G) and white (W) matter of PFC (male subject, 44-yr-old, PMI 16 h, sample 15 μ g protein), and their relative content in the various compartments (F1, cytosolic fraction; F2, membrane/organelle fraction; F3, nuclear fraction; F4, cytoskeletal fraction). (c) Immunoblots of PSD-95 (G marker), GFAP (W marker), and selective subcellular markers: stathmin (F1), Fas receptor (F2), PAR-4 (F3) and NF-L (F4). The apparent molecular masses of munc18-1 isoforms and other proteins were estimated after blot calibration with standard molecular-weight markers (kDa).

above, including the absence of ethanol in blood samples.

Standard brain preparation and subcellular fractionation

Samples of PFC/BA 9 (grey matter, 250–300 mg) were routinely prepared as described previously (García-Fuster *et al.* 2008). The subcellular distribution of target proteins in grey and white matter (PFC/BA 9) was assessed with the ProteoExtract™ kit (Calbiochem, Germany) as described previously (Ramos-Miguel *et al.* 2009). This sequential extraction method yields four sub-proteomes enriched in cytosolic (F1), membrane and membrane organelle-localized (F2), soluble and DNA-associated nuclear (F3), and cytoskeletal (F4) proteins. The selectivity of the extraction procedure was assessed by the immunodetection of stathmin in F1; Fas receptor in F2; nuclear protein prostate apoptosis response 4 (PAR-4) in F3; and neurofilament-L (NF-L) in F4. Other F4 markers

included post-synaptic density protein of 95 kDa (PSD-95, neurons) and glial fibrillary acidic protein (GFAP; astrocytes) (see Fig. 1c). Brain samples (total homogenate and subcellular fractions) were stored at -80°C until sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and Western blot analysis.

SNARE complexes in rat and human brains: subcellular distribution in grey and white matter

The identification of SNARE complexes (SDS-resistant and stable heterotrimeric species; reported M_r range: 60–300 kDa) was assessed by SDS–PAGE and immunoblotting with anti-synaptobrevin, anti-syntaxin-1A and anti-SNAP-25 antibodies, as reported in cells and brain tissue (Hayashi *et al.* 1994; Honer *et al.* 2002; Otto *et al.* 1997) with some modifications. Male Sprague–Dawley rats (200–250 g) were also used to assess and manipulate, with specific chemicals, brain SNARE complexes. All animal care and

experimental procedures were conducted according to standard ethical guidelines (European Communities Council Directive 86/609/EEC) and approved by the Bioethical Committee of the UIB. Rat (cerebral cortex) and human (PFC/BA 9) samples were homogenized (solubilization in 2% SDS) and prepared for Western blot analysis. For the characterization and quantification of SNARE complexes non-boiled brain samples were used. In some experiments, aliquots of PFC/BA 9 samples were boiled for 4 min before loading to confirm the destruction of SNARE complexes (Hayashi *et al.* 1994). The *in-vitro* disassembly of SNARE complexes was accomplished by chemical manipulation and freezing/thawing procedures. Rat cortical membranes (two aliquots of total homogenate) were incubated (1 h at 37 °C) in the absence or presence of dithiothreitol (200 mM DTT, a lipophilic sulphhydryl-reactive reagent that blocks cysteine residues and interrupts membrane fusion events) or urea (6 M, a denaturant agent that dissociates protein aggregation), which was followed by three cycles of freeze (liquid nitrogen)/thaw (at 37 °C) sample treatment. After these procedures, the samples were prepared for Western blot analysis. In human brain tissue (PFC/BA 9), the subcellular distribution (F1–F4) of SNARE complexes (~75 kDa and ~110 kDa) in grey and white matter was assessed as described above.

SDS-PAGE, Western blot assay and quantification of target proteins

The brain samples were boiled for 2 min before loading, except those used in the immunodetection of SNARE complexes. Target proteins (40 µg total homogenate, 15 µg each subcellular fraction) were resolved by SDS-PAGE and quantified by Western blot analysis as described previously (García-Fuster *et al.* 2008). The primary antibodies (epitope-affinity purified) are listed in Supplementary Table S3 (dilutions 1:1000–1:10 000). Special attention was paid to the specificity of anti-munc18-1a and anti-munc18-1b antibodies by the selective recognition of full-length recombinant GST-fused munc18-1a protein (Abnova Corporation, Taiwan, H6812-PO1, batch A1V000KPP004243) (Fig. 1a). As a control for sample loading and protein transfer, the blots were stripped (Boronat *et al.* 2001) and reprobed with anti-β-actin monoclonal antibody.

Target proteins and SNARE complexes were quantified by densitometric scanning (GS-800 Imaging Densitometer, Bio-Rad, USA) of specific immunoreactive bands [integrated optical density (IOD) units], as described by García-Fuster *et al.* (2008).

The resolution of various concentrations of protein (e.g. munc18-1a/b isoforms, Fig. 1a) resulted in good linear relationships (i.e. total protein loaded *vs.* IOD units). Target proteins in PFC/BA 9 were quantified in pairs of subjects with SZ, and SD when included, or MD, and the respective matched control, and the relative content of each protein was calculated (percent change) in relation to in-gel triplicate standards (100%, pool of 22 or 15 control samples for SZ and MD groups, respectively). This quantification procedure was assessed 3–6 times in different gels, and the resulting mean value of the target protein was used as a final estimate. Similar results were also obtained when the IODs were normalized to that of β-actin (data not shown).

Data analyses and statistics

The data were analysed with GraphPad Prism™, version 4.0 (GraphPad Software, USA). Before the statistical analyses, the data were inspected for outliers (critical value, $Z > 1.96$) using Grubb's test (GraphPad Software, www.graphpad.com/quickcalcs/grubbs1.cfm). A few control (two) and SZ (three) samples were outliers for a particular target protein and discarded for further analysis. In three controls and SZ subjects, synaptobrevin and SNAP-25 were not measured because the brain samples were exhausted. The final number of control and SZ cases analysed for each protein is indicated in the Figures. In the SD and MD groups no outliers were detected. All final datasets passed Kolmogorov–Smirnov normality tests. Results are expressed as mean ± S.E.M. values. Data were analysed using Student's *t* test or one-way ANOVA followed by a Bonferroni *post-hoc* test for multiple comparisons. To control for the suicide factor, a two-way ANOVA was performed with suicide as within-group factor and SZ as between-group factor for the various protein targets. Analyses of covariance were also performed to control results for PMI, gender, and age at death. Pearson's correlation coefficients were calculated to test for possible association between parametric variables. The level of significance was set to $p < 0.05$. All tests were two-tailed.

Results

Immunodetection of munc18-1a/b isoforms in human PFC/BA 9: subcellular distribution in grey and white matter

Munc18-1a and munc18-1b proteins were identified as monomeric species of 67 kDa with specific antibodies

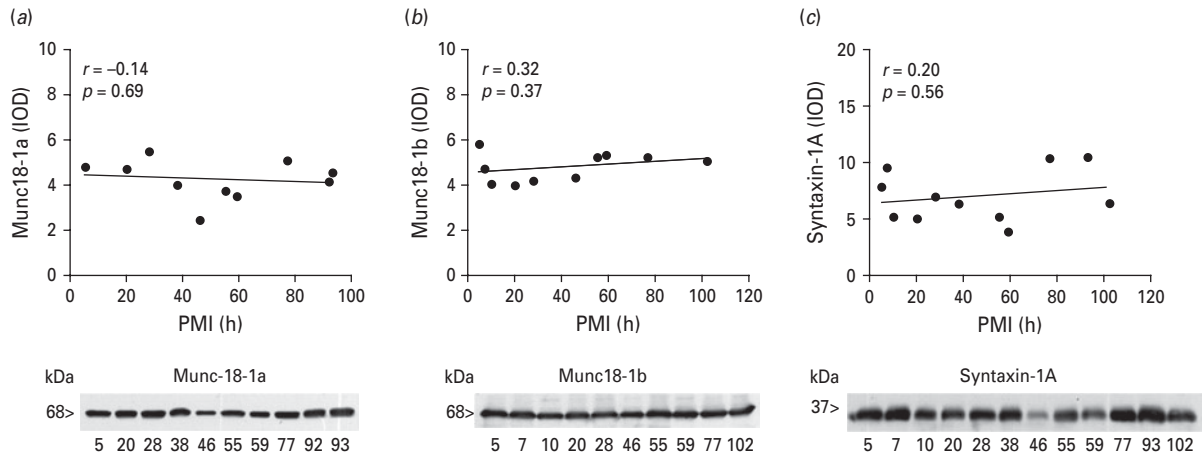


Fig. 2. Lack of significant correlation between the post-mortem interval (PMI, range 5–102 h) and the relative content (IOD, integrated optical density) of (a) munc18-1a, (b) munc18-1b, and (c) syntaxin-1A in the prefrontal cortex (PFC/BA 9) of healthy subjects (see Materials and methods section). (a–c) Bottom panels are representative immunoblots for the effect of PMI on the content of munc18-1a, munc18-1b and syntaxin-1A in the PFC. The experiments were repeated with similar results. The molecular masses of the target proteins were estimated from referenced standards.

that differentiated both isoforms in PFC/BA 9 (total homogenate). Thus, full-length recombinant GST-tagged munc18-1a protein (~100 kDa) was detected with anti-munc18-1a, but not with anti-munc18-1b, antibody (Fig. 1a). At the subcellular level (grey and white matter), munc18-1a was localized in the cytosol (F1), membranes (F2) and nucleus (F3), with a higher relative abundance in grey matter (1.6- to 4.1-fold enrichment) (Fig. 1b,c). The distribution of munc18-1b in grey and white matter was similar, with a small enrichment in grey matter (8–39%) (Fig. 1b,c).

Post-mortem degradation of munc18-1, syntaxin-1A and other presynaptic proteins

The content of munc18-1a/b isoforms and syntaxin-1A in PFC/BA 9 did not vary by the time period from death to the storage of brain specimens (PMI range 5–102 h), indicating a low rate of post-mortem degradation (Fig. 2a–c). This range of PMI did not influence the content of SNAP-25, synaptotagmin and synaptophysin in the same samples, except that of synaptobrevin that declined as a function of PMI ($r = -0.70$, $p = 0.025$) (data not shown). It should be noted that the experimental subjects were matched with their respective controls for PMI, gender and age at death (Table 1), and that analyses of covariance further indicated that these variables and the pH of the sample did not influence the results (data not shown).

Munc18-1, syntaxin-1A and other presynaptic proteins in PFC/BA 9 of SZ and SD subjects: effect of antipsychotic medication

The content of munc18-1a and munc18-1b isoforms in PFC/BA 9 of SZ and SD subjects did not differ from those quantified in matched controls (Fig. 3a,b). However, in SZ subjects who had received antipsychotics a significant reduction of munc18-1a (23%, $p < 0.05$), but not munc18-1b, was quantified (Fig. 3a,b). Syntaxin-1A was markedly increased in SZ (44%, $p < 0.01$), but not in SD subjects, and antipsychotic treatment was associated with a tendency to reverse this up-regulation [SZ(-): 51%, $p < 0.01$; SZ(+): 35%, $p < 0.05$; difference: 16%, $p > 0.05$] (Fig. 3c). The content of synaptobrevin, SNAP-25, synaptotagmin and synaptophysin were not altered in SZ and SD subjects, and in the presence of antipsychotic treatment only expression of synaptobrevin was decreased in SZ subjects [(SZ(+)): 32% reduction, $p < 0.05$] (Fig. 4).

Unexpectedly, munc18-1a and syntaxin-1A showed a significant inverse correlation in SZ (all SZ subjects: $r = -0.45$, $p = 0.02$, $n = 22$), regardless of antipsychotic medication (antipsychotic-free: $r = -0.74$, $p = 0.009$, $n = 11$; antipsychotic-treated: $r = -0.67$, $p = 0.02$, $n = 11$). Therefore, SZ subjects showed a net increase in the syntaxin-1A/munc18-1a ratio [controls: 1.01 ± 0.08 , $n = 22$; antipsychotic-free: 1.54 ± 0.18 , $n = 11$, $p < 0.05$; antipsychotic-treated: 2.15 ± 0.35 , $n = 11$, $p < 0.001$; ANOVA

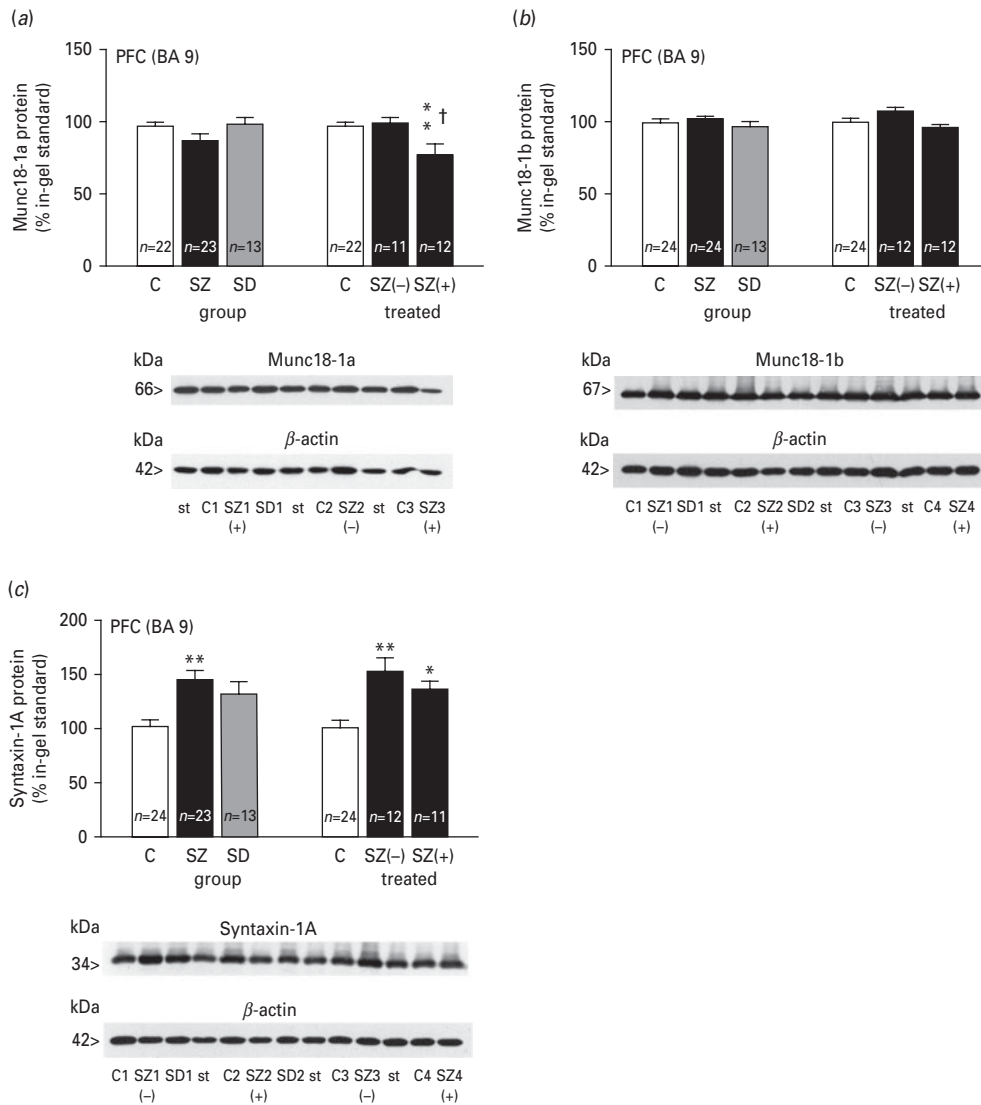


Fig. 3. Immunodensities of (a) munc18-1a, (b) munc18-1b, and (c) syntaxin-1A in the prefrontal cortex (PFC/BA 9) of control (C, $n = 22-24$), schizophrenia (SZ, $n = 23-24$) and non-schizophrenia suicide (SD, $n = 13$) matched subjects, as well as of SZ antipsychotic-free [SZ(-), $n = 11-12$] and treated [SZ(+), $n = 11-12$] subjects, expressed as mean \pm S.E.M. (bars) percentages of an in-gel standard (100%, pool of 22 PFC/BA 9 control samples). (a-c) Bottom panels are representative immunoblots of munc18-1a, munc18-1b, syntaxin-1A and β -actin for each set of experiments, which included standard samples (st), and samples of C, SZ(-), SZ(+) and SD matched subjects. The molecular masses of the target proteins were estimated from referenced standards. (a) Munc18-1a: one-way ANOVA did not detect a significant difference between C, SZ and SD groups ($F_{2,55} = 1.97, p > 0.05$); ANOVA detected a significant difference between C, SZ(-) and SZ(+) groups ($F_{2,42} = 6.39, p = 0.0038$); ** $p < 0.001$ compared to the corresponding control (C), $\dagger p < 0.05$ compared to SZ(-) (ANOVA followed by Bonferroni's test). (b) Munc18-1b: ANOVA did not detect significant differences between C, SZ and SD ($F_{2,58} = 0.61, p > 0.05$) and between C, SZ(-) and SZ(+) ($F_{2,45} = 2.79, p = 0.072$) groups. (c) Syntaxin-1A: ANOVA detected significant differences between C, SZ and SD ($F_{2,57} = 8.14, p = 0.008$) and between C, SZ(-) and SZ(+) ($F_{2,44} = 8.45, p = 0.0009$) groups; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared to the corresponding control (C).

($F_{2,41} = 9.78; p = 0.0003$) and Bonferroni's test]. In contrast, munc18-1b and syntaxin-1A did not show any relationship in SZ (all SZ subjects: $r = 0.09$,

$p = 0.68, n = 23$; antipsychotic-free: $r = -0.10, p = 0.77, n = 12$; antipsychotic-treated: $r = -0.05, p = 0.89, n = 11$).

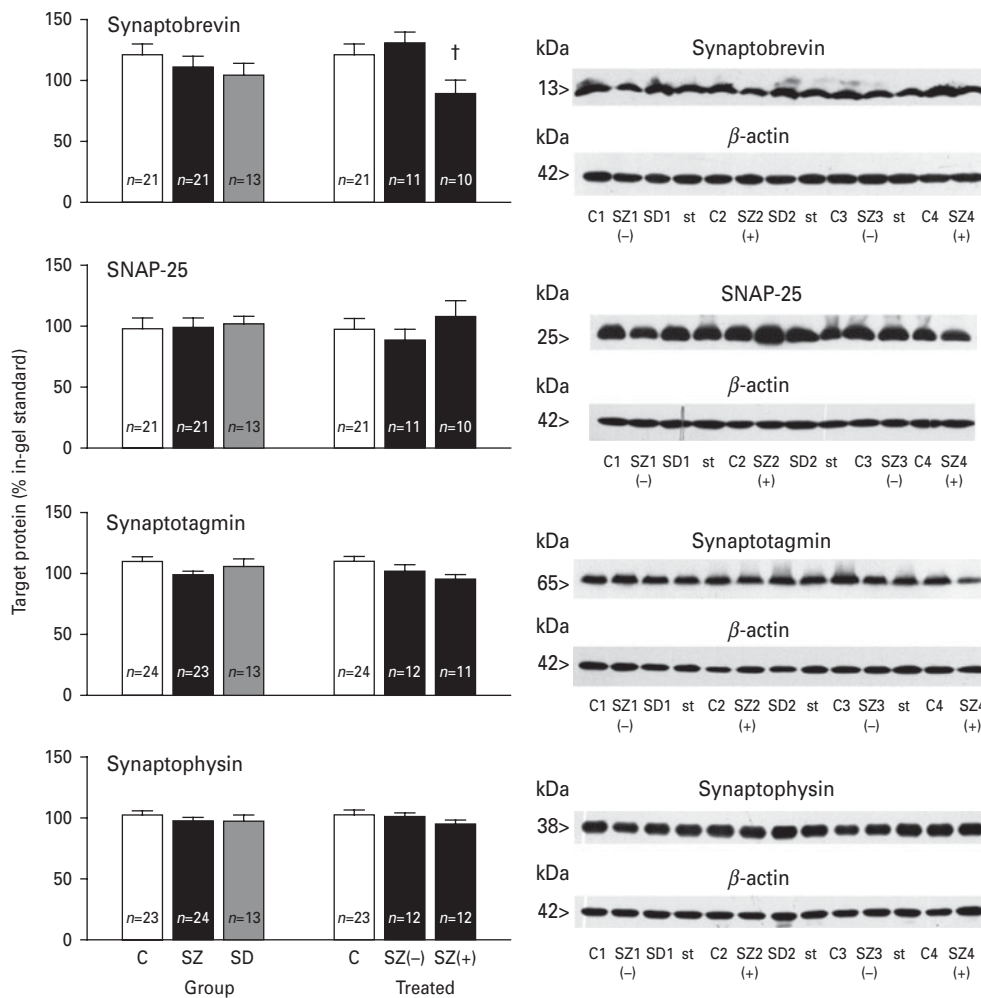


Fig. 4. Immunodensities of synaptobrevin, SNAP-25 (synaptosomal-associated protein of 25 kDa), synaptotagmin and synaptophysin in the prefrontal cortex (PFC/BA 9) of control (C, $n = 21-24$), schizophrenia (SZ, $n = 21-24$) and non-schizophrenia suicide (SD, $n = 13$) matched subjects, as well as of SZ antipsychotic-free [SZ(-); $n = 11-12$] and treated [SZ(+), $n = 10-12$] subjects, expressed as mean \pm S.E.M. (bars) percentages of an in-gel standard (100%, pool of 22 PFC control samples). One-way ANOVA did not detect significant differences between C, SZ and SD groups for any presynaptic protein. For synaptobrevin, but not for other presynaptic proteins, ANOVA detected a significant difference between C, SZ(-) and SZ(+) groups ($F_{2,39} = 3.35$, $p = 0.045$); $^{\dagger} p < 0.05$ compared to SZ(-) group. Right: representative immunoblots of synaptobrevin, SNAP-25, synaptotagmin, synaptophysin, and β -actin for each set of experiments, which included standard samples (st), and samples of C, SZ(-), SZ(+) and SD matched subjects. The molecular masses of the target proteins were estimated from referenced standards.

Munc18-1, syntaxin-1A and other presynaptic proteins in PFC/BA 9 of subjects with MD: no effect of antidepressant medication

The content of munc18-1a/b isoforms, syntaxin-1A and other presynaptic proteins (SNAP-25, synaptobrevin, synaptotagmin, synaptophysin) in PFC/BA 9 of antidepressant-free and antidepressant-treated MD subjects did not differ from those quantified in matched controls (Table 2).

SNARE complexes in rat and human brains: post-mortem degradation and subcellular distribution in grey and white matter

In rat (cerebral cortex) and human (PFC/BA 9) brain tissue, native SNARE complexes (~ 75 kDa and ~ 110 kDa) were readily detected with the anti-synaptobrevin (only the ~ 75 kDa complex), anti-syntaxin-1A and anti-SNAP-25 antibodies, which also revealed the corresponding protein monomeric

Table 2. Immunodensities of munc18-1a/b isoforms, syntaxin-1A, and other presynaptic proteins in the prefrontal cortex (PFC/BA 9) of subjects with major depression (MD) and their matched healthy controls

Presynaptic protein	Control subjects (n=15)	MD subjects, antidepressant-free (n=5)	MD subjects, antidepressant-treated (n=10)
Munc18-1a	101 ± 4	101 ± 6	100 ± 3
Munc18-1b	99 ± 3	98 ± 5	97 ± 5
Syntaxin-1A	97 ± 2	97 ± 3	97 ± 4
SNAP-25	96 ± 3	92 ± 4	96 ± 6
Synaptobrevin	98 ± 8	86 ± 11	86 ± 12
Synaptotagmin	103 ± 4	107 ± 4	101 ± 4
Synaptophysin	102 ± 5	107 ± 7	99 ± 5

Data are mean ± S.E.M. values (n, number of subjects) expressed as percentages of an in-gel standard (100%, pool of 15 PFC control samples).

One-way ANOVAs did not detect significant differences between the groups of subjects for any presynaptic protein.

forms (Fig. 5a). The ~75 kDa SNARE complex (detected by the three SNARE antibodies) most closely approximated the M_r (~72 kDa) of the expected heterotrimer (Fig. 5a). The higher M_r of the ~110 kDa SNARE complex could be related to post-translational modifications of some components. The boiling of brain samples (human PFC/BA 9) broke down the SNARE complexes (detected with the anti-SNAP-25 antibody) and markedly enhanced the expression of monomeric SNAP-25 (Fig. 5a, right). Treatment of rat cortical membranes with the disulfide bond disrupter DTT (200 mM) or denaturant urea (6 M), followed by a membrane freeze/thaw procedure, reduced the content of ~75 kDa and/or ~110 kDa SNARE complexes (15–92%) and induced concomitant increases of monomeric synaptobrevin (5–52%), syntaxin-1A (6–35%) and SNAP-25 (63–160%) (Fig. 5a).

The content of ~75 kDa SNARE complex in human PFC/BA 9 quantified with the anti-synaptobrevin, anti-syntaxin-1A or anti-SNAP-25 antibody, was not significantly influenced by PMI range (5–102 h) (Fig. 5b), indicating that the native heterotrimer is highly resistant to post-mortem disassembly and/or specific protein degradation (see Fig. 2c for monomeric syntaxin-1A).

At the subcellular level (human PFC/BA 9), the ~75 kDa SNARE complex (detected with the anti-syntaxin-1A or anti-SNAP-25 antibody) was mostly expressed in membrane-rich fractions (F2) of grey and white matter (Fig. 5c), which was the expected SNARE cellular localization (role in synaptic vesicle fusion).

Moreover, the relative abundance of ~75 kDa SNARE complex was higher in grey matter compared to white matter (Fig. 5c). Interestingly, the enriched membrane (F2) localization of the ~75 kDa SNARE complex (at least when detected with anti-SNAP-25 antibody) was not observed for the ~110 kDa SNARE complex (Fig. 5c).

Regulation of the ~75 kDa SNARE complex in PFC/BA 9 of SZ, SD, and MD subjects: effect of antipsychotic or antidepressant medication

The content of the ~75 kDa SNARE complex (quantified with the anti-SNAP-25 antibody) in PFC/BA 9 of SZ subjects, but not SD subjects, was decreased (19%, $p < 0.01$) compared to that in matched controls (Fig. 6, left). This reduction was associated with those SZ subjects who had received antipsychotic drugs [SZ(-): 10%, $p > 0.05$; SZ(+): 28%, $p < 0.001$] (Fig. 6, left). In MD subjects, and regardless of antidepressant treatment, the content of the ~75 kDa SNARE complex (anti-SNAP-25 antibody) did not differ from that in matched controls (Fig. 6, right). Similar negative results were obtained in MD subjects when this SNARE complex was quantified with the anti-syntaxin-1A antibody (data not shown).

Discussion

This post-mortem brain study investigated the status of relevant components of the exocytotic machinery in PFC/BA 9 of SZ, SD and MD subjects, as well as the

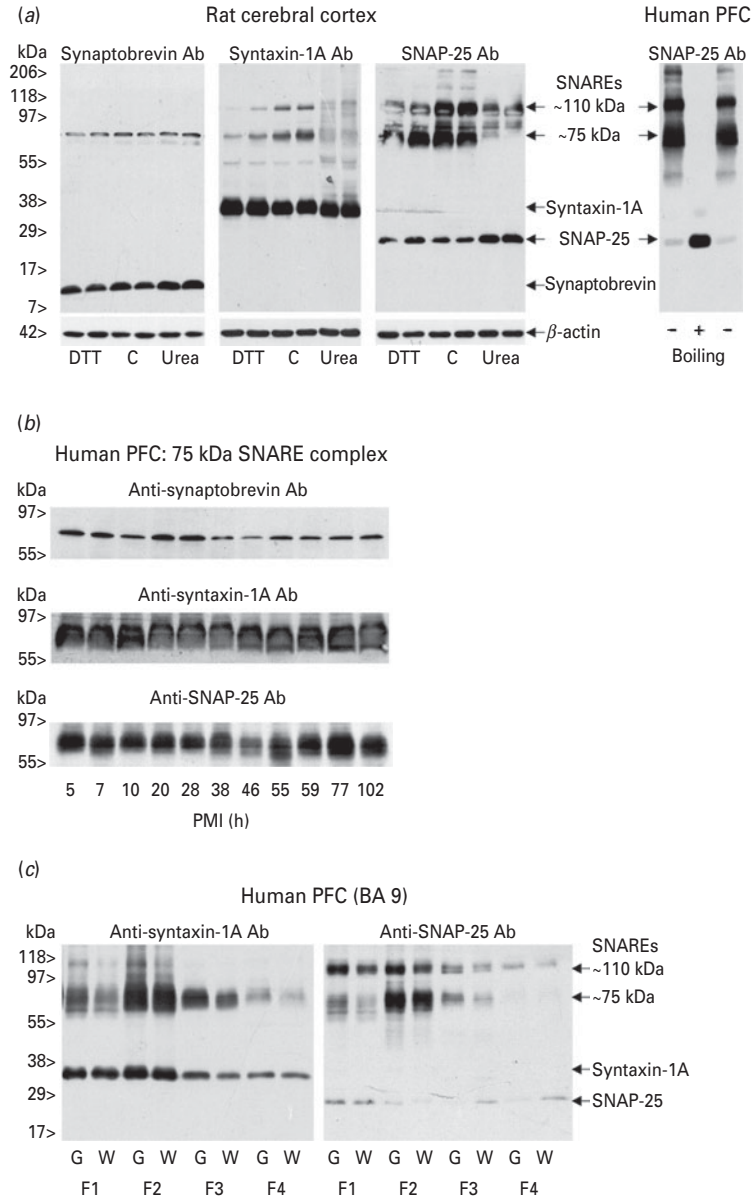


Fig. 5. (a) Detection and characterization of SNARE complexes (~ 75 kDa and ~ 110 kDa) in the rat cerebral cortex (total homogenate $40 \mu\text{g}$ protein) and human prefrontal cortex (pool of 22 PFC/BA 9 controls: $40 \mu\text{g}$ protein) with the anti-synaptobrevin, anti-syntaxin-1A and anti-SNAP-25 antibodies. Non-boiled (rat), and non-boiled and boiled (human) brain samples were used. In rat brain (C, control samples), the disassembly of SNARE complexes was accomplished by chemical manipulation with dithiothreitol (DTT, 200 mM) or urea (6 M) followed by a freeze/thaw procedure. (b) Lack of effect of PMI (range 5–102 h) on the relative content of the ~ 75 kDa SNARE complex in PFC/BA 9 of healthy subjects (11 subjects: eight men, three women; age range 15–52 yr) quantified with the anti-synaptobrevin ($r = -0.48$, $p = 0.14$), anti-syntaxin-1A ($r = -0.16$, $p = 0.62$) and anti-SNAP-25 ($r = 0.30$, $p = 0.38$) antibodies. (c) Subcellular localization of the ~ 75 kDa and ~ 110 kDa SNARE complexes (detected with the anti-syntaxin-1A and anti-SNAP-25 antibodies) in grey (G) and white (W) matter of PFC/BA 9 (male subject, 44-yr-old, PMI 16 h, sample $15 \mu\text{g}$ protein), and their relative contents in the various subcellular compartments (F1–F4; for further details see Fig. 1*b, c*). These experiments (a–c) were repeated with similar results. The molecular masses of SNARE complexes, monomeric SNARE proteins, and β -actin were estimated from referenced standards.

possible effects of exposure to psychoactive drugs. The main results indicated that (1) munc18-1a and munc18-1b protein contents were normal in SZ, SD

and MD, and munc18-1a was reduced in SZ under antipsychotic treatment; (2) syntaxin-1A was increased in SZ (unaltered in SD and MD), a finding not

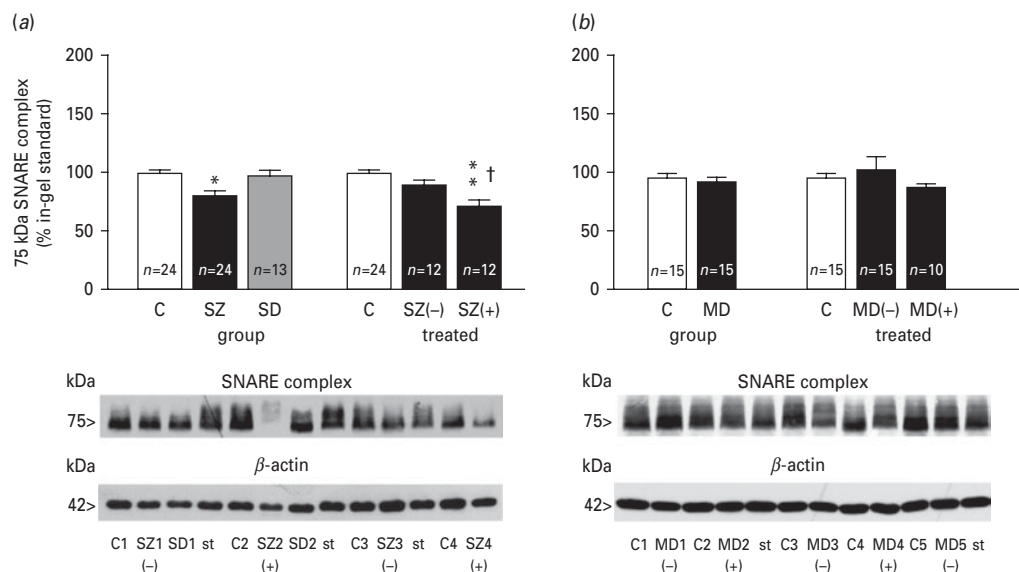


Fig. 6. (a) Content of ~ 75 kDa SNARE complex quantified with the anti-SNAP-25 antibody in the prefrontal cortex (PFC/BA 9) of control (C, $n=24$), schizophrenia (SZ, $n=24$) and non-schizophrenia suicide (SD, $n=13$) matched subjects, as well as of SZ antipsychotic-free [SZ(-); $n=12$] and treated [SZ(+); $n=12$] subjects, expressed as mean \pm s.e.m. (bars) percentages of an in-gel standard (100%, pool of 22 PFC control samples). (a) Bottom panels are representative immunoblots of ~ 75 kDa SNARE complex and β -actin for each set of experiments, which included standard samples (st), and samples of C, SZ(-), SZ(+) and SD matched subjects. One-way ANOVA detected a significant difference between C, SZ and SD groups ($F_{2,58}=6.53$, $p=0.0027$); ANOVA also detected a significant difference between C, SZ(-) and SZ(+) groups ($F_{2,45}=9.75$, $p=0.0003$); * $p<0.01$, ** $p<0.001$ compared to the corresponding C or SD group; † $p<0.05$ compared to SZ(-) (ANOVA followed by Bonferroni's test). (b) Content of 75 kDa SNARE complex quantified with the anti-SNAP-25 antibody in prefrontal cortex (PFC/BA 9) of control subjects (C, $n=15$) and subjects with major depression (MD, $n=15$), as well as in antidepressant-free [MD(-), $n=5$] or antidepressant-treated [MD(+), $n=10$] MD subjects, expressed as mean \pm s.e.m. (bars) percentages of an in-gel standard (100%, pool of 15 PFC control samples). (b) Bottom panels are representative immunoblots of ~ 75 kDa SNARE complex and β -actin for each set of experiments, which included standard samples (st), and samples of C, MD(-) and MD(+) matched subjects. Student's t test (C vs. MD) and one-way ANOVA [C, MD(-), MD(+)] did not detect significant differences between groups. The molecular masses of ~ 75 kDa SNARE complex and β -actin were estimated from referenced standards.

related to drug effects; (3) munc18-1a and syntaxin-1A showed an inverse relationship in SZ, regardless of antipsychotic exposure; (4) synaptobrevin, SNAP-25, synaptotagmin, and synaptophysin were unchanged in SZ, SD and MD, and synaptobrevin in SZ was down-regulated by antipsychotics; and (5) the ~ 75 kDa SNARE complex was reduced in SZ (unaltered in SD and MD), a decrease associated with antipsychotic treatment.

Munc18-1 is an essential molecule of the exocytotic apparatus (Rizo & Südhof, 2002; Verhage *et al.* 2000) that works in concert with syntaxin-1A and other SNARE (synaptobrevin and SNAP-25) proteins to promote synaptic vesicle fusion, trafficking and neurotransmitter release (Deák *et al.* 2009; Han *et al.* 2010; Rathore *et al.* 2010; Toonen & Verhage, 2007). Munc18-1 has two alternative splice forms: munc18-1a

(neuronal expression) and munc18-1b (ubiquitous expression), which differ in the 24 amino acids of the N-terminal domain (Hata & Südhof, 1995; Swanson *et al.* 1998). In the present study, munc18-1a and munc18-1b isoforms were distinctly identified as ~ 67 kDa monomers in PFC/BA 9 (grey and white matter) by using selective antibodies (munc18-1 was localized in the cytosol, membranes and nucleus; see also Sharma *et al.* 2005). The results demonstrate a normal content of both munc18-1 isoforms in PFC/BA 9 of antipsychotic-free SZ subjects as well as in SD and MD subjects, suggesting that suicide (SZ, SD, MD) and antidepressant drug exposure (MD) are not determinant factors to alter basal munc18-1 in these disorders. Moreover, munc18-1a and synaptobrevin were reduced in PFC/BA 9 of SZ subjects under antipsychotic treatment (synaptobrevin was reported unchanged

in this cortical region of psychotropic-treated SZ subjects; Scarr *et al.* 2006). Similarly, chronic clozapine treatment in rats was shown to down-regulate (20%) the expression (mRNA) of Sec1/munc18-1 in the PFC (Kontkanen *et al.* 2002). A recent proteomic study (Behan *et al.* 2009), validated by Western blotting, reported significant increases (18–24%) of munc18-1 (STXBP1) in PFC membrane microdomains (pool of grey matter) of SZ subjects, which were not related to antipsychotic treatment. In that study (Behan *et al.* 2009), the antibody used (anti-STXBP1 polyclonal antibody; Synaptic Systems GmbH, Germany; no further details were given) appears to indicate that munc18-1b was the quantified isoform (Synaptic Systems immunogen: peptide DTLKLNKTDEEISS, residues 580–594; see Supplementary Table S3 for comparison with Sigma Chemical immunogen: peptide KLLDTLKLKLNKTDEEISS, residues 577–594). Another proteome study also showed a significant up-regulation of munc18-1 protein (2.5-fold, not validated by immunoblotting) in the thalamus of chronically antipsychotic-treated SZ subjects (Martins-de-Souza *et al.* 2010). These findings contrast with the reported marked reduction (~50%) of munc18-1 (protein amount co-immunoprecipitated with syntaxin-1) in PFC/BA 10 of SZ subjects, exposed and not exposed to psychoactive drugs (Castillo *et al.* 2010). Therefore, the basal status of munc18-1 protein (munc18-1a/b or a specific munc18-1 isoform) and the effects of antipsychotics in PFC of SZ subjects are not concordant across the few post-mortem studies performed to date (Behan *et al.* 2009; Castillo *et al.* 2010; Martins-de-Souza *et al.* 2010; present study).

Syntaxin-1A also has a central role in the process of exocytosis, mainly through its complex interaction with munc18-1 (Gerber *et al.* 2008; Han *et al.* 2010; Hu *et al.* 2011; Rathore *et al.* 2010; Rizo & Südhof, 2002; Toonen *et al.* 2005). Interestingly, SZ and syntaxin-1A have been genetically linked (Wong *et al.* 2004), and syntaxin-1A knockout mice display abnormal behaviours related to SZ (Fujiwara *et al.* 2010). The phosphorylation of syntaxin-1 at Ser¹⁴ was shown to inhibit its interaction with munc18-1, which resulted in a marked reduction of secretion in neuroblastoma cells (Rickman & Duncan, 2010). Recently, the amount of p-Ser¹⁴ syntaxin-1, but not total syntaxin-1, was found reduced in PFC/BA 10 of SZ subjects, which was associated with a decrease in the formation of a ~110 kDa SNARE complex (Castillo *et al.* 2010). However, in the present study total syntaxin-1A was markedly increased in PFC/BA 9 of antipsychotic-free (51%) and antipsychotic-treated (35%) SZ subjects. The up-regulation of syntaxin-1A appears to be a

specific feature of SZ because its content was not altered in SD and MD subjects. This finding agrees well with early post-mortem studies that reported increases of syntaxin protein and/or mRNA in SZ cortical regions (Gabriel *et al.* 1997; Honer *et al.* 1997, 2002; Sokolov *et al.* 2000). However, in other studies two syntaxin isoforms (33/35 kDa) were reported unchanged in PFC/BA 9 of psychotropic-treated SZ subjects (Scarr *et al.* 2006). In the current study, it is striking that neuronal munc18-1a (but not munc18-1b) and syntaxin-1A showed an inverse correlation in the same SZ brain samples, regardless of antipsychotic drug exposure. This abnormal relationship indicates that the normal balance between the interactive partners munc18-1a and syntaxin-1A is lost in SZ brains, which suggests that the observed up-regulation of syntaxin-1A could represent a compensatory mechanism to counteract some presynaptic deficits postulated in this disorder (see Behan *et al.* 2009; Castillo *et al.* 2010).

SNARE complexes (heterotrimers built with synaptobrevin, SNAP-25 and syntaxin-1A), whose formation is mainly regulated by munc18-1, play a major role in the docking of synaptic vesicles at presynaptic terminals and consequently in neuroexocytosis (Deák *et al.* 2009; Rizo & Südhof, 2002; Toonen & Verhage, 2007). Changes of monomeric synaptobrevin and syntaxin in SZ brains have been discussed above. The content of monomeric SNAP-25 protein was unchanged in PFC/BA 9 of SZ subjects (Scarr *et al.* 2006; current study), but it was higher (with decreased mRNA expression) in a small cohort of subjects with bipolar I disorder (Scarr *et al.* 2006). In the context of mental disorders, an early post-mortem study reported significant increases of SNARE complexes (~121/150 kDa) in PFC of SZ and MD subjects who committed suicide (Honer *et al.* 2002). In contrast, a SNARE complex of ~110 kDa was shown to be reduced (35%) in PFC/BA 10 of SZ subjects with a low content of p-Ser¹⁴ syntaxin-1 (only four SZ cases were analysed) (Castillo *et al.* 2010). In the present study, native SNARE complexes were identified by SNARE antibodies as immunoreactive bands of ~75 kDa and ~110 kDa in rat (cerebral cortex) and human (PFC/BA 9) brains. Notably, these SNARE complexes were highly resistant to post-mortem degradation (up to 102 h), which revealed their high stability. The nature of these SNAREs was further assessed *in vitro* demonstrating the disassembly of both ternary complexes and the dynamic relationship with their components. The ~75 kDa SNARE complex was chosen for quantification in SZ because it was readily identified by the three SNARE antibodies (the ~110 kDa

SNARE was not detected with the anti-synaptobrevin antibody) and also because it most closely approximated the M_r (~ 72 kDa) of the expected heterotrimer (13 kDa synaptobrevin, 34 kDa syntaxin-1A, and 25 kDa SNAP-25). However, various SNAREs might be needed for fast vesicle fusion in synapses (Mohrmann *et al.* 2010). Since the synaptic core complex is formed by four SNARE motifs, two from SNAP-25 and one each from synaptobrevin and syntaxin (see Rizo & Südhof, 2002), the anti-SNAP-25 antibody was preferentially chosen for SNARE quantification. In addition, the anti-SNAP-25 antibody better revealed the enriched presence of the ~ 75 kDa SNARE complex in membrane fractions (high content), the expected subcellular localization of the complex. Under these experimental conditions, the ~ 75 kDa SNARE complex was not altered in PFC/BA 9 of antipsychotic-free SZ subjects, but exposure to antipsychotic drugs was associated with a reduced SNARE content. This SNARE down-regulation agrees well with the decreases of munc18-1a and synaptobrevin associated with antipsychotic medication in PFC/BA 9 of the same SZ subjects (see above). Interestingly, this ~ 75 kDa SNARE complex was normal in PFC/BA 9 of SD and MD subjects, indicating that suicide (SZ, SD, MD) and antidepressant treatment (MD) do not influence its expression in these disorders. These results contrast with previous SNARE studies, which reported increases (Honer *et al.* 2002) or decreases (Castillo *et al.* 2010) of different SNARE ternary complexes (110–150 kDa) in PFC of SZ subjects.

In the present study, the content of synaptophysin, a calcium-binding vesicular glycoprotein (not part of the SNARE complex) used as a marker of synaptic density and synaptogenesis (Calhoun *et al.* 1996), was unchanged in PFC/BA 9 of SZ subjects (regardless of antipsychotic exposure) confirming previous negative data on synaptophysin (protein and/or mRNA) in that cortical brain region (Eastwood *et al.* 2000; Scarr *et al.* 2006). However, lower synaptophysin contents were reported in other cortical and non-cortical brain regions of SZ subjects (Davidsson *et al.* 1999; Eastwood *et al.* 2000).

The discrepancies between post-mortem brain studies on the regulation of the exocytotic machinery in SZ (e.g. Behan *et al.* 2009; Castillo *et al.* 2010; Honer *et al.* 2002; present study) might be related, *inter alia*, to the heterogeneity among control and experimental subjects (race, gender, age), the existence of SZ diagnostic subtypes, the different brain areas analysed including subareas within the PFC, the different experimental approaches used including antibodies, the

number of experimental samples analysed, and the previous exposure to psychoactive drugs. Moreover, the long-term effects of antipsychotics on munc18-1 and SNARE proteins appear to be different in brains of SZ subjects and laboratory rats. For example, the content of munc18-1, syntaxin-1, SNAP-25, and/or synaptobrevin was similar in SZ subjects exposed and not exposed to antipsychotics (Barakauskas *et al.* 2010; Behan *et al.* 2009), but some of these presynaptic proteins (mRNA and/or protein) and phosphorylated syntaxin-1 were up-regulated or down-regulated in chronically antipsychotic-treated rats (Barakauskas *et al.* 2010; Barr *et al.* 2006; Castillo *et al.* 2010; Kontkanen *et al.* 2002; MacDonald *et al.* 2005). These contrasting findings of antipsychotic drugs in human and rat brains could be related to drug interactions with specific molecular dysfunctions in SZ that are not present in normal laboratory rats. In the present study, the comparison between antipsychotic-free ($n=11-12$) and antipsychotic-treated ($n=10-12$) subjects with SZ provided strong evidence that long-term exposure to these drugs is associated with down-regulation of munc18-1a, synaptobrevin and possibly syntaxin-1A, and consequently with decreased ~ 75 kDa SNARE complex in PFC/BA 9, which could result in a destabilization/impairment of neurosecretion. In marked contrast with SZ, subjects with MD (and regardless of antidepressant treatment) did not show any significant abnormality in the content of presynaptic proteins and ~ 75 kDa SNARE complex in PFC/BA 9, suggesting a normal functioning of the exocytotic machinery in MD (see Scarr *et al.* 2006 for changes of presynaptic proteins in bipolar I disorder).

In conclusion, the present study demonstrates that abnormalities in some components of the synaptic exocytotic machinery are involved in the pathogenesis of SZ. A potential imbalance of the interaction between proteins of the SNARE complex (mainly syntaxin-1A) and munc18-1a could underlie the cortical dysfunctions of glutamatergic and dopamine neurotransmission hypothesized in SZ. Furthermore, the down-regulation of munc18-1a and ~ 75 kDa SNARE complex associated with antipsychotic drugs opens the possibility of a new molecular target related to pharmacological activity of chronic antipsychotic treatment.

Note

Supplementary material accompanies this paper on the Journal's website (<http://journals.cambridge.org/pnp>).

Acknowledgements

This study was supported by grants SAF2008-01311 to J.A.G.-S. and SAF2009-08460 to J.J.M. (MICINN and FEDER, Madrid, Spain). The research was also funded by CIBERSAM, Intramural Research Program, P81 to L.U., and RETICS-RTA, RD06/001/003 to J.A.G.-S. (Instituto de Salud Carlos III, MSC and FEDER, Madrid). I.G.-P. was supported by a predoctoral fellowship from the Basque Government, E.M.-C. by CIBERSAM, and A.R.-M. by RETICS-RTA. We thank Dr Benito Morentin (Instituto Vasco de Medicina Legal, Bilbao) and Dr Romano La Harpe (Centre Universitaire de Médecine Légale–Site Genève, Genève) for providing the brain tissues and toxicology data for the study, and Mr Antonio J. Crespo for laboratory technical assistance. J.A. García-Sevilla is a member of the Institut d'Estudis Catalans (Barcelona, Catalonia, Spain).

Statement of Interest

None.

References

- APA** (1994). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, 4th edn. Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Barakauskas VE, Beasley CL, Barr AM, Ypsilanti AR, et al.** (2010). A novel mechanism and treatment target for presynaptic abnormalities in specific striatal regions in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **35**, 1226–1238.
- Barr AM, Young CE, Phillips AG, Honer WG** (2006). Selective effects of typical antipsychotic drugs on SNAP-25 and synaptophysin in the hippocampal trisynaptic pathway. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **9**, 457–463.
- Behan AT, Byrne C, Dunn MJ, Cagney G, et al.** (2009). Proteomic analysis of membrane microdomain-associated proteins in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder reveals alterations in LAMP, STXB1 and BASP1 protein expression. *Molecular Psychiatry* **14**, 601–613.
- Boronat MA, García-Fuster MJ, García-Sevilla JA** (2001). Chronic morphine induces up-regulation of the pro-apoptotic Fas receptor and down-regulation of the anti-apoptotic Bcl-2 oncoprotein in rat brain. *British Journal of Pharmacology* **134**, 1263–1270.
- Bozikas VP, Kosmidis MH, Kiosseoglou G, Karavatos A** (2006). Neuropsychological profile of cognitively impaired patients with schizophrenia. *Comprehensive Psychiatry* **47**, 136–143.
- Burgoyne RD, Barclay JW, Ciufo LF, Graham ME, et al.** (2009). The functions of munc18-1 in regulated exocytosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1152**, 76–86.
- Calhoun ME, Jucker M, Martin LJ, Thinakaran G, et al.** (1996). Comparative evaluation of synaptophysin-based methods for quantification of synapses. *Journal of Neurocytology* **25**, 821–828.
- Castillo MA, Ghose S, Tamminga CA, Ulery-Reynolds PG** (2010). Deficits in syntaxin 1 phosphorylation in schizophrenia prefrontal cortex. *Biological Psychiatry* **67**, 208–216.
- Davidsson P, Gottfries J, Bogdanovic N, Ekman R, et al.** (1999). The synaptic-vesicle-specific proteins rab3a and synaptophysin are reduced in thalamus and related cortical brain regions in schizophrenic brains. *Schizophrenia Research* **40**, 23–29.
- Deák F, Xu Y, Chang W-P, Dulubova I, et al.** (2009). Munc18-1 binding to the neuronal SNARE complex controls synaptic vesicle priming. *Journal of Cell Biology* **184**, 751–764.
- Deep-Soboslay A, Akil M, Martin CE, Bigelow LB, et al.** (2005). Reliability of psychiatric diagnosis in postmortem research. *Biological Psychiatry* **57**, 96–101.
- De Wit H** (2010). Molecular mechanism of secretory vesicle docking. *Biochemical Society Transactions* **38**, 192–198.
- Dulubova I, Khvotchev M, Liu S, Huryeva I, et al.** (2007). Munc18-1 binds directly to the neuronal SNARE complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **104**, 2697–2702.
- Eastwood SL, Cairns NJ, Harrison PJ** (2000). Synaptophysin gene expression in schizophrenia. *British Journal of Psychiatry* **176**, 236–242.
- Eisenberg DP, Berman KF** (2010). Executive function, neural circuitry, and genetic mechanisms in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **35**, 258–277.
- Fujiwara T, Snada M, Kofuji T, Yoshikawa T, et al.** (2010). HPC-1/syntaxin 1A gene knockout mice show abnormal behavior possibly related to a disruption in 5-HTergic systems. *European Journal of Neuroscience* **32**, 99–107.
- Fuster JM** (2001). The prefrontal cortex – an update: time is of the essence. *Neuron* **30**, 319–333.
- Gabriel SM, Haroutunian V, Powchick P, Honer WG, et al.** (1997). Increased concentrations of presynaptic proteins in the cingulate cortex of subjects with schizophrenia. *Archives of General Psychiatry* **54**, 559–566.
- García-Fuster MJ, Ramos-Miguel A, Rivero G, La Harpe R, et al.** (2008). Regulation of the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in the prefrontal cortex of short- and long-term human opiate abusers. *Neuroscience* **157**, 105–119.
- Gawryluk JW, Wang J-F, Andreatza AC, Shao L, et al.** (2011). Decreased levels of glutathione, the major brain antioxidant, in post-mortem prefrontal cortex from patients with psychiatric disorders. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **14**, 123–130.
- Gerber SH, Rah JC, Min SW, Liu X, et al.** (2008). Conformational switch of syntaxin-1 controls synaptic vesicle fusion. *Science* **321**, 1507–1510.
- Goldman-Rakic PS, Selemon LD** (1997). Functional and anatomical aspects of prefrontal pathology in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* **23**, 437–458.

- González-Maeso J, Torre I, Rodríguez-Puertas R, García-Sevilla JA, et al.** (2002). Effects of age, postmortem delay and storage time on receptor-mediated activation of G proteins in human brain. *Neuropsychopharmacology* **26**, 468–478.
- Grange-Midroit M, García-Sevilla JA, Ferrer-Alcón M, La Harpe R, et al.** (2002). G protein-coupled receptor kinases, β -arrestin-2 and associated regulatory proteins in the human brain: postmortem changes, effect of age and subcellular distribution. *Molecular Brain Research* **101**, 39–51.
- Gulyás-Kovács A, de Wit H, Milosevic I, Kochubey O, et al.** (2007). Munc18-1: sequential interaction with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. *Journal of Neuroscience* **27**, 8676–8686.
- Halim ND, Weickert CS, McClintock BW, Hyde TM, et al.** (2003). Presynaptic proteins in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia and rats with abnormal prefrontal development. *Molecular Psychiatry* **8**, 797–810.
- Han GA, Malintan NT, Collins BM, Meunier FA, et al.** (2010). Munc18-1 as a key regulator of neurosecretion. *Journal of Neurochemistry* **115**, 1–10.
- Hata Y, Slaughter CA, Südhof TC** (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* **366**, 347–351.
- Hata Y, Südhof TC** (1995). A novel ubiquitous form of munc-18 interacts with multiple syntaxins. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 13022–13028.
- Hayashi T, McMahon H, Yamasaki S, Binz T, et al.** (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO Journal* **13**, 5051–5061.
- Honea R, Crow TJ, Passingham D, Mackay CE** (2005). Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometric studies. *American Journal of Psychiatry* **162**, 2233–2245.
- Honer WG, Falkai P, Bayer TA, Xie J, et al.** (2002). Abnormalities of SNARE mechanism proteins in anterior frontal cortex in severe mental illness. *Cerebral Cortex* **12**, 349–356.
- Honer WG, Falkai P, Young C, Wang T, et al.** (1997). Cingulate cortex synaptic terminal proteins and neural cell adhesion molecule in schizophrenia. *Neuroscience* **78**, 99–110.
- Hu S-H, Christie MP, Saez NJ, Latham CF, et al.** (2011). Possible roles for Munc18-1 domain 3a and Syntaxin1 N-peptide and C-terminal anchor in SNARE complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **108**, 1040–1045.
- Jablensky A** (1997). The 100-year epidemiology of schizophrenia. *Schizophrenia Research* **28**, 111–125.
- Jahn R** (2000). Sec1/Munc18 proteins: mediators of membrane fusion moving to center stage. *Neuron* **27**, 201–204.
- Johnson RD, Oliver PL, Davies KE** (2008). SNARE proteins and schizophrenia: linking synaptic and neurodevelopmental hypotheses. *Acta Biochimica Polonica* **55**, 619–628.
- Kontkanen O, Törönen P, Lakso M, Wong G, et al.** (2002). Antipsychotic drug treatment induces differential gene expression in the rat cortex. *Journal of Neurochemistry* **83**, 1043–1053.
- Li JZ, Vawter MP, Walsh DM, Tomita H, et al.** (2004). Systematic changes in gene expression in postmortem human brains associated with tissue pH and terminal medical conditions. *Human Molecular Genetics* **13**, 609–616.
- MacDonald ML, Eaton ME, Dudman JT, Konradi C** (2005). Antipsychotic drugs elevate mRNA levels of presynaptic proteins in the frontal cortex of the rat. *Biological Psychiatry* **57**, 1041–1051.
- Malsam J, Kreye S, Söllner TH** (2008). Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cell Molecular Life Sciences* **65**, 2814–2832.
- Marek GJ, Behl B, Bespalov AY, Gross G, et al.** (2010). Glutamatergic (N-methyl-D-aspartate receptor) hypofrontality in schizophrenia: too little juice or a miswired brain? *Molecular Pharmacology* **77**, 317–326.
- Martins-de-Souza D, Maccarrone G, Wobrock T, Zerr I, et al.** (2010). Proteome analysis of the thalamus and cerebrospinal fluid reveals glycolysis dysfunction and potential biomarkers candidates for schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* **44**, 1176–1189.
- Miller EK, Cohen JD** (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annual Review of Neuroscience* **24**, 167–202.
- Mohrmann R, de Wit H, Verhage M, Neher E, et al.** (2010). Fast vesicle fusion in living cells requires at least three SNARE complexes. *Science* **330**, 502–505.
- Murthy VN, De Camilli P** (2003). Cell biology of the presynaptic terminal. *Annual Review of Neuroscience* **26**, 701–728.
- Otto H, Hanson PI, Jahn R** (1997). Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **94**, 6197–6201.
- Rajkowska G, Goldman-Rakic PS** (1995). Cytoarchitectonic definition of prefrontal areas in the normal human cortex: II. Variability in locations of areas 9 and 46 and relationship to the Talairach Coordinate System. *Cerebral Cortex* **5**, 323–337.
- Ramos-Miguel A, García-Fuster MJ, Callado LF, La Harpe R, et al.** (2009). Phosphorylation of FADD (Fas-associated death domain protein) at serine 194 is increased in the prefrontal cortex of opiate abusers: Relation to mitogen activated protein kinase, phosphoprotein enriched in astrocytes of 15 kDa, and Akt signaling pathways involved in neuroplasticity. *Neuroscience* **161**, 23–38.
- Rathore SS, Bend EG, Yu H, Hammarlund M, et al.** (2010). Syntaxin N-terminal peptide motif is an initiation factor for the assembly of the SNARE-Sec1/Munc18 membrane fusion complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **107**, 22399–22406.
- Rickman C, Duncan RR** (2010). Munc18/Syntaxin interaction kinetics control secretory vesicle dynamics. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 3965–3972.

- Rizo J, Rosenmund C** (2008). Synaptic vesicle fusion. *Nature Structural Molecular Biology* **15**, 665–674.
- Rizo J, Südhof TC** (2002). Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nature Reviews Neuroscience* **3**, 641–653.
- Scarr E, Gray L, Keriakous D, Robinson PJ, et al.** (2006). Increased levels of SNAP-25 and synaptophysin in the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar I disorder. *Bipolar Disorder* **8**, 133–143.
- Sharma VM, Shareef MM, Bhaskar K, Kalidas S, et al.** (2005). Nuclear localization of Munc18-1 (p67) in the adult rat brain and PC12 cells. *Neurochemical International* **47**, 225–234.
- Sokolov BP, Tcherepanov AA, Haroutunian V, Davis KL** (2000). Levels of mRNAs encoding synaptic vesicle and synaptic plasma membrane proteins in the temporal cortex of elderly schizophrenic patients. *Biological Psychiatry* **48**, 184–196.
- Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, et al.** (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* **75**, 409–418.
- Stan AD, Ghose S, Gao XM, Roberts RC, et al.** (2006). Human postmortem tissue: What quality markers matter? *Brain Research* **1123**, 1–11.
- Südhof TC** (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annual Review of Neuroscience* **27**, 509–547.
- Südhof TC, Rothman JE** (2009). Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* **323**, 474–477.
- Südhof TC, Starke K (eds)** (2008). *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 184. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Swanson DA, Steel JM, Valle D** (1998). Identification and characterization of the human ortholog of rat STXBP1, a protein implicated in vesicle trafficking and neurotransmitter release. *Genomics* **48**, 373–376.
- Toonen RFG, de Vries KJ, Zalm R, Südhof TC, et al.** (2005). Munc18-1 stabilizes syntaxin 1, but is not essential for syntaxin 1 targeting and SNARE complex formation. *Journal of Neurochemistry* **93**, 1393–1400.
- Toonen RFG, Verhage M** (2007). Munc18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control. *Trends in Neurosciences* **30**, 564–572.
- Urigüen L, García-Fuster MJ, Callado LF, Morentin B, et al.** (2009). Immunodensity and mRNA expression of A_{2A} adenosine, D₂ dopamine, and CB₁ cannabinoid receptors in postmortem frontal cortex of subjects with schizophrenia: effect of antipsychotic treatment. *Psychopharmacology* **206**, 313–324.
- Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, et al.** (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* **287**, 864–869.
- Voets T, Toonen RF, Brian EC, de Wit H, et al.** (2001). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* **31**, 581–591.
- Wong AH, Trakalo J, Likhodi O, Yisuf M, et al.** (2004). Association between schizophrenia and syntaxin 1A gene. *Biological Psychiatry* **56**, 24–29.
- Xu Y, Su L, Rizo J** (2010). Binding of Munc18-1 to synaptobrevin and to the SNARE four-helix bundle. *Biochemistry* **49**, 1568–1576.

Behavioral, neurochemical and morphological changes induced by the overexpression of munc18-1a in brain of mice: relevance to schizophrenia

L Urigüen^{1,2,3}, I Gil-Pisa^{1,2}, E Munarriz-Cuezva^{1,2}, E Berrocoso^{1,4}, J Pascau^{1,5}, ML Soto-Montenegro^{1,5}, A Gutiérrez-Adán⁶, B Pintado⁶, JLM Madrigal^{1,7}, E Castro^{1,8}, P Sánchez-Blázquez^{1,9}, JE Ortega^{1,2,3}, MJ Guerrero¹⁰, M Ferrer-Alcon¹⁰, JA García-Sevilla¹¹, JA Mico^{1,4}, M Desco^{1,5,12}, JC Leza^{1,7}, Á Pazos^{1,8}, J Garzón^{1,9} and JJ Meana^{1,2,3}

Overexpression of the mammalian homolog of the unc-18 gene (munc18-1) has been described in the brain of subjects with schizophrenia. Munc18-1 protein is involved in membrane fusion processes, exocytosis and neurotransmitter release. A transgenic mouse strain that overexpresses the protein isoform munc18-1a in the brain was characterized. This animal displays several schizophrenia-related behaviors, supersensitivity to hallucinogenic drugs and deficits in prepulse inhibition that reverse after antipsychotic treatment. Relevant brain areas (that is, cortex and striatum) exhibit reduced expression of dopamine D₁ receptors and dopamine transporters together with enhanced amphetamine-induced *in vivo* dopamine release. Magnetic resonance imaging demonstrates decreased gray matter volume in the transgenic animal. In conclusion, the mouse overexpressing brain munc18-1a represents a new valid animal model that resembles functional and structural abnormalities in patients with schizophrenia. The animal could provide valuable insights into phenotypic aspects of this psychiatric disorder.

Translational Psychiatry (2013) 3, e221; doi:10.1038/tp.2012.149; published online 22 January 2013

Introduction

Schizophrenia is a chronic and disabling psychiatric disorder that affects about 1% of the population worldwide. Symptoms of schizophrenia include positive, negative and cognitive deficits.¹ The hypothesis that dopaminergic mechanisms play an important role in the pathophysiology of schizophrenia has been one of the most accepted ideas about the disease.² In addition, *in vivo* neuroimaging studies have demonstrated reduced gray matter volume in patients with schizophrenia.^{3,4} Although the processes involved in the development of schizophrenia remain unclear, it has been suggested that dysfunctions in neuroexocytosis could be a key point in the pathophysiology of the disorder.⁵

The proteins responsible for the mechanism of membrane fusion and neurotransmitter release (SNAP-25, syntaxin-1A and synaptobrevin) form the SNARE (soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors).⁶ Munc18-1 interacts with syntaxin-1A and other SNARE proteins, and influences all of the steps leading to exocytosis, including vesicle recruitment, docking and membrane fusion.^{7,8} It has been proposed that abnormalities of munc18-1 and/or SNARE proteins might participate in the pathogenesis of schizophrenia underlying dysfunctional neuroexocytosis.^{5,9} Thus, proteomic studies in postmortem

prefrontal cortex of subjects with schizophrenia have shown increases of munc18-1 in membrane microdomains of the gray matter.¹⁰ Moreover, antipsychotic treatment seems to be associated with a lower content of key proteins of the exocytotic machinery, which could result in a destabilization/impairment of neuroexocytosis.¹¹

Alternative splicing of the gene coding for munc18-1 results in two variants, the long isoform (munc18-1a, brain and retina) and the ubiquitous short isoform (munc18-1b).^{12,13}

A wide number of animal models of schizophrenia have been developed¹⁴ in an effort to reproduce one or more of the symptoms observed in humans. Animal models represent a very useful tool for the study of the mechanisms underlying schizophrenia-like behaviors and for the evaluation of the therapeutic efficacy of antipsychotics.^{14,15} In this context, a transgenic mouse overexpressing the isoform munc18-1a protein was developed to assess whether abnormalities of exocytosis machinery could lead to emergence of schizophrenic phenotypes.

Materials and methods

All animal studies were performed in accordance with the European Directive for the Protection of Vertebrate Animals

¹Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental CIBERSAM, Spain; ²Department of Pharmacology, University of the Basque Country UPV/EHU Leioa, Bizkaia, Spain; ³BioCruces Health Research Institute, Bizkaia, Spain; ⁴Department of Neuroscience, University of Cádiz, Cádiz, Spain; ⁵Department of Experimental Medicine and Surgery, General Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain; ⁶Department of Animal Reproduction, INIA, Madrid, Spain; ⁷Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain; ⁸Department of Physiology and Pharmacology, University of Cantabria, Institute of Biomedicine and Biotechnology of Cantabria IBBTEC), Santander, Spain; ⁹Cajal Institute, CSIC, Madrid, Spain; ¹⁰Brainco Biopharma, SL, Derio, Bizkaia, Spain; ¹¹Neuropharmacology Laboratory, IUNICS, University of Balearic Islands, Palma de Mallorca and Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud, Red de Trastornos Adictivos (RETICS-RTA), Spain and ¹²Department of Bioengineering and Aerospace Engineering, Carlos III University, Madrid, Spain

Correspondence: Dr JJ Meana, Department of Pharmacology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Leioa, Bizkaia 48940, Spain.

E-mail: javier.meana@ehu.es

Keywords: Munc18-1a; PPI; schizophrenia; SNARE

used for experimental and Other Scientific Purposes (European Union Directive #86/606/EEC). All animals were 3- to 6-month-old males.

Generation of the transgenic animal. Animals were created by pronuclear microinjection to C57BL6/CBA embryos.¹⁶ A sequence of 2848 nucleotides from the GTRAP3-18 promoter was amplified by PCR and cloned using the *KpnI*–*SalI* sites, in the right anterior position of human Munc18-1a cDNA (NIH_MGC_94), in the pCMV-Sport6 commercial vector. The construct was digested and the transgene microinjected in mouse embryo. This transgene fragment, in addition to the GTRAP3-18 promoter and the cDNA sequence for Munc18-1a (clone IRAVp968D0260D, www.imagenes-bio.de), contained a SV40 polyadenylation site for mRNA stabilization. Four transgenic founders were produced and in three of them (lines L3, L7 and L8), the transgene was Mendelian fashion transmitted. Immunoblotting analysis showed that line L8 did not display increased expression of munc18-1a (Supplementary Figure S1) while line L3 presented impaired breeding. After initial animal characterization of the three lines (data not shown), line L7 (termed as Munc18-OE) was selected for further assays.

Quantitative real-time PCR. QRT–PCR was performed with a StepOne™ thermocycler using a TaqMan™ assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) specifically designed for recognizing munc18-1a. Data were analyzed with the StepOne™ Software v2.1 (Applied Biosystems). This procedure has been described earlier.¹⁷

In situ hybridization. Sections (20 μm) were thaw mounted onto slides and pre-treated using a protocol previously described.¹⁸ An oligonucleotide complementary to mouse munc18-1a mRNA was labeled with [³⁵S]dATP. After incubation with the labeled probe, slides were washed, air dried and exposed to films together with ¹⁴C microscapes at –20 °C for 4 weeks. Experiments were quantified using Scion Image system (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

Immunoblotting. Immunoblotting procedures were carried out as described earlier.¹⁹ Briefly, electrophoresis was carried out and membranes were incubated with specific antibodies (Supplementary Table S1). Later, the membranes were incubated with the respective secondary antibodies, visualized on X-ray film by chemiluminescence and quantified by densitometry.

Immunofluorescence. The brains were fixed by transcardial perfusion (4% paraformaldehyde) and cryoprotected in 30% sucrose. The sections (30 μm) were blocked and incubated at 4 °C with anti-munc18-1a antibody. Sections were washed and incubated with the secondary antibody. Fluorescence microscopic analyses were performed with a Nikon microscope (Kanagawa, Japan). Twenty different fluorescence images were carried out in each mouse. Gray intensities in arbitrary units were measured in each image.

Novelty-induced hyperactivity. Mice were placed individually in the center of an open field and spontaneous locomotion was evaluated for 105 min with a computerized video-tracking system (SMART, PanLab, Spain).

DOI-induced head-twitch. Mice were injected with 1 mg kg^{–1} i.p. of DOI (2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine) and, 5 min after injection, recorded for 10 min.²⁰ Subsequent head-twitch response (HTR) was scored.

Elevated plus maze. Mice were individually placed in the maze and time spent in open-arms and number of entries to open-arms were evaluated for 5 min.²¹

Social interaction. Pairs of mice from different home-cages were placed together and the time that mice socially interact was measured for 5 min.²¹

Novel object recognition test. Animals were given two sample sessions and one test trial. In sample 1, the animal was allowed 5 min to explore four identical novel objects (object A) arranged in a triangular shape. In sample 2, the animal explored four new identical objects (object B) arranged in a rectangular shape. Finally, the animal was given a test trial in which two copies of object B were placed as in sample 2, one copy of object A was placed as it had been in sample 1, and one copy of object A was newly located. Exploration was recorded and scored for investigation time of each object in both sample and test sessions.

Prepulse inhibition of the startle reflex. Mice were placed in a startle chamber (PanLab, Spain) and then subjected to a pseudo randomized combination of: (1) 10 pulse-alone trials consisted of a single white noise burst; (2) 10 prepulse-alone trials for each prepulse intensity; (3) 10 prepulse–pulse trials for each prepulse intensity; (4) 10 presentations of no stimulus trial, in which only the background noise was presented. Prepulse inhibition (PPI) was calculated as a percentage score: %PPI = [100 – (startle response to prepulse + pulse trial)/(startle response to pulse-alone trial)] × 100.

Amphetamine-induced behavioral sensitization. Mice were injected with amphetamine (5 mg kg^{–1}, i.p.) and spontaneous locomotion was evaluated with a computerized video-tracking system (SMART, PanLab) for 105 min after injection.

In vivo microdialysis and chromatographic analysis. Animals were anesthetized and placed in a Kopf stereotaxic frame. Intracerebral probes (Cuprophan 2 mm membrane) were implanted in the striatum (coordinates AP +1.2 mm, L +1.5 mm, DV –3.2 mm) or in the prefrontal cortex (AP +2.0 mm, L +0.3 mm, DV –3.4 mm)²² and fixed to the skull. The next day, mice were connected to a fraction collection system for freely moving animals.²³ Basal values were obtained by no-net-flux method and response to amphetamine (5 mg kg^{–1} i.p.) was calculated over basal values. Dopamine (DA) concentrations were measured by HPLC coupled to an electrochemical detector.

Caspase-3. Caspase-3 activity was measured by cleaving the selective substrate Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AFC (Biomol International, Plymouth Meeting, PA, USA). Brain cortex was homogenized and centrifuged, and samples were incubated in a total volume of 100 μ l comprised of 80 μ l detection buffer. After incubation, cleavage of the substrate was detected measuring fluorescence with a Fluoroscan Ascent reader (Labsystems, Waltham, MA, USA).

Lipid peroxidation. Brain cortex was sonicated and deproteinized with 40% trichloroacetic acid and 5 M HCl, followed by the addition of 2% thiobarbituric acid in 0.5 M NaOH. The reaction mixture was heated at 90 °C for 15 min and centrifuged at 12 000 \times g for 10 min. The pink chromogen was measured at 532 nm in a Beckman DU-7500 spectrophotometer (Beckman Coulter, CA, USA).

Volumetric study of gray matter. Animals were anesthetized with sevoflurane (4% for induction and 2% for maintenance in 100% O₂). Images were acquired with a Bruker 7/210 USR MRI scanner (Bruker Instruments, Billerica, MA, USA). A T2-weighted spin echo sequence was acquired with the following parameters: 256 \times 256 matrix size covering a field of view of 20 mm, repetition time 3100 s, echo time 35 ms, 37 slices with slice thickness 0.4 mm. Cerebral gray matter differences between groups were studied applying VBM (voxel-based morphometry) methodology with SPM5 software package (Statistical Parametric Mapping, Wellcome Department of Cognitive Neurology, London, UK). Tissue probabilities maps, created with wild-type (WT) and R6/2 transgenic c57 mice, were provided by the author of the spmmouse extension.²⁴ VBM statistical analysis consisted of a Student's *t*-test, with the gray matter volume as a covariate, and FDR (false discovery rate) correction for multiple comparisons. Significant results were accepted for $P < 0.01$ (corrected for FDR) and a minimum cluster size of 200 voxels.

Data analyses and statistics. Data were analyzed with GraphPad Prism™ 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), except for volumetric assay of gray matter. Results are expressed as mean \pm s.e.m. values. Data were analyzed by using unpaired Student's *t*-test, one-way or two-way analysis of variance tests followed by Bonferroni *post hoc* test for multiple comparisons. The level of significance was set to $P < 0.05$. All tests were two tailed.

Results

Selective overexpression of munc18-1a in the brain of transgenic mice. Munc18-1a expression was driven by the GTRAP3-18 promoter, which regulates EAAT3, a neuronal product expressed in glutamatergic and GABAergic neurons.^{25,26} Increased expression of munc18-1a was observed in the brain cortex of the transgenic Munc18-OE mice by QRT-PCR (Figure 1a). An anatomical distribution of the mRNA encoding for munc18-1a protein was observed by *in situ* hybridization through different structures of the mouse brain. The specificity of munc18-1a mRNA labeling was demonstrated by the displacement with unlabeled oligonucleotide (Figure 1bA, B and C). Thus, strong hybridization

signals were observed in the cerebellum. Intermediate signals were detected over piriform cortex and, at a lesser extent, in hippocampus (CA1, CA3 and dentate gyrus) and some cortical areas such as entorhinal cortex (Figure 1bA, B and C). Using this technical approach, a significant increase in the munc18-1a mRNA labeling was observed in cerebellum and piriform and entorhinal cortex of Munc18-OE when compared with WT control animals (Figure 1c). Munc18-1a protein immunodensity increased in the brain cortex of Munc18-OE mice (Figure 1d) while munc18-1b did not change (Figure 1e). Enhanced munc18-1a protein immunofluorescence (Figure 1f) was found in cortex, hippocampus and cerebellum of the Munc18-OE mice (Figure 1g).

SNARE complex components. Neurotransmission processes are subjected to the control of exocytosis machinery, in which SNARE complex proteins play the key role.²⁷ Syntaxin-1A, SNAP-25 and synaptobrevin, as well as synaptotagmin, did not change in the brain cortex of Munc18-OE mice. Stable heterotrimeric SNARE complexes in cortex showed no differences between Munc18-OE and WT controls (Supplementary Figure S2).

Schizophrenia-related phenotype. Munc18-OE and age- and sex-matched WT controls were subjected to a battery of tests for investigating schizophrenia-related behaviors. Munc18-OE mice spent less time exploring the center (Figure 2a) and more time the periphery (Figure 2b) of the open-field, consistent with an anxiety-like phenotype. In the novelty-induced hyperactivity test, the Munc18-OE mice exhibited increased locomotor activity during the first 5 min, which is described as a schizophrenic-like behavior^{15,28} (Figure 2c). No differences were found in the holeboard test for exploratory behavior (Supplementary Figure S3a) or in the rotarod test for motor coordination (Supplementary Figure S3b). In the elevated plus-maze test, Munc18-OE mice spent less time in the open-arms (Figure 2d) while decreased the number of entries to the open-arms (Figure 2e). These results reveal a high grade of aversion to unprotected spaces displayed by the Munc18-OE mice, which could mimic some of the negative symptoms of schizophrenia.

Deficits in social functioning represent a core negative symptom in schizophrenia and provide a quantifiable 'negative symptom-like' behavior in animal models.^{14,15,29} Munc18-OE mice showed a decrease in social interaction (Figure 2f). There were no changes in immobility time in the forced swim test in Munc18-OE mice (Supplementary Figure S3c), suggesting the absence of depressive-like symptoms.

Serotonin 5HT_{2A} hallucinogenic drugs induce a quantifiable HTR in rodents that is not induced by non-hallucinogenic 5HT_{2A} agonists. There are data supporting the HTR as a valid behavioral proxy of positive symptoms of psychosis in mice.³⁰ Munc18-OE mice exhibited an increased HTR to administration of the hallucinogen 5HT_{2A} agonist drug DOI (Figure 2g) when compared with WT controls.

Memory deficits in Munc18-OE mice were investigated by testing the animals on an episodic memory task for objects ('what'), their locations ('where') and the order in which they were experienced ('when') (Figure 2h). Munc18-OE mice

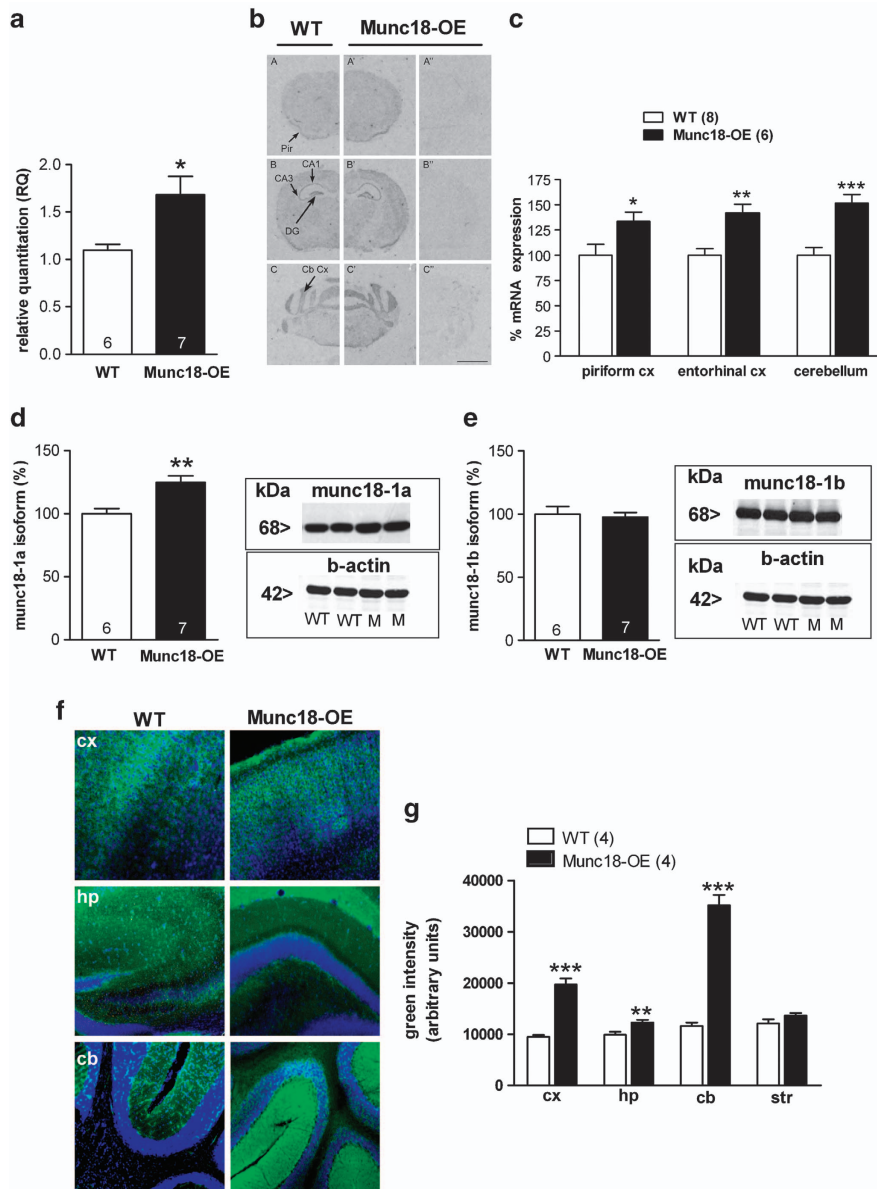


Figure 1 Characterization of Munc18-OE transgenic mice. **(a)** Quantitative real-time PCR study showed significant increased mRNA levels of munc18-1a in the brain cortex of Munc18-OE mice (unpaired *t*-test $*P < 0.05$ versus wild-type (WT) controls). **(b)** Representative autoradiograms showing the distribution of munc18-1a mRNA in coronal sections of WT controls (A, B, C) and transgenic Munc18 mice (A', B', C'). The specificity labeling was demonstrated by the displacement with unlabeled oligonucleotide (A'', B'', C''). Note the increase of mRNA signal in cerebellum and piriform cortex. Pir, piriform cortex; CA1, CA1 field of hippocampus; CA3, CA3 field of hippocampus; DG, dentate gyrus; CB Cx, Cerebellum cortex. Bar: 2 mm. **(c)** Expression of mRNA encoding for munc18-1a in Munc18-OE and WT control mice evaluated by *in situ* hybridization. Significant increases of munc18-1a mRNA levels were obtained in different brain regions of Munc18-OE (unpaired *t*-test $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ and $***P < 0.005$ versus WT control group). **(d)** Increased immunodensity of munc18-1a protein in the brain cortex of Munc18-OE mice (unpaired *t*-test $**P < 0.005$ versus WT controls). Representative immunoblots of munc18-1a and β -actin in WT controls and Munc18-OE mice. **(e)** As a negative control, no differences were found in munc18-1b protein expression between Munc18-OE and WT controls. **(f)** Representative images of munc18-1a distribution in WT (left panels) and Munc18-OE (right panels) at $10\times$, green (munc18-1a) and blue (nuclei) in cortex (cx), hippocampus (hp) and cerebellum (cb). **(g)** Increased immunofluorescence in different brain areas of Munc18-OE mice (unpaired *t*-test $**P < 0.005$ and $***P < 0.0001$ versus WT controls); cx, cortex; hp, hippocampus; cb, cerebellum; str, striatum. Data are mean \pm s.e.m.; the number of animals is indicated in parentheses or inside plot bars.

exhibited significant lower score in the memory for 'what'. Moreover, a significant decrease in score for 'where' memory was also found in Munc18-OE mice as well as in 'when' memory. These data suggest alterations in recognition memory processes, which have been described to be disrupted in schizophrenia.³¹ No differences were found in

the Morris water-maze test (Supplementary Figure S3d), indicating that spatial memory is not affected in these transgenic animals.

Since PPI deficits have been reported in schizophrenia patients,³² Munc18-OE and WT mice were subjected to the PPI test in order to evaluate sensorimotor gating processes.

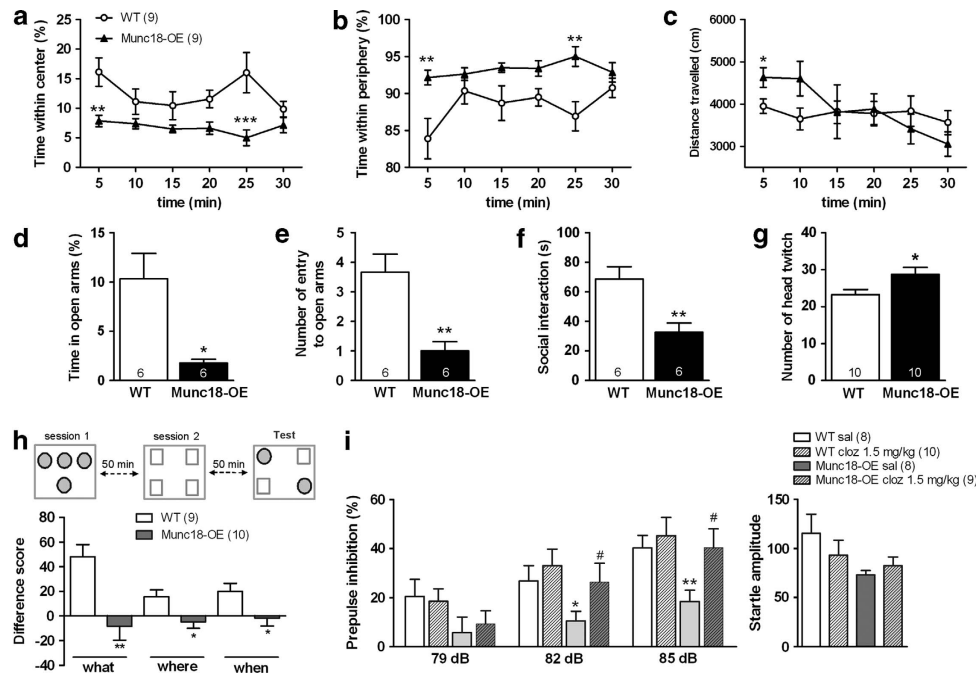


Figure 2 Overexpression of munc18-1a leads to schizophrenia-related behaviors. (a, b) Decreased central locomotion following exposure to a novel environment and increased exploration of the peripheral area in Munc18-OE transgenic mice (repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post hoc* test, $^{**}P < 0.01$ and $^{***}P < 0.001$ versus wild-type (WT) controls). (c) Increased locomotor activity of the transgenic mice during the first 5 min in novelty-induced hyperactivity test (unpaired *t*-test $^{*}P < 0.05$ versus WT controls). No differences between Munc18-OE and WT controls were found in total distance traveled in open field. (d) Munc18-OE mice displayed anxiety-like behavior in the elevated plus maze, as shown by the decreased time in open-arms (unpaired *t*-test $^{*}P < 0.05$ versus WT controls) and the decreased number of entries into open-arms (e) (unpaired *t*-test $^{**}P < 0.01$ versus WT) (f) The social interaction test revealed decreased time of interaction elicited by transgenic Munc18-OE mice (unpaired *t*-test $^{**}P < 0.01$ versus WT controls). (g) Increased sensitivity to hallucinogenic-like action in Munc18-OE mice as shown by the increased number of head-twitch responses to DOI (1 mg kg⁻¹, i.p.) administration (unpaired *t*-test $^{*}P < 0.05$ versus WT controls). (h) Transgenic Munc18-OE mice exhibited altered episodic memory as shown in the novel-object recognition test. Decreased score in memory for objects (what), their locations (where), and the order in which they were experienced (when) (unpaired *t*-test $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.005$ versus WT controls). (i) Munc18-OE mice showed impaired prepulse inhibition (PPI) of the acoustic startle reflex across prepulse intensities (two-way analysis of variance (ANOVA) $^{***}P < 0.001$ for genotype factor; unpaired *t*-test $^{*}P < 0.05$ and $^{**}P < 0.005$ versus WT controls). Impairment of the PPI was completely reversed in the transgenic mice after clozapine (1.5 mg kg⁻¹, i.p.) administration (unpaired *t*-test $^{#}P < 0.05$ versus transgenic animals with saline). No differences were found in the startle amplitude between Munc18-OE and WT controls. Data are mean \pm s.e.m.; the number of animals is indicated in parentheses or inside the plot bars.

Munc18-OE mice exhibited a significant decrease in the PPI of the acoustic startle reflex at different intensities (Figure 2i), while no differences were found in the startle amplitude between transgenic Munc18-OE and WT controls. Acute clozapine (1.5 mg kg⁻¹ i.p.) reversed the PPI deficits in Munc18-OE mice while exerted no changes in WT controls (Figure 2i).

Dopaminergic system alterations. DA signaling dysregulation has been proposed as a crucial component of the pathophysiology of schizophrenia.² D₁ receptor density decreased in both cortex and striatum of Munc18-OE mice (Figure 3a) while D₂ receptor density did not change (Figure 3b). Similar alterations of D₁ and integral components of its signal transduction pathways have been found in patients with schizophrenia.^{33,34} The DA membrane transporter (DAT) is a critical regulator of DA neurotransmission in the brain. Due to the difficulty of DAT immunodetection in cortical regions, striatal DAT was evaluated and a strong decrease was found in Munc18-OE mice (Figure 3c). These data are in accordance with those studies reporting an *in vivo* decrease of DAT in patients with schizophrenia.³⁵ This decrease of DAT suggests that intracellular pools

of DA would probably be altered. Therefore, TH (tyrosine hydroxylase) was evaluated and results showed increased density in both cortex and striatum of Munc18-OE mice (Figure 3d). Basal extracellular concentrations of DA in both regions were no different between Munc18-OE mice and their controls. However, administration of a single dose of amphetamine (5 mg kg⁻¹ i.p.) induced an enhanced locomotor hyperactivity (Figure 3e) and higher increase of extracellular DA in both prefrontal cortex (Figure 3f) and striatum (Figure 3g) of Munc18-OE when compared with WT controls. Similar supersensitivity to amphetamine-induced increase of DA release has been described in schizophrenic patients when evaluated by *in vivo* neuroimaging.³⁶

Glutamate receptors. Abnormalities in glutamate neurotransmission have been implicated in major psychiatric disorders such as schizophrenia.³⁷ No changes of mGluR2 and mGluR3 receptors (Supplementary Figure S4a), AMPAR1, AMPAR2/3/4 (Supplementary Figure S4b), NR1 and NR2A (Supplementary Figure S4c) protein subunits were found in the brain cortex of Munc18-OE mice. No changes of the glutamate signaling activation protein PSD95 were observed (Supplementary Figure S4d). Src, a kinase

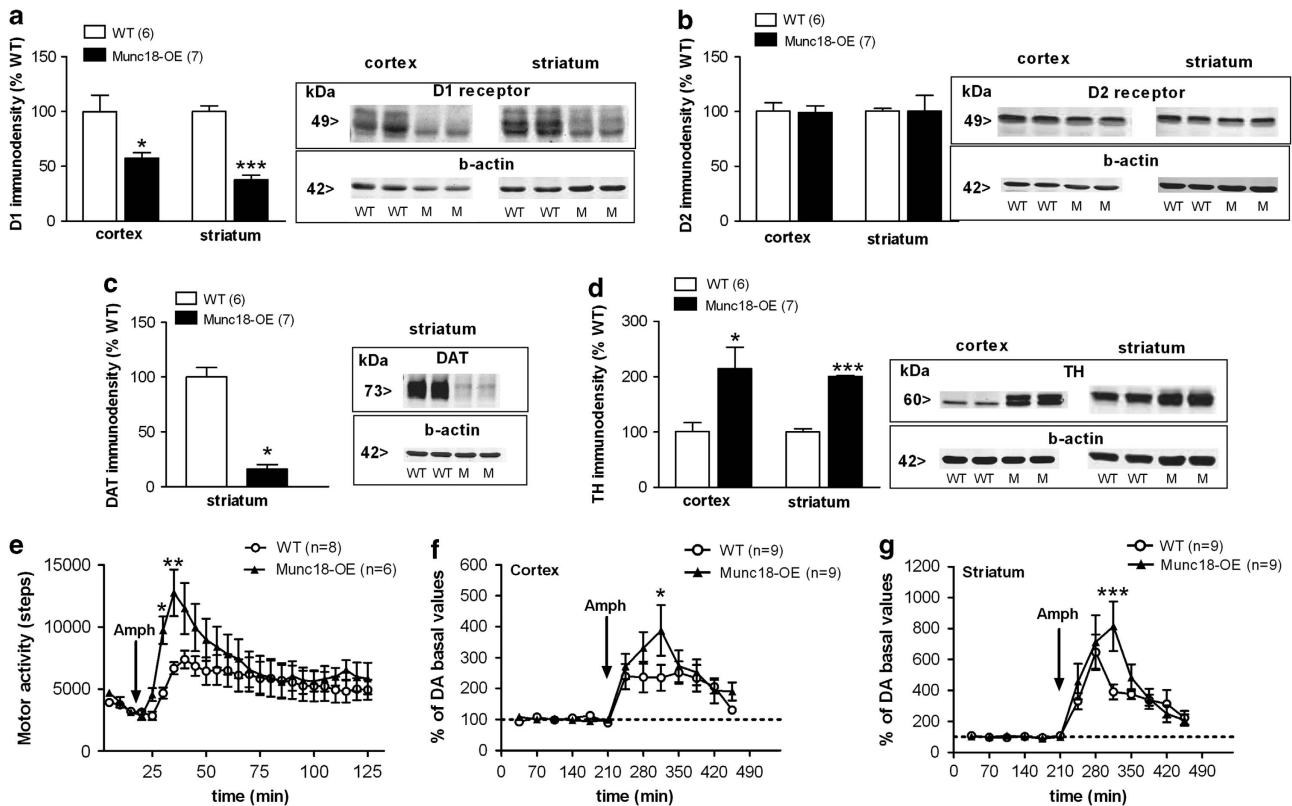


Figure 3 Alterations of dopaminergic system components. (a) Munc18-OE mice displayed decreased dopamine D₁ receptor density versus wild-type (WT) controls in both cortical and striatal brain regions (unpaired *t*-test $*P < 0.05$ and $**P < 0.0001$ versus WT controls). Representative immunoblots of dopamine D₁ receptor and β -actin in WT controls and Munc18-OE mice. (b) No differences were observed in dopamine D₂ receptor immunodensity between transgenic Munc18-OE and WT control mice. (c) Striatal dopamine transporter (DAT) was strongly decreased in Munc18-OE mice (unpaired *t*-test $*P < 0.001$ versus WT controls). Representative immunoblots of DAT and β -actin in WT controls and Munc18-OE mice. (d) Munc18-OE mice exhibited an increase of the dopamine synthesizing enzyme tyrosine hydroxylase (TH) in both cortex and striatum (unpaired *t*-test $*P < 0.05$ and $***P < 0.0001$ versus WT controls). Data bars of immunoblots are mean (percentage over controls) \pm s.e.m.; the number of animals is indicated in parentheses. (e) Increased motor activity in Munc18-OE mice (\blacktriangle) versus WT controls (\circ) following a single injection of 5 mg kg⁻¹ i.p. of amphetamine (Amph) (repeated-measures two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post hoc* test, $*P < 0.05$ and $**P < 0.01$ versus WT). (f, g) Effect of Amph (5 mg kg⁻¹ i.p.) on extracellular DA concentrations in the prefrontal cortex (f) or striatum (g) of Munc18-OE mice (\bullet) and their WT controls (\circ) expressed as percentage of DA basal concentration values (two-way ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test, $*P < 0.05$ and $***P < 0.001$ versus WT controls). The mean of the six first samples were considered basal values and assumed as the 100% value. Values were expressed as percentage of the basal values. Points are mean \pm s.e.m.; the number of animals is indicated in parentheses.

that phosphorylates and subsequently activates NR2A subunits, was also evaluated and no differences were found (Supplementary Figure S4e).

In vivo volumetric study of gray matter loss. Numerous findings from imaging studies strongly support that decrements of gray matter volume are involved in schizophrenia.^{3,4} The magnetic resonance imaging (MRI) volumetric study revealed a significant reduction of gray matter volume in Munc18-OE mice (Supplementary Table S2) in right and left temporal cortex (Figure 4a), prefrontal-olfactory cortex (Figure 4b) and cerebellar lobe (Figure 4c).

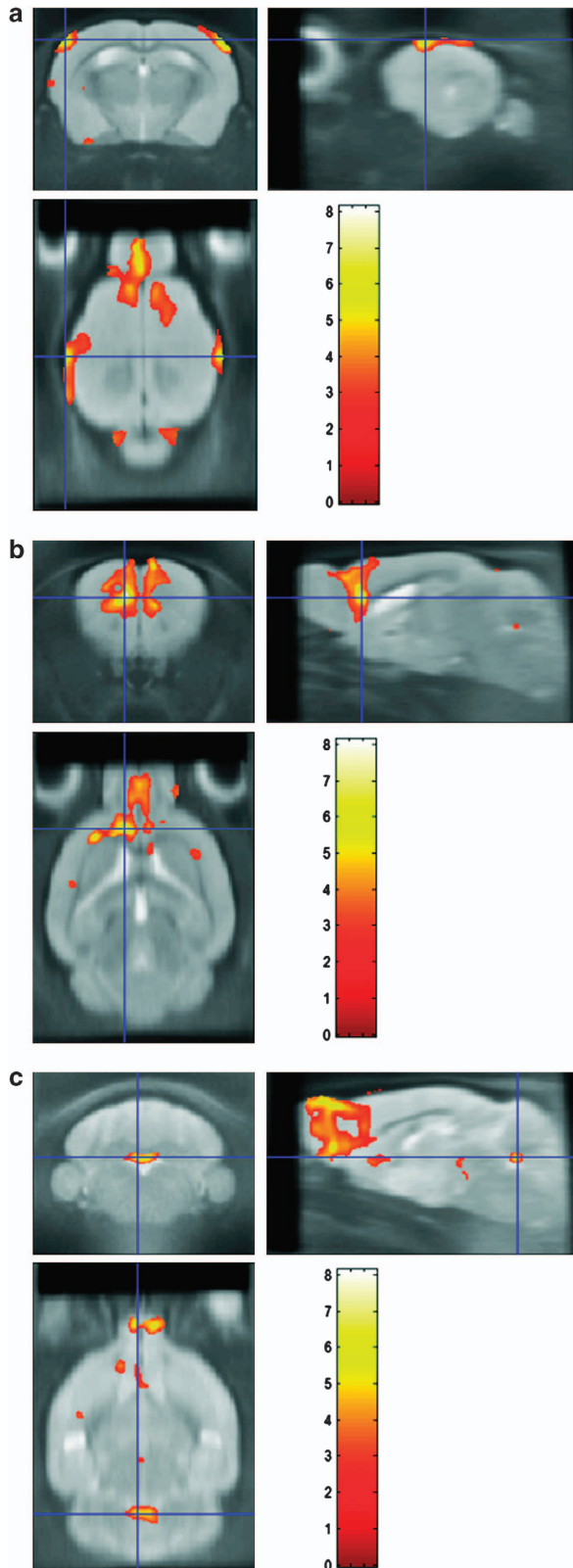
Changes in apoptotic and inflammatory markers. Several studies have suggested a role of apoptotic pathways in the cortical brain volume deficits in schizophrenia.³⁸ Fas receptor showed no changes in Munc18-OE mice (Figure 5a), FADD protein increased and no changes were observed in p-Ser191-FADD (Figure 5b). Caspase-3 activity (Figure 5c) and PARP-1 density did not change in Munc18-

OE (Figure 5d). Oxidative insults are well-established triggers of apoptosis and oxidative stress has been implicated in the pathophysiology of schizophrenia.³⁹ Munc18-OE exhibited an increase of inducible nitric oxide synthase (NOS2) density in the brain cortex whereas no changes were observed in cyclooxygenase 2 (COX2) or in neuronal nitric oxide synthase (NOS1) (Figure 5e). Malondialdehyde (MDA) cortical levels were quantified to test whether lipid peroxidation could be altered in Munc18-OE animals although no changes were found (Figure 5f).

Discussion

This study demonstrates that munc18-1 is involved in the development of behavioral, neurochemical and morphological changes that resemble those observed in schizophrenia. Munc18-OE mice seem to fulfill the validity requirements for an animal model of schizophrenia.^{14,15,28} Thus, the transgenic Munc18-OE animal: (a) was developed on the basis of previous findings in human brain of subjects with

schizophrenia^{10,11} (construct validity); (b) exhibits schizophrenia-related phenotypes (face validity); and (c) normalizes PPI deficits following antipsychotic drug treatment (predictive



validity). Furthermore, the present study strongly supports the hypothesis that abnormalities in exocytosis play a key role in the pathophysiology of schizophrenia.

Dysregulation of munc18-1 in postmortem brain of schizophrenic subjects is still controversial. Thus, increased expression in membrane microdomains,¹⁰ unaltered expression in total protein¹¹ and decreased coimmunoprecipitation with syntaxin-1 of munc18-1⁹ have been described in the brain of schizophrenic subjects. The Munc18-OE mouse design was based on the overexpression of the munc18-1 protein¹⁰ and the downregulation exerted by antipsychotics¹¹ in human brain.

Overexpression of munc18-1 induces a spectrum of behaviors that correlates with symptoms observed in schizophrenia.²⁸ This model displayed anxiety-like behaviors and aversion to unprotected new situations as observed in novelty-induced hyperlocomotion or elevated plus-maze tests. It has been described that patients with schizophrenia often develop additional comorbid conditions, including anxiety disorders.⁴⁰ On the other hand, animals overexpressing munc18-1 did not present a depressive-like behavior, at least in the test used in this study for evaluation of depressive behaviors. Deficits in social functioning, which represent a core negative symptom in schizophrenia,²⁹ were also present in these transgenic mice as revealed the decreased social interaction. Moreover, these mice displayed cognitive alterations that resemble cognitive deficits observed in schizophrenia.⁴⁰

The PPI deficits observed in Munc18-OE mice evidenced the existence of profound alterations in sensorimotor gating processes. PPI test has been considered as an excellent tool for studying the neural basis of schizophrenia due to the relevance of deficits in filtering sensorial and cognitive information in the pathophysiology of this disorder.³² The fact that the atypical antipsychotic clozapine completely reversed the gating deficit strongly supports the Munc18-OE as an animal model that mimics schizophrenia. In addition, the increase in hallucinogenic-like response susceptibility, as demonstrated the effects of DOI administration, might indicate that Munc18-OE is a good model for this positive core symptom of psychosis and schizophrenia.

DA signaling dysregulation has been proposed as a crucial component of the pathogenesis of schizophrenia² and it has been suggested that abnormal cognitive functioning in schizophrenia is related to altered DA function in the prefrontal cortex.³³

The Munc18-OE mice showed a decrease of D₁ without changes of D₂ receptor protein in both brain cortex and striatum. Studies in humans have shown controversy about D₁ receptor in schizophrenia. Some binding studies have reported decreased prefrontal D₁ receptors in

Figure 4 Volumetric reduction in gray matter of Munc18-OE transgenic mice. (a) A reduction in volume in temporal cortex was observed, $P < 0.01$, $K = 200$ voxels, $T = 5.66$ (left side) and 6.02 (right side). (b) A reduction in volume in prefrontal-olfactory-cingulate cortex was shown, $P < 0.01$, $K = 200$ voxels, $T = 8.11$, as well as in (c) cerebellar lobe $P < 0.01$, $K = 200$ voxels, $T = 5.25$. Images were analyzed according to voxel-based morphometry (VBM) methodology (see Materials and methods for details). Color bar indicates potency of significance level, from 0 (less potency) to 8 (more potency).

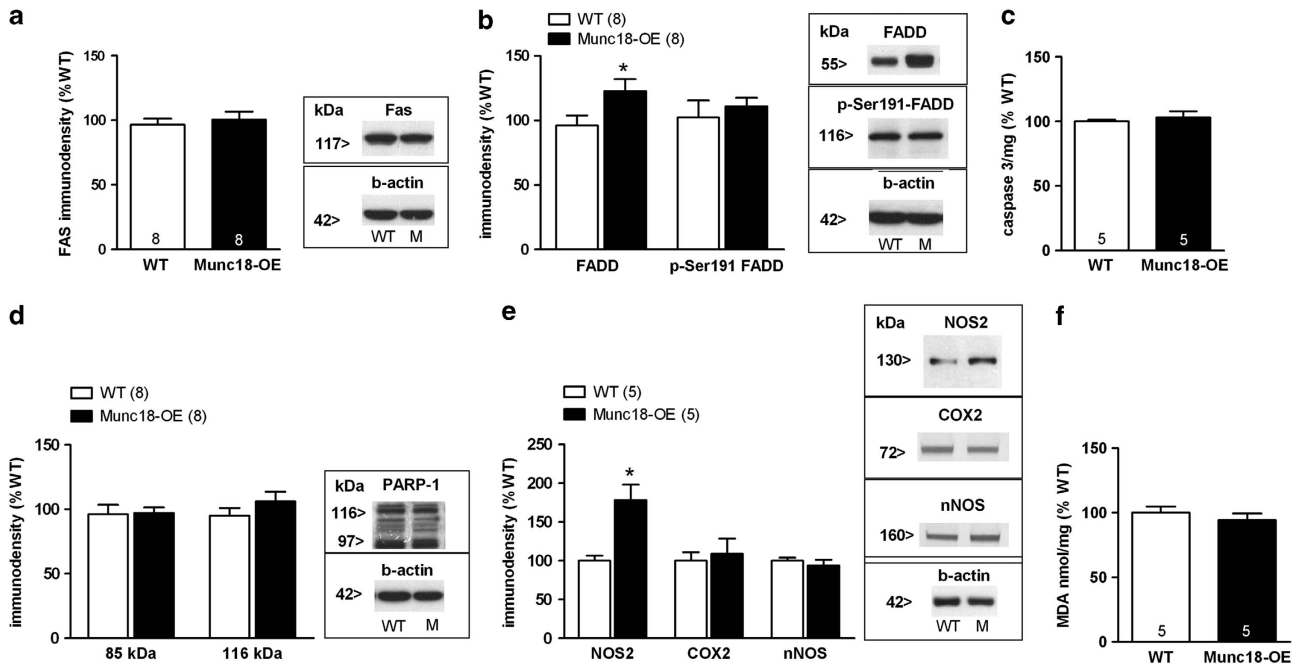


Figure 5 Apoptotic pathways and inflammatory markers. (a) No changes in Fas receptor density (glycosylated form), evaluated by western blot, were found in cortex of Munc18-OE mice. Representative immunoblots of Fas receptor and β -actin in WT controls and Munc18-OE mice (b) FADD (dimeric form) significantly increased in Munc18-OE mice (unpaired *t*-test $*P < 0.05$ versus WT controls) while phosphorylated p-191 FADD (oligomeric form) remained unchanged. Representative immunoblots of FADD, p-191 FADD and β -actin in WT controls and Munc18-OE mice. (c) No changes were found in caspase-3 activity. (d) No aberrant changes were observed in the proteolytic cleavage of nuclear PARP-1. Representative immunoblots of PARP-1, 85 fragment and β -actin in WT and Munc18-OE mice. (e) An increase of inducible nitric oxide synthase (NOS2) was detected in the brain cortex of Munc18-OE (unpaired *t*-test $*P < 0.05$ versus WT controls). The Munc18-OE mice did not present changes in the pro-inflammatory enzyme ciclooxigenase 2 (COX2) and in neuronal nitric oxide synthase (NOS1). Representative immunoblots of NOS2/COX2/NOS1 and β -actin in WT controls and Munc18-OE mice. (f) Lipid peroxidation was studied by measuring the levels of malondialdehyde (MDA) in the brain cortex of Munc18-OE and WT controls. No changes were found in cortical MDA of Munc18-OE mice when compared with their WT controls. Data bars are mean (percentage over controls) \pm s.e.m.; the number of animals is indicated in parentheses or inside the plot bars.

schizophrenia,^{34,41} while others have found no changes⁴² or even an increase in D_1 binding potential.⁴³ Increased binding of D_1 does not necessarily represent an overexpression of the receptor, since it might be due to an increase in receptor affinity.⁴⁴ Despite these confusing data, it has been postulated that both upregulation and downregulation of D_1 receptors in the prefrontal cortex are closely related to cognitive symptoms.^{33,43} D_2 receptors are widely expressed in striatal areas and their regulation in schizophrenia is also a focus of discussion. Imaging studies have found no changes of D_2 receptors in treatment-naïve patients with schizophrenia,⁴⁵ while in post-mortem human tissue it has been reported an increase of D_2 receptor in striatal areas⁴⁴ or even no changes in prefrontal cortex.¹⁹ Moreover, the relationship between increases of D_2 receptors and exposure to antipsychotics is not still well established and D_2 upregulation in schizophrenia might be induced by neuroleptic long-term treatment.^{44,46}

The DA membrane transporter (DAT) is a critical regulator of dopaminergic neurotransmission in the brain. In this animal model, overexpression of munc18-1a led to a strong downregulation of DAT in striatum. As occurs with DA receptors, also the status of DAT in the brain of subjects with schizophrenia remains unclear. However, DAT knockout mice have provided an opportunity to model *in vivo* conditions of extreme dopaminergic dysfunction.⁴⁷ DAT knockout mice exhibit impairment in social interaction⁴⁸ and deficits in PPI that are attenuated after antipsychotic administration.⁴⁹ It has

been postulated that in the absence of DAT, extracellular DA clearance from synaptic cleft slows down, which leads to the downregulation of DA receptors.⁴⁷ The observed strong decrease of DAT in Munc18-OE might contribute to gating deficits and social dysfunction. TH was strongly overexpressed in cortex and striatum of Munc18-OE. Equivalent TH overexpression has been demonstrated under conditions of chronic blockade of DAT by cocaine administration.⁵⁰ Because of the D_1 receptor abnormalities, the reduction of presynaptic DAT and the overexpression of TH, it is tempting to speculate the presence of hyperdopaminergia in the brain of Munc18-OE mice. Hyperactivity of presynaptic DA terminals has been proposed to be a key component of schizophrenia^{2,51} and should be reflected in alteration of extracellular DA concentrations under *in vivo* conditions. Although basal DA concentrations in the brain cortex and striatum of Munc18-OE were not modified, amphetamine challenge promoted an enhanced release of DA when compared with controls. Similar findings have been reported by *in vivo* neuroimaging in patients with schizophrenia.³⁶ Moreover, the enhanced sensitivity of extracellular DA to amphetamine administration in Munc18-OE is concordant with the hyperlocomotion observed in these animals in response to amphetamine. In fact, this hyperactivity has been proposed as a valuable model for psychosis and positive symptoms of schizophrenia. All these data reveal that the dopaminergic dysfunction in Munc18-OE animals might be

representative of the spectrum of symptoms observed in humans with schizophrenia.

Imaging studies suggest that schizophrenia is a brain disease involving decrements of gray matter volume.^{3,4} The significant decrease of gray matter in temporal and prefrontal-olfactory cortex as well as in cerebellar lobe of Munc18-OE when evaluated by MRI revealed the importance of this model for the study of the schizophrenia pathogenesis. Although mechanisms underlying the decrease of cortical brain volume in schizophrenia are unknown, it could suggest a role of apoptotic pathways in these deficits.³⁸ Changes of apoptotic pathways in cortex of Munc18-OE mice were scarce but a pro-apoptotic trend in apoptosis pathways and susceptibility to neural damage induced by elevated NOS2 might be contributing to the reported decreases of gray matter. Further studies beyond this exploratory analysis of the Munc18-OE phenotype are necessary to establish the mechanisms leading from munc18-1a overexpression to regional brain loss of gray matter.

Since schizophrenia is a disorder with non-well understood origin, pathogenesis, and pathophysiology, animal models could contribute to decipher the key components of the disease and its response to treatment. In this context, the present study demonstrates that dysfunctions of munc18-1 are relevant for the development of a wide spectrum of behavioral, neurochemical and anatomical alterations that may resemble schizophrenic symptoms and/or neurobiological findings observed in subjects with schizophrenia.

Conflict of interest

LU, MJG, MF-A and JJM are authors of a patent (WO/2010/020642) related to munc18-1 in schizophrenia owned by Brainco Biopharma SL and UPV/EHU. JJM and AP have received research funds from Brainco Biopharma SL.

Acknowledgements. We thank Raquel Rey-Brea, Alfredo Ramos-Miguel and Nagore Puenta for technical assistance. The study was supported by an intramural Grant from Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental, Instituto de Salud Carlos III (CIBERSAM), Spanish MICINN and FEDER (SAF2009-08460 to JJM; SAF2010-21948 to JLMMM; AGL2009-11358 to AG-A, SAF2011-29918 to JAGS; PI10/02986, CP08/00017 and CEN-20101014 to MD), Basque Government (S-PR10UN01 to JEO and IT-199/07 to JJM), University of the Basque Country (UPV/EHU) and Complutense University of Madrid (UCM GR42/10-962075 to JLMM).

- van Os J, Kapur S. Schizophrenia. *Lancet* 2009; **374**: 635–645.
- Howes OD, Kapur S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III—the final common pathway. *Schizophr Bull* 2009; **35**: 549–562.
- Honea R, Crow TJ, Passingham D, Mackay CE. Regional deficits in brain volume in schizophrenia: a meta-analysis of voxel-based morphometry studies. *Am J Psychiatry* 2005; **162**: 2233–2245.
- Arango C, Rapado-Castro M, Reig S, Castro-Fornieles J, Gonzalez-Pinto A, Otero S et al. Progressive brain changes in children and adolescents with first-episode psychosis. *Arch Gen Psychiatry* 2012; **69**: 16–26.
- Johnson RD, Oliver PL, Davies KE. SNARE proteins and schizophrenia: linking synaptic and neurodevelopmental hypotheses. *Acta Biochim Pol* 2008; **55**: 619–628.
- Sudhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 2009; **323**: 474–477.
- Burgoyne RD, Barclay JW, Ciufo LF, Graham ME, Handley MT, Morgan A. The functions of Munc18-1 in regulated exocytosis. *Ann NY Acad Sci* 2009; **1152**: 76–86.
- Toonen RF, Verhage M. Munc18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control. *Trends Neurosci* 2007; **30**: 564–572.
- Castillo MA, Ghose S, Tamminga CA, Ulerly-Reynolds PG. Deficits in syntaxin 1 phosphorylation in schizophrenia prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 2010; **67**: 208–216.
- Behan AT, Byrne C, Dunn MJ, Cagney G, Cotter DR. Proteomic analysis of membrane microdomain-associated proteins in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder reveals alterations in LAMP, STXBP1 and BASP1 protein expression. *Mol Psychiatry* 2009; **14**: 601–613.
- Gil-Pisa I, Munariz-Cuezva E, Ramos-Miguel A, Uriguen L, Meana JJ, Garcia-Sevilla JA. Regulation of munc18-1 and syntaxin-1A interactive partners in schizophrenia prefrontal cortex: down-regulation of munc18-1a isoform and 75 kDa SNARE complex after antipsychotic treatment. *Int J Neuropsychopharmacol* 2012; **14**: 573–588.
- Garcia EP, McPherson PS, Chilcote TJ, Takei K, De Camilli P. rbSec1A and B colocalize with syntaxin 1 and SNAP-25 throughout the axon, but are not in a stable complex with syntaxin. *J Cell Biol* 1995; **129**: 105–120.
- Swanson DA, Steel JM, Valle D. Identification and characterization of the human ortholog of rat STXBP1, a protein implicated in vesicle trafficking and neurotransmitter release. *Genomics* 1998; **48**: 373–376.
- Nestler EJ, Hyman SE. Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci* 2010; **13**: 1161–1169.
- Powell CM, Miyakawa T. Schizophrenia-relevant behavioral testing in rodent models: a uniquely human disorder? *Biol Psychiatry* 2006; **59**: 1198–1207.
- Gutierrez-Adan A, Pintado B. Effect of flanking matrix attachment regions on the expression of microinjected transgenes during preimplantation development of mouse embryos. *Transgenic Res* 2000; **9**: 81–89.
- Garcia-Sevilla JA, Alvaro-Bartolome M, Diez-Alarcia R, Ramos-Miguel A, Puigdemont D, Perez V et al. Reduced platelet G protein-coupled receptor kinase 2 in major depressive disorder: antidepressant treatment-induced upregulation of GRK2 protein discriminates between responder and non-responder patients. *Eur Neuropsychopharmacol* 2010; **20**: 721–730.
- Vaidya VA, Castro ME, Pei Q, Sprakes ME, Grahame-Smith DG. Influence of thyroid hormone on 5-HT(1A) and 5-HT(2A) receptor-mediated regulation of hippocampal BDNF mRNA expression. *Neuropharmacology* 2001; **40**: 48–56.
- Uriguen L, Garcia-Fuster MJ, Callado LF, Morentin B, La Harpe R, Casado V et al. Immunodensity and mRNA expression of A2A adenosine, D2 dopamine, and CB1 cannabinoid receptors in postmortem frontal cortex of subjects with schizophrenia: effect of antipsychotic treatment. *Psychopharmacology* 2009; **206**: 313–324.
- Gonzalez-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, Lopez-Gimenez JF et al. Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* 2008; **452**: 93–97.
- Uriguen L, Perez-Rial S, Ledent C, Palomo T, Manzanares J. Impaired action of anxiolytic drugs in mice deficient in cannabinoid CB1 receptors. *Neuropharmacology* 2004; **46**: 966–973.
- Paxinos G, Franklin KBJ. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press: San Diego, 2001.
- Ortega JE, Fernandez-Pastor B, Callado LF, Meana JJ. *In vivo* potentiation of roboxetine and citalopram effect on extracellular noradrenaline in rat brain by alpha(2)-adrenoceptor antagonism. *Eur Neuropsychopharmacol* 2010; **20**: 813–822.
- Sawiak SJ, Wood NI, Williams GB, Morton AJ, Carpenter TA. Voxel-based morphometry in the R6/2 transgenic mouse reveals differences between genotypes not seen with manual 2D morphometry. *Neurobiol Dis* 2009; **33**: 20–27.
- Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Rothstein JD, Melone M. EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cereb Cortex* 1998; **8**: 108–116.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW et al. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 1996; **16**: 675–686.
- Rizo J, Sudhof TC. Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat Rev Neurosci* 2002; **3**: 641–653.
- Arguello PA, Gogos JA. Modeling madness in mice: one piece at a time. *Neuron* 2006; **52**: 179–196.
- O’Tuathaigh CM, Kirby BP, Moran PM, Waddington JL. Mutant mouse models: genotype-phenotype relationships to negative symptoms in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2010; **36**: 271–288.
- Gonzalez-Maeso J, Weisstaub NV, Zhou M, Chan P, Ivic L, Ang R et al. Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT(2A) receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron* 2007; **53**: 439–452.
- Aleman A, Hijman R, de Haan EH, Kahn RS. Memory impairment in schizophrenia: a meta-analysis. *Am J Psychiatry* 1999; **156**: 1358–1366.
- Braff DL, Geyer MA, Swerdlow NR. Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies. *Psychopharmacology* 2001; **156**: 234–258.
- Goldman-Rakic PS, Castner SA, Svensson TH, Siever LJ, Williams GV. Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 2004; **174**: 3–16.
- Okubo Y, Suhara T, Suzuki K, Kobayashi K, Inoue O, Terasaki O et al. Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature* 1997; **385**: 634–636.

35. Laakso A, Bergman J, Haaparanta M, Vilkmán H, Solin O, Syvalahti E *et al*. Decreased striatal dopamine transporter binding *in vivo* in chronic schizophrenia. *Schizophr Res* 2001; **52**: 115–120.
36. Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J *et al*. Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 9235–9240.
37. Tamminga C. Glutamatergic aspects of schizophrenia. *Br J Psychiatry Suppl* 1999; **37**: 12–15.
38. Glantz LA, Gilmore JH, Lieberman JA, Jarskog LF. Apoptotic mechanisms and the synaptic pathology of schizophrenia. *Schizophr Res* 2006; **81**: 47–63.
39. Bernstein HG, Bogerts B, Keilhoff G. The many faces of nitric oxide in schizophrenia. A review. *Schizophr Res* 2005; **78**: 69–86.
40. Buckley PF, Miller BJ, Lehrer DS, Castle DJ. Psychiatric comorbidities and schizophrenia. *Schizophr Bull* 2009; **35**: 383–402.
41. Kosaka J, Takahashi H, Ito H, Takano A, Fujimura Y, Matsumoto R *et al*. Decreased binding of [¹¹C]NNC112 and [¹¹C]SCH23390 in patients with chronic schizophrenia. *Life Sci* 2010; **86**: 814–818.
42. Karlsson P, Farde L, Halldin C, Sedvall G. PET study of D(1) dopamine receptor binding in neuroleptic-naive patients with schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2002; **159**: 761–767.
43. Abi-Dargham A, Mawlawi O, Lombardo I, Gil R, Martinez D, Huang Y *et al*. Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *J Neurosci* 2002; **22**: 3708–3719.
44. Seeman P. Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia. *Expert Opin Ther Targets* 2006; **10**: 515–531.
45. Guillin O, Abi-Dargham A, Laruelle M. Neurobiology of dopamine in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 2007; **78**: 1–39.
46. Silvestri S, Seeman MV, Negrete JC, Houle S, Shammi CM, Remington GJ *et al*. Increased dopamine D2 receptor binding after long-term treatment with antipsychotics in humans: a clinical PET study. *Psychopharmacology* 2000; **152**: 174–180.
47. Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG. Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 1996; **379**: 606–612.
48. Rodríguez RM, Chu R, Caron MG, Wetsel WC. Aberrant responses in social interaction of dopamine transporter knockout mice. *Behav Brain Res* 2004; **vol. 148**: 185–198.
49. Powell SB, Young JW, Ong JC, Caron MG, Geyer MA. Atypical antipsychotics clozapine and quetiapine attenuate prepulse inhibition deficits in dopamine transporter knockout mice. *Behav Pharmacol* 2008; **19**: 562–565.
50. Vrana SL, Vrana KE, Koves TR, Smith JE, Dworkin SI. Chronic cocaine administration increases CNS tyrosine hydroxylase enzyme activity and mRNA levels and tryptophan hydroxylase enzyme activity levels. *J Neurochem* 1993; **61**: 2262–2268.
51. Howes OD, Kambaitz J, Kim E, Stahl D, Slifstein M, Abi-Dargham A *et al*. The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment. *Arch Gen Psychiatry* 2012; **69**: 776–786.



Translational Psychiatry is an open-access journal published by Nature Publishing Group. This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Supplementary Information accompanies the paper on the Translational Psychiatry website (<http://www.nature.com/tp>)