

Evaluación conductual del fenotipo «esquizofrenia» en un modelo animal por lesión neonatal del hipocampo ventral en ratas juveniles y adultas

Alma D. Genis-Mendoza¹, Isabel Beltrán-Villalobos² y Humberto Nicolini-Sánchez^{1,2*}

¹Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Servicios de Atención psiquiátrica (SAP), Secretaría de Salud, México, D.F.;

²Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México, D.F.

Resumen

La esquizofrenia es un grave trastorno mental que afecta a una de cada 100 personas en el mundo y se caracteriza por la distorsión de los pensamientos y percepciones. Se han desarrollado diversos modelos animales para el estudio de la esquizofrenia basados principalmente en el estudio del mecanismo de acción de los antipsicóticos. En el presente trabajo mostramos varias de las pruebas conductuales clásicas (memoria, interacción social [IS] e inhibición de prepulso) relacionadas con la enfermedad, utilizando el modelo de la lesión neonatal en el hipocampo ventral (LNHV), en ratas juveniles y adultas. El modelo animal de la LNHV es un modelo heurístico que discrimina, mediante las pruebas conductuales, al fenotipo «tipo-esquizofrenia» de otros paradigmas conductuales como el de la depresión y la ansiedad, específicamente en los animales adultos. El estudio de la genómica de este modelo promete ser un importante generador de genes candidatos para la esquizofrenia en el ser humano.

PALABRAS CLAVE: Esquizofrenia. Modelos animales. Lesión neonatal en el hipocampo ventral.

Abstract

Schizophrenia is a serious mental disorder that affects one in 100 people worldwide, and is characterized by distorted thoughts and perceptions. Several animal models have been developed, based primarily on the study of the mechanism of action of antipsychotics. In this paper we present a number of classic behavioral tests (memory, social interaction, and pre-pulse inhibition) associated with schizophrenia in young and adult animals with NLVH. The animal model of NLVH is a heuristic model that discriminates, by behavioral testing, the phenotype "schizophrenia-like" from other behavioral paradigms such as depression and anxiety, specifically in adult animals. The genomics study of this model promises to be an important source of candidate genes for schizophrenia in humans. (Gac Med Mex. 2014;150:420-31)

Corresponding author: Humberto Nicolini, nicolini_humberto@yahoo.com

KEY WORDS: Schizophrenia. Animal model. Neonatal ventral hippocampus lesion.

Introducción

La esquizofrenia es un grave trastorno mental que afecta a una de cada 100 personas en el mundo, se caracteriza por la distorsión de los pensamientos y las percepciones, e incide en el paciente durante toda su

vida¹. Aunque su etiología es aún desconocida, se acepta una etiología multifactorial. Por ejemplo, la teoría del neurodesarrollo propone que la predisposición genética, aunada a agentes ambientales tempranos (trauma, estresor o virus), produciría alteraciones en la conectividad del cerebro durante su desarrollo, principalmente en el control de las áreas subcorticales mediadas por el sistema dopaminérgico^{2,3}. Se ha sugerido también que la esquizofrenia puede ser inducida por «accidentes» o lesiones durante el desarrollo temprano del cerebro del individuo, que conllevan una

Correspondencia:

*Humberto Nicolini

Carracci, 107

Insurgentes Extremadura, C.P. 13740, México, D.F.

E-mail: nicolini_humberto@yahoo.com

Fecha de recepción en versión modificada: 18-02-2014

Fecha de aceptación: 19-03-2014

reducción de las conexiones neuronales de diferentes regiones⁴.

La esquizofrenia se caracteriza principalmente por presentar síntomas positivos, negativos y cognitivos, como pérdida de memoria⁵. Los síntomas positivos se relacionan con síntomas psicóticos como pérdida de contacto con la realidad, delirios y alucinaciones, mientras que los síntomas negativos corresponden a un estado de déficit en los procesos conductuales, que están disminuidos o ausentes y se manifiestan como empobrecimiento o disminución del pensamiento, la afectividad, la conducta y el lenguaje⁶.

En la esquizofrenia también se propone la participación de diferentes sistemas de neurotransmisión¹. Por ejemplo, la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia se origina de la observación de que las drogas de abuso, que aumentan la liberación de dopamina (por ejemplo, cocaína y anfetaminas), pueden inducir síntomas psicóticos, y con el descubrimiento de que los antipsicóticos bloquean preferentemente los receptores dopaminérgicos D2 y D4⁷. Otro sistema relacionado con la esquizofrenia es el GABAérgico; recientemente se ha encontrado que el alelo T del gen *GABRB1*, que codifica para la subunidad β -1 del receptor ácido γ -aminobutírico A (GABA-A), está fuertemente asociado con la enfermedad, por lo que se ha propuesto como marcador molecular⁸. El papel de la serotonina en la esquizofrenia fue originalmente propuesto basándose en los efectos alucinogénicos del ácido lisérgico (LSD), compuesto que activa los receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A}; por ejemplo, los antipsicóticos atípicos, como clozapina, olanzapina y risperidona son antagonistas de diferentes receptores de serotonina⁹.

Estudio de la esquizofrenia en modelos animales

El empleo de modelos animales en psiquiatría tiene claras limitaciones, ya que se trata de reproducir en un animal sano conductas humanas complejas¹⁰⁻¹³. No obstante, los modelos animales de trastornos psiquiátricos han permitido explorar el potencial terapéutico de medicamentos específicos en el tratamiento de estos padecimientos, así como obtener datos relevantes de los mecanismos de acción de dichos fármacos, y también son herramientas valiosas para la determinación de los sustratos neurobiológicos de los desórdenes psiquiátricos¹³.

La contribución de los modelos animales a la neurobiología de los trastornos psiquiátricos depende de

su validez, por lo que se plantea que los modelos cumplan con los siguientes criterios¹⁴.

- Criterio de validez predictiva: implica que los fármacos que modifican el estado patológico en los humanos también deben hacerlo en el modelo animal, cubriendo los requisitos de sensibilidad, selectividad y potencia relativa.
- Criterio de validez de apariencia: se refiere a la similitud fenomenológica entre el modelo y el desorden estudiado; se propone que el modelo debe mostrar los síntomas más representativos del desorden.
- Criterio de validez de constructo o validez hipotética: establece que la hipótesis que explica el trastorno psiquiátrico también debe servir como fundamento del modelo¹⁴.

Para el estudio de la esquizofrenia se han propuesto varios modelos animales: farmacológicos, genéticos (inducidos por mutaciones o deleciones genéticas) y de neurodesarrollo (inducidos por una lesión física o neurotóxica o por factores ambientales durante el neurodesarrollo)¹⁵.

Modelos de neurodesarrollo

Se ha sugerido que la esquizofrenia puede ser inducida por eventos o «lesiones» durante el desarrollo temprano del individuo, trayendo como consecuencia una reducción de las conexiones neuronales en diferentes regiones cerebrales como la corteza prefrontal, así como una disminución de las sinapsis en sitios de proyección como el cíngulo, la corteza y el estriado ventral¹⁶. Basándose en esta idea, se han desarrollado modelos en los que se afecta el desarrollo del cerebro, ya sea durante la etapa prenatal o neonatal, como en el modelo validado de LNHV¹⁷.

Este modelo se induce con una pequeña lesión excitotóxica en el hipocampo del cerebro inmaduro de ratas neonatas, dando oportunidad a su posterior maduración. En la etapa adulta, los animales lesionados presentan conductas relacionadas con los síntomas positivos y negativos de la enfermedad, como hiperlocomoción, reducción de la inhibición por prepulso, déficit de memoria y decremento en la Interacción Social, entre otras¹⁸. Este modelo está basado en la hipótesis del neurodesarrollo, ya que postula que en la esquizofrenia la migración neuronal está alterada en el segundo trimestre de gestación (primeros días neonatales en roedores), y afecta a varios de los sistemas de neurotransmisión relacionados en esquizofrenia¹⁹. De acuerdo con la revisión anterior, pensamos que el modelo

animal que más sustenta las características de la esquizofrenia es el de LNHV, ya que puede servir para estudiarla desde una perspectiva fisiopatológica²⁰.

El objetivo del presente trabajo fue analizar las diferencias conductuales dependientes de la edad (a los 45 y 90 días) con pruebas conductuales relacionadas con la esquizofrenia en el modelo de LNHV.

Metodología

Material biológico

El estudio partió de 48 ratas macho de la cepa Wistar, provenientes de camadas de ratas preñadas en el laboratorio en aislamiento individual, y que fueron puestas a ciclo invertido luz-oscuridad de 12 h. La muestra total fue dividida en seis grupos: ocho ratas LHVN-juveniles, ocho ratas falsamente lesionadas (*sham*) juveniles, ocho ratas (*naive*) sin manipulación juveniles, ocho ratas LHVN-adultas, ocho ratas falsamente lesionadas (*sham*) adultas y ocho ratas (*naive*) sin manipulación.

Todos los experimentos se realizaron siguiendo las regulaciones establecidas en la norma oficial mexicana para el uso y cuidado de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999), así como las regulaciones del comité de ética de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor²¹.

Lesión neonatal en el hipocampo ventral: las crías de 5-7 días de vida fueron anestesiadas por hipotermia colocándolas en hielo durante 12-15 min; posteriormente, se colocaron en un estereotáxico con adaptador especial para animales neonatos. A cada cría se le realizó una incisión en la piel del cráneo y se le administró 0.3 ul de ácido iboténico (disuelto en *buffer* de fosfatos 0.1 M, pH 7.4) directamente en el hipocampo ventral durante 2 min con una cánula de acero inoxidable de 30-ga de grosor. Las coordenadas fueron: anteroposterior: 2.0 mm, mediolateral: \pm 2.5 mm relativo a bregma y ventrodorsal: -3.3 mm de la duramadre²⁰. Posteriormente los animales se suturaron y se dejaron recuperar bajo el calor indirecto de una lámpara de 40 W hasta recuperar su temperatura. Los animales operados se regresaron con sus respectivas madres hasta el momento del destete a los 21 días de edad^{20,22}.

Pruebas conductuales

A los animales de 45 y 90 días de edad se les realizaron pruebas conductuales; antes de estas pruebas

las ratas se aislaron durante cinco días en cajas individuales (34 x 16 x 24 cm) y al sexto día se iniciaron las pruebas que a continuación se describen.

Prueba de coordinación motora

La coordinación motora se midió con la ayuda de un equipo (*rotarod*) que consintió en un cilindro de 7 cm de diámetro que rotaba a una velocidad de 11 rpm. Los animales fueron puestos a caminar sobre los cilindros durante 5 min, después de dos sesiones de entrenamiento. En la prueba se registró el número de caídas del animal²³. Generalmente, esta prueba sirve para observar la motricidad del animal; en este caso la utilizamos para determinar si la operación neonatal no interfería en la motricidad y locomoción del animal a evaluar, ya que si el animal cae más de una o dos veces durante la prueba, se dice que presenta anomalías en la motricidad, y se descarta del experimento.

Prueba de campo abierto

Para analizar la actividad locomotora, los animales se sometieron a la prueba de campo abierto. Las ratas se colocaron individualmente en una caja de acrílico (30 x 60 x 15 cm) con el suelo dividido en 24 cuadros. Se registró el número de veces en el que el animal entraba en cada cuadro con las cuatro patas, en un periodo de 5 min. Las mediciones se realizaron en un ambiente de oscuridad, iluminado por una lámpara roja colocada por encima del campo abierto. La prueba se grabó para su posterior registro^{23,24}. Con la prueba de campo abierto se espera observar hiperlocomoción en los animales con LNHV. Cabe mencionar que esta prueba es uno de los parámetros que más se han evaluado en modelos de esquizofrenia, ya sea farmacológicos, genéticos o por alguna lesión²⁵⁻²⁷.

Prueba de Interacción Social (IS)

Los animales fueron aislados individualmente durante cinco días antes de iniciar la prueba. Se pusieron dos animales en un cilindro transparente de 70 cm de diámetro x 38 de altura, en una habitación oscura y bajo luz brillante. Se registró el tiempo acumulado de interacción durante 10 min mediante una cámara de vídeo, y se midieron los siguientes comportamientos: montaje, olfateo, salto y arrastrarse sobre la pareja^{28,29}. La reducción de la IS es uno de los síntomas negativos más representativos de la esquizofrenia, que también

se ha observado en varios modelos farmacológicos de esquizofrenia^{28,29}.

Prueba de reconocimiento de objetos

La prueba se dividió en tres sesiones distintas (habitación, familiarización y sesiones de retención) y se llevó a cabo durante dos días consecutivos. La sesión de habituación es necesaria para que todos los animales se adapten al escenario experimental sin estímulo específico durante 15 min, 24 h antes de la prueba. En el segundo día, los animales realizaron una sesión de familiarización, 10 min con la presencia de dos objetos idénticos hechos de metal o madera. Los objetos fueron colocados en el centro del piso de la arena y los animales exploraron los objetos libremente durante 10 min. Inmediatamente después de la sesión de familiarización, las ratas se retiraron de la arena. La prueba se repitió 60 min más tarde (sesión de retención) para probar la memoria a corto plazo. En este caso, uno de los objetos se cambió por un nuevo objeto (objeto nuevo) y la rata se introdujo en la arena. Las posiciones de los objetos se permutaron al azar para cada animal. Se registró el tiempo de exploración (tiempo que pasan los animales oliendo o tocando los objetos con la nariz y/o patas delanteras). El tiempo dedicado a explorar cada objeto fue grabado durante 10 min con una cámara de vídeo digital. El índice de discriminación se calculó para determinar la preferencia de las ratas en la exploración del objeto nuevo, en relación con el objeto conocido^{25,30-32}. Para medir la función cognitiva se utilizó el índice de reconocimiento (RI), que resulta de dividir el tiempo de exploración del objeto nuevo por el tiempo total de exploración. Un valor de RI cercano a 0.5 indica que los animales pasan una cantidad similar de tiempo en explorar el objeto familiar y el objeto nuevo, mientras que los valores de RI mayores a 0.5 indican preferencia de exploración del nuevo objeto³².

Prueba de inhibición de prepulso

Las cámaras acústicas consistieron en un tubo de acrílico o inmovilizador (8.2 cm de diámetro y 22 de longitud) con un acelerómetro montado debajo del tubo. El animal se colocó en el inmovilizador en una caja oscura sonido-atenuante; los estímulos acústicos fueron promovidos por el *software* del ordenador, a través de una bocina que se colocó 10 cm por encima del tubo. El *software* convierte las mediciones del acelerómetro en una señal digital. El ruido de fondo

fue de 70 dB. Cada sesión se inició con una aclimatación de 5 min, seguida por bloques de seis ensayos que incluyeron un estímulo de 120 dB de pulso (amplitud basal) y un prepulso de 15 dB por encima del ruido de fondo. Los prepulsos siempre antecedieron al estímulo de 120 dB después de 100 ms; el intervalo entre cada prueba fue de 10/37 s. Después de las pruebas, los inmovilizadores se limpiaron con una solución de jabón suave antes de que el siguiente animal se pusiera a prueba. La amplitud de sobresalto se calculó como el promedio de los seis ensayos. El porcentaje de inhibición de prepulso (PPI%) se calculó de la siguiente manera: $100 - (\text{amplitud de sobresalto} / \text{amplitud de sobresalto basal}) \times 100$ ³³. Esta prueba evalúa la capacidad de respuesta del individuo ante el estímulo auditivo, así como su procesamiento; en los animales, se pueden medir anomalías en el procesamiento de la información y atención, características presentes en la esquizofrenia^{34,35}.

Modelo de nado forzado

Las sesiones de nado se realizaron en cilindros de vidrio individuales (46 x 20 cm) con agua tibia (23-25 °C) y 30 cm de profundidad, sin que los animales tocasen el fondo con las patas. La prueba se realizó en dos sesiones: un entrenamiento inicial de 15 min y 24 h más tarde una sesión de 5 min. Las ratas fueron retiradas de los cilindros, con toallas se les quitó el exceso de agua, para ser colocadas en jaulas calientes durante 30 min, y posteriormente fueron regresarlas a sus jaulas. Cada sesión fue grabada con vídeo para su posterior análisis³³. El modelo de nado forzado mide la desesperanza conductual del animal; se sabe que la depresión no es una característica típica de la esquizofrenia, por lo que se esperaba que el animal con LNHV no presentara desesperanza conductual o conducta de tipo depresivo en el análisis de la prueba³⁶.

Modelo de enterramiento defensivo

Para esta prueba se utilizó un equipo de acrílico (34 x 16 x 24 cm) que contenía un electrodo de 7 cm de largo, en un costado de la caja que emergía 2 cm por encima de una cama de aserrín fino. Cada vez que el animal tocaba el electrodo, podía recibir una descarga eléctrica de 0.3 mA. Ya que la fuente del choque era un estímulo adverso, instintivamente el animal trataba de esconder o enterrar el estímulo. La sesión fue grabada durante 10 min para posteriormente

Tabla 1. Resultados estadísticos de las pruebas conductuales*

Prueba	p naïve vs sham	p sham vs lesionados	p naïve vs sham	p sham vs lesionados	p lesionados juveniles vs lesionados adultos
	Juveniles		Adultos		
Campo abierto	1.0	1.0	1.0	0.001	0.001
Reconocimiento de objetos	1.0	1.0	1.0	0.023	0.021
Interacción Social	1.0	1.0	1.0	0.051	0.005
Inhibición de prepulso	1.0	1.0	1.0	0.048	0.038
Nado forzado	1.0	1.0	1.0	1.0	0.556
Enterramiento defensivo	1.0	1.0	1.0	1.0	1.02
Plancha caliente	1.0	1.0	1.0	1.0	1.05

Análisis estadístico de las pruebas conductuales. Se muestran los resultados del análisis estadístico con la prueba de ANOVA con contrastes planeados por edad y tipo de conducta.

*p < 0.005 naïve vs sham; sham vs lesionado, y lesionado juvenil vs lesionado adulto (n = 8 por grupo).

registrar las mediciones y el tiempo acumulado de enterramiento como indicadores de ansiedad³⁷. En la esquizofrenia no se presenta de manera típica la ansiedad, por lo que en el modelo de LNHV es posible que no se encuentre.

Prueba de nocicepción

Cada animal se introdujo en un cilindro de vidrio (20 cm de diámetro por 25 de altura) y se colocó en el centro de una placa metálica a 53 ± 0.5 °C. Dentro de los primeros segundos, el animal debe mostrar la conducta de lamerse las patas como respuesta concreta evocada por el estímulo térmico. La latencia marca la aparición de esta respuesta y se determina que la prueba debe concluir antes de 30 s para evitar dañar el tejido³⁸. Se sabe que los pacientes con esquizofrenia presentan una disminución en la sensibilidad al dolor³⁹, por lo que se espera que en los animales con LNHV las latencias sean más altas que en los controles.

Resultados

Para evaluar los parámetros conductuales (*rotarod*, campo abierto, reconocimiento de objetos, IS, inhibición de prepulso, nado forzado, enterramiento defensivo y nocicepción) dependientes de la edad en los grupos de ratas lesionadas, *sham* y *naïve*, se utilizó el paquete estadístico SPSS (versión 15) y el programa Sigma Plot (versión 10.0).

Los resultados conductuales se analizaron con la prueba de análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías con contrastes planeados *post hoc* y corrección de Tukey, para ver si las diferencias obedecían al efecto de la interacción entre la edad (45 o 90 días) y el tipo de conducta (Tabla 1).

La prueba de coordinación motora mostró que la mayoría de los animales no presentaron problemas de locomoción; sólo un 2% de los animales presentaron problemas de equilibrio, los mismos que fueron descartados del protocolo (datos no mostrados).

En la prueba de campo abierto, la actividad locomotora del grupo de ratas adultas lesionadas reveló un incremento en la locomoción en comparación con su grupo control y en el grupo de ratas juveniles no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Fig. 1).

Con respecto a la evaluación de la memoria, en el grupo de ratas adultas lesionadas se observó una reducción significativa en la exploración del objeto no familiar, lo que se traduce en una deficiencia de memoria, en comparación con los grupos de control (Fig. 2). En el grupo de ratas juveniles no se observaron diferencias; el tiempo acumulado de exploración del objeto no familiar no fue diferente para los tres grupos experimentales.

En la prueba de IS, se encontró que el grupo de ratas adultas lesionadas presentó un decremento muy marcado en la IS en comparación con sus controles, a diferencia del grupo de ratas juveniles, en donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas

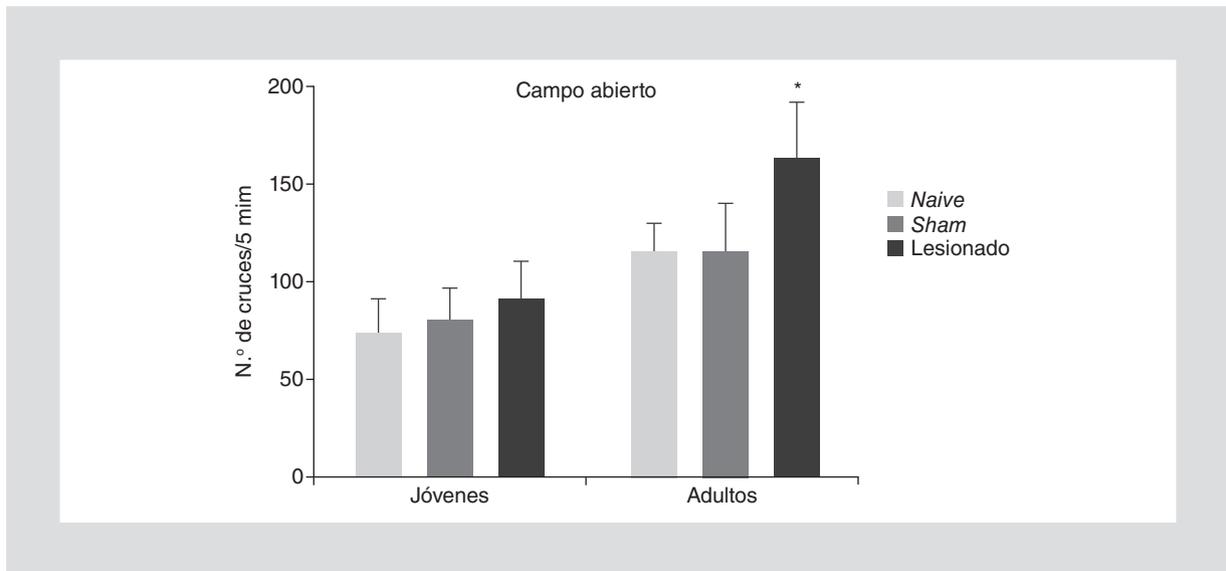


Figura 1. Prueba de campo abierto. Se muestra el número de cruces promedio por cada 5 min, en el grupo de ratas juveniles de 45 días y adultas de 90 días. * $p < 0.05$ versus grupo control a la misma edad. Prueba de $t^* < 0.005$ frente al grupo control ($n = 8$ por grupo).

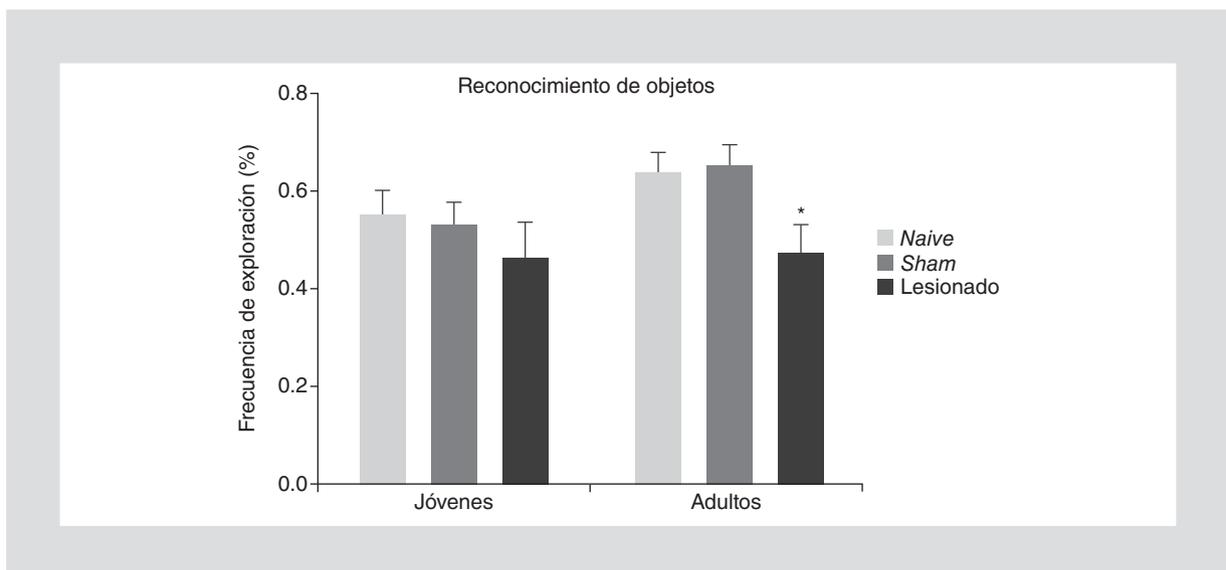


Figura 2. Efecto de la LNHV en la frecuencia de exploración, en el grupo de ratas juveniles de 45 días y adultas de 90 días. * $p < 0.05$ vs grupo control a la misma edad. Prueba de $t^* < 0.005$ frente al grupo control ($n = 8$ por grupo).

del tiempo acumulado de contacto social, respecto a los grupos de control (Fig. 3).

Respecto a la inhibición de prepulso, se observó que el grupo de animales adultos lesionados presentó un aumento del porcentaje de inhibición de prepulso, en comparación con los animales falsamente lesionados y sus controles (Fig. 4). En el grupo de animales juveniles no se presentaron cambios en la respuesta a los sonidos (prepulso o pulso).

Con respecto a la evaluación de la conducta de tipo depresión, por medio del modelo de nado forzado, no

se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el tiempo acumulado de inmovilidad, en comparación con los grupos lesionados, sham y naive, en animales juveniles y adultos (Tabla 2). Así mismo, la evaluación de la ansiedad mediante el modelo de enterramiento no mostró cambios conductuales de tipo depresión. Se comparó el tiempo acumulado de enterramiento de los grupos lesionados, sham y naive, en animales juveniles y adultos, y se observó que no hubo diferencias significativas en ninguna de las dos edades (Tabla 2).

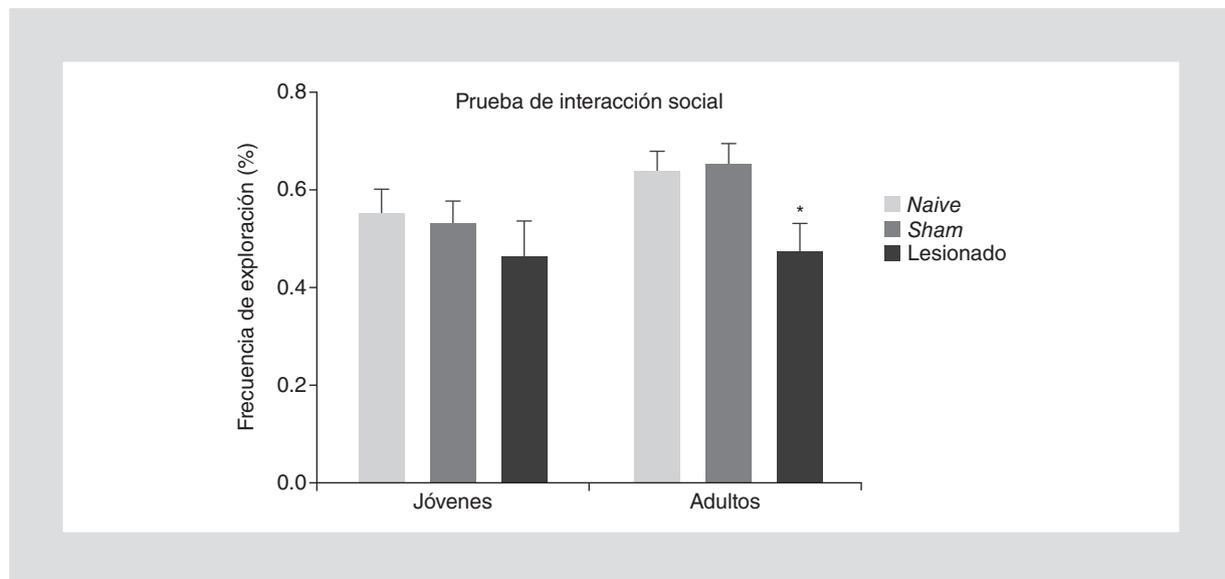


Figura 3. Efecto de la LNHV en el tiempo de contacto social, en el grupo de ratas juveniles de 45 días y adultas de 90 días. * $p < 0.05$ vs grupo control a la misma edad. Prueba de $t^* < 0.005$ frente al grupo control ($n = 8$ por grupo).

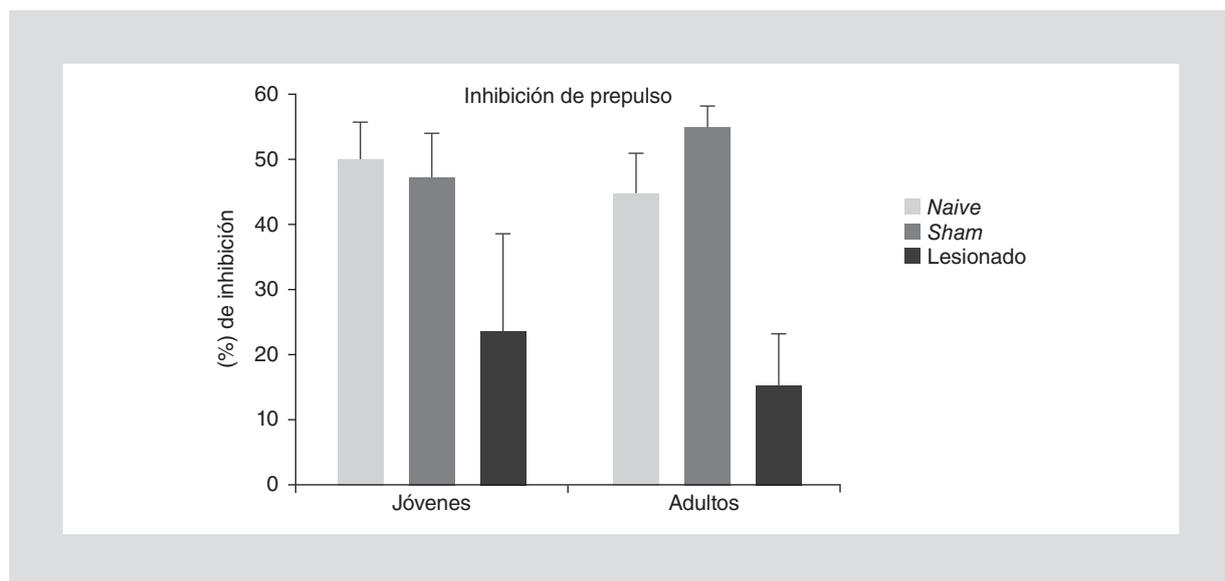


Figura 4. Efecto de la LNHV en la prueba de inhibición de prepulso, en el grupo de ratas juveniles de 45 días y adultas de 90 días. $p < 0.05$ vs grupo control a la misma edad. Prueba de $t < 0.005$ frente al grupo control ($n = 8$ por grupo).

Finalmente, se evaluó la nocicepción por medio de la prueba de plancha caliente. En esta prueba no se detectaron diferencias estadísticas entre el grupo juvenil y el grupo de animales adultos, comparados con sus respectivos controles (el grupo de animales falsamente lesionados y el grupo sin manipulación) (Tabla 3).

Adicionalmente se muestra una microfotografía representativa del hipocampo de ratas 45 juveniles días de edad lesionadas *versus sham* y del hipocampo de ratas adultas 90 días de edad lesionadas y *sham*; se muestra la lesión provocada por el ácido iboténico (Fig. 5).

Discusión

El objetivo del trabajo fue analizar las diferencias conductuales dependientes de la edad relacionadas con la esquizofrenia en el modelo de LNHV. Las conductas evaluadas en el modelo de LNHV demuestran una especificidad conductual asociada con la esquizofrenia, ya que en la prueba de nado forzado y la de enterramiento defensivo no se observaron características de depresión y ansiedad; todas las mediciones se compararon con el grupo de animales falsamente

Tabla 2. Comportamiento de enterramiento defensivo y nado forzado en el grupo de animales juveniles y adultos lesionados en el hipocampo ventral

	Juveniles	Adultos
Enterramiento defensivo (s)		
<i>Naive</i>	62.00 ± 29.27	99.00 ± 96.63
<i>Sham</i>	104.0 ± 83.93	125.75 ± 79.35
Lesionado	96.50 ± 69.70	119.45 ± 90.08
Nado forzado (s)		
<i>Naive</i>	64.41 ± 41.29	54.83 ± 22.11
<i>Sham</i>	75.00 ± 34.46	64.13 ± 30.27
Lesionado	72.36 ± 45.04	48.41 ± 33.53

Los datos se expresan como valores promedio ± S.E.M.

Tabla 3. Nocicepción en los grupos de ratas juveniles y adultas lesionadas en el hipocampo neonatal en el día postnatal (EP 7), en comparación con sus controles

Prueba de plancha caliente	Juveniles	Adultos
Escalamiento		
<i>Naive</i>	2.200 ± 0.447	4.400 ± 1.140
<i>Sham</i>	2.200 ± 0.632	4.111 ± 1.364
Lesionado	2.545 ± 0.820	4.400 ± 1.265
Lamida de patas		
<i>Naive</i>	6.600 ± 4.278	8.400 ± 1.140
<i>Sham</i>	6.900 ± 3.178	8.125 ± 1.553
Lesionado	5.364 ± 1.120	10.444 ± 2.404
Escape		
<i>Naive</i>	8.00 ± 2.00	8.400 ± 1.140
<i>Sham</i>	8.30 ± 2.83	8.125 ± 1.55
Lesionado	6.81 ± 1.40	10.444 ± 2.40

Los datos se expresan como valores promedio ± S.E.M.

lesionados y el grupo sin manipulación (*sham*), y se realizaron en dos etapas: juvenil (45 días) y adulta (90 días) (Tablas 2 y 3).

En la etapa adulta se observaron conductas relacionadas con la esquizofrenia, como hiperlocomoción, déficit de memoria, pérdida de IS e inhibición de pre-pulso; los resultados mostraron que las conductas relacionadas con la esquizofrenia se presentaron únicamente en el grupo de animales adultos lesionados.

En la etapa juvenil, las ratas lesionadas presentaron comportamientos muy parecidos a las no manipuladas (*naive*) y a las falsamente lesionadas (*sham*).

La prueba de coordinación motora fue importante para observar la motricidad del animal; en este caso, la utilizamos para determinar si la operación neonatal no interfería en la motricidad y locomoción del animal a evaluar, ya que si presentaba anomalías, éste

se descartaba del estudio²³. La prueba de rotarod nos mostró que la lesión realizada en el hipocampo ventral neonatal no afectó a la coordinación motriz de la mayoría de los animales, ya que los animales respondieron adecuadamente a la prueba sin caer.

La hiperlocomoción es considerada una conducta relacionada con los síntomas positivos de la esquizofrenia (indicador de *schizophrenia-like*)⁴⁰, una de las características que más se han evaluado en los modelos animales de esquizofrenia, ya sea inducidos farmacológicamente o con el silenciamiento o mutación genética^{30,34}.

Con la prueba de campo abierto fue posible observar hiperlocomoción en el grupo de animales adultos lesionados, mientras que el de animales juveniles lesionados sólo mostró tendencias a incrementar (Fig. 1). La actividad locomotora es el parámetro que más se

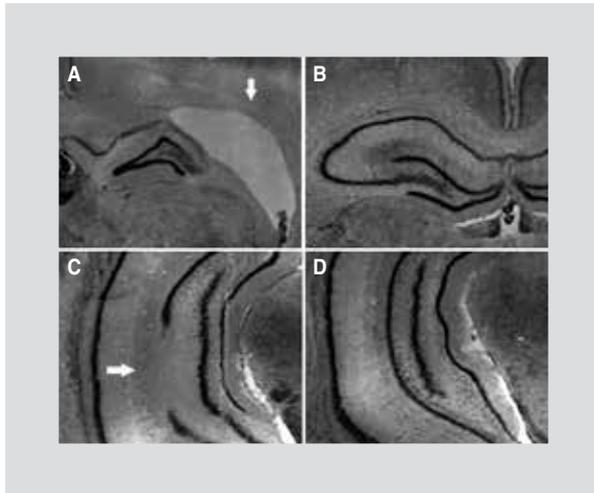


Figura 5. Verificación de la LNHV en ratas juveniles y adultas. En las lesiones representativas, localizadas en los grupos de ratas sham y lesionadas, se muestran cortes histológicos de ratas juveniles (A y B) y adultas (C y D). La fotografía A muestra un corte coronal del cerebro lesionado de rata juvenil mientras que en la B se ilustra el de un animal falsamente lesionado. En la fotografía C se muestra un corte de cerebro de animal lesionado adulto y en la D, el de un animal adulto falsamente lesionado. Las flechas indican la lesión en ambos paneles.

ha evaluado en el modelo de LNHV, y se ha medido en varias edades. Trabajos previos reportan hiperlocomoción en animales adultos⁴¹⁻⁴³, pero pocos trabajos han estudiado la hiperlocomoción en animales jóvenes. En nuestro caso, observamos que las ratas juveniles lesionadas presentaban tendencias a incrementar la locomoción, pero ésta no fue significativa. Cabe mencionar que Lipska, et al. (2000) y Al-Amin, et al. compararon también animales con estas edades y encontraron que ambos grupos presentaban hiperlocomoción, pero en estos trabajos la hiperlocomoción de los animales jóvenes era menor que la observada en los animales adultos. Por lo tanto, es posible que la hiperlocomoción se presente en animales juveniles, pero, dependiendo de la forma de registro, se pueden encontrar o no diferencias estadísticamente significativas^{19,45}.

Respecto a la IS, uno de los síntomas negativos más representativos de la esquizofrenia es el deterioro de la sociabilidad o la incapacidad de IS. Es interesante señalar que la reducción de esta conducta también se ha observado en modelos farmacológicos de esquizofrenia. Por ejemplo, en un modelo en el que se administró feniliclidina de manera crónica se observó un decremento significativo en la IS en animales adultos tratados con este fármaco^{46,47}. En el modelo de LNHV se ha reportado un decremento en la IS en ratas lesionadas adultas¹⁹, pero pocos trabajos han analizado si

hay diferencias dependientes de la edad. En el presente trabajo encontramos que el grupo de animales adultos con LNHV pierden el interés por interactuar con el otro roedor. El análisis estadístico muestra una reducción significativa de la IS del grupo de ratas adultas lesionadas. Sin embargo, en animales jóvenes de 45 días de edad se observan niveles de IS similares a los que presentan los animales controles (*sham* o *naive*) de la misma edad (Fig. 3).

En lo referente al reconocimiento de objetos, el deterioro cognitivo, reflejado como una pérdida de memoria de trabajo, es una característica representativa de la esquizofrenia⁴⁸. En el modelo de LNHV se presenta un deterioro posiblemente relacionado con el daño en la corteza prefrontal, derivado de la lesión en el hipocampo ventral en edad neonatal⁴⁷. En esta prueba, el grupo de animales adultos lesionados presentó pérdida de memoria; el tiempo de la exploración del objeto no familiar fue muy similar o menor al tiempo de exploración del objeto familiar (Fig. 4). La pérdida de memoria únicamente se presentó en el grupo de animales adultos lesionados; el de animales juveniles presentó tendencias de déficit de memoria, pero los datos no fueron estadísticamente significativos. Otros autores han medido la memoria mediante el laberinto radial o en T; es posible que con estas pruebas el animal se exponga a más estrés que el que se le produce con la prueba de reconocimiento de objetos. Además, estas pruebas miden la memoria a largo plazo y en nuestro caso, con la prueba de reconocimiento de objetos, sólo medimos la memoria de trabajo a corto plazo.

En cuanto a la prueba de inhibición del prepulso sensorial, la esquizofrenia está asociada con anomalías en el procesamiento de la información y atención; la prueba de inhibición del prepulso evalúa la capacidad de respuesta del individuo ante el estímulo auditivo, así como su procesamiento¹⁹. En nuestros resultados observamos que la inhibición del prepulso sensorial sólo se presentó en el grupo de ratas adultas lesionadas; el grupo de animales juveniles lesionados no presentó diferencias estadísticamente significativas con respecto a sus controles (Fig. 4). En pacientes con esquizofrenia, se establece que presentan una reducción del prepulso sensorial derivado posiblemente de la dificultad de filtrar sonidos o la manera en que éstos los traducen o filtran⁴⁸. Esta prueba se ha evaluado en trabajos anteriores en modelos animales para esquizofrenia, como prueba importante de la enfermedad^{33,35}, y se ha encontrado, en la mayoría de los animales, un déficit en la inhibición del prepulso.

La prueba de nocicepción mide el dolor, aunque se sabe que los pacientes con esquizofrenia presentan una disminución de la sensibilidad al dolor⁴⁹. En el modelo de LNHV no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles, por lo que posiblemente la lesión no afectó a la nocicepción de los animales. Estos resultados son similares a los reportados anteriormente por Al-Amin, et al. (a pesar de encontrar una reducción en las latencias, sus datos no fueron del todo concluyentes), así como por los reportados en pacientes con esquizofrenia⁵⁰.

Los modelos de ansiedad y depresión fueron aplicados en el modelo de LNHV para evaluar la predisposición de adquirir estas conductas de forma posterior a la LNHV. Las pruebas se realizaron en el grupo de animales juveniles y adultos lesionados. Los resultados de las pruebas nos revelaron que no se encontraron diferencias entre los grupos lesionados y los falsamente lesionados. Se sabe que la depresión y la ansiedad en pacientes con esquizofrenia no son una característica inherente de la enfermedad, ya que si éstas se presentan en pacientes ordinariamente es de manera atípica, y de forma inconsistente⁵¹, por lo que nuestro interés estaba enfocado en observar la respuesta de los animales lesionados ante paradigmas de ansiedad y depresión. Wood, et al., en 2003, reportaron mayor ansiedad en animales lesionados, determinada a través del laberinto elevado, al igual que Sams-Dodd, et al. (1997); sin embargo, no se había estudiado la ansiedad con el modelo de enterramiento defensivo^{52,53}. El modelo de enterramiento defensivo se basa en la característica instintiva de enterrar objetos adversos, considerando que a mayor enterramiento, mayor ansiedad; los animales con LNHV evaluados no respondieron a este paradigma. De la misma forma, Lipska, et al., en 1993, reportaron que el LNHV no presentaba características de depresión con el modelo de nado forzado en animales lesionados de 35, 56 y 70 días⁵⁴, resultados similares a los obtenidos en este trabajo.

Los resultados conductuales de los animales con LNHV nos indicaron que sólo en la etapa adulta se observan cambios conductuales parecidos a la esquizofrenia (*schizophrenia-like*). Posiblemente las conductas sólo se observaron en la edad adulta debido al fenómeno de *pruning* o poda neuronal; se sabe que, en ratas, la poda neuronal se realiza entre los días 44 y 46, por lo que a los 45 días aún no se observan los efectos de esta poda; sin embargo, a los 90 días se observan claramente las conductas de tipo esquizofrenia

(hiperlocomoción, deterioro de la memoria, reducción de la IS, inhibición de prepulso), conductas parecidas a las que se presentan en los pacientes con esquizofrenia⁵⁵. En este mismo sentido, se ha visto que en pacientes con esquizofrenia, después del proceso de poda neuronal, la mayoría de los síntomas de la esquizofrenia se observan con mayor claridad, coincidiendo justo con el momento después de que se haya realizado este proceso, razón por la cual en los adolescentes resulta difícil observar con certeza los síntomas relacionados con la esquizofrenia, por lo cual el diagnóstico de la enfermedad se realiza tardíamente⁵⁶. Es importante no perder de vista este fenómeno en el modelo animal de esquizofrenia; si las conductas sólo se presentaron en la edad adulta, posiblemente el fenómeno de *pruning* también se pudiera estar presentando en el modelo de LNHV. Feinberg, et al. consideran que la esquizofrenia es generada por una alteración en la poda neuronal durante la adolescencia y Stevens propone que es posible una reinervación y conexión sináptica aberrante posterior a una lesión previa. En el mismo sentido, hay autores que argumentan que en el modelo de LNHV algunas conductas se observan mejor en la edad adulta⁵⁷⁻⁵⁹.

Los cortes histológicos de los dos grupos de animales trabajados (lesionados y *sham*) se compararon entre sí; éstos fueron expuestos a las mismas condiciones y pruebas conductuales. En los cerebros del grupo de ratas lesionadas se presentó una pérdida de células por atrofia, probablemente derivada del daño por la lesión neonatal por el ácido iboténico y en respuesta a una posible regeneración, en comparación con los cortes del grupo de ratas *sham*. Sin embargo, la lesión que se observó en los cortes histológicos del grupo de ratas juvenil fue mayor. Se observaron cavidades o regiones ausentes de células, comparadas con los cortes de los grupos ratas *sham*. Probablemente estas cavidades se observaron más grandes porque el lapso de tiempo pasado desde la lesión fue más corto, y su cerebro tuvo menos tiempo para regenerar otras células, por lo que la lesión se observó más grande en el grupo de ratas juveniles en comparación con el daño observado en el grupo de ratas adultas. Se hace necesario contar con más experimentación en el futuro (Fig. 5).

Conclusiones

El uso de modelos animales para esquizofrenia es muy reciente y aún estamos lejos de contar con el modelo animal ideal. Sin embargo, los modelos animales

con los que se cuenta en la actualidad nos permiten modelar algunos de los síntomas y características en la enfermedad, condición que nos permitirá estudiar la etiología, los elementos moleculares, genómicos y proteómicos que podrían estar alterados en los pacientes, de modo que será posible encontrar nuevos genes candidatos para esta enfermedad que nos conduzcan a la búsqueda de nuevas técnicas diagnósticas moleculares y eventualmente a nuevas terapias o a mejorar las ya existentes.

La lesión realizada en el hipocampo ventral en neonatos incide no sólo en el cerebro de las ratas lesionadas, sino también en su neurodesarrollo, ya que las conductas de tipo esquizofrenia se consolidan únicamente en el grupo de ratas adultas lesionadas.

Es posible que la LNHV se encuentre clínicamente silente hasta el final de la adolescencia, pues los síntomas clínicos de la esquizofrenia en pacientes se observan a finales de la adolescencia o en el adulto joven.

Bibliografía

- Msghina M, Liberg B. [Schizophrenia, neurodegeneration and antipsychotic agents]. *Lakartidningen*. 2009;106(47):3183.
- Ardizzone I, Marconi A, Nardecchia F. [Obstetric complications and early-onset schizophrenia: a case-control study]. *Riv Psichiatr*. 2009;44(2):117-21.
- Gioiosa L, Iannitelli A, Aloe L. Stress, anxiety schizophrenia and neurotrophic factors: the pioneer studies with nerve growth factor. *Riv Psichiatr*. 2009;44(2):88-94.
- Tovilla CA, Camarena B, Apiquian R, Nicolini H. [Association study and meta-analysis of the apolipoprotein gene and schizophrenia]. *Gac Med Mex*. 2008;144(2):79-83.
- Fresan A, Apiquian R, Ulloa R, Nicolini H. Reliability study of the translation into Spanish of the PRIME Screen Questionnaire for Prodromic Symptoms. *Actas Esp Psiquiatr*. 2007;35(6):368-71
- Snowden A. Classification of schizophrenia. Part one: the enduring existence of madness. *Br J Nurs*. 2009;18(19):1176-80.
- Urraca N, Camarena B, Aguilar A, et al. Association study of DRD3 gene in schizophrenia in mexican sib-pairs. *Psychiatric Res*. 2011;190(2-3):367-8.
- Charych EI, Liu F, Moss SJ, Brandon NJ. GABA(A) receptors and their associated proteins: implications in the etiology and treatment of schizophrenia and related disorders. *Neuropharmacology*. 2009;57(5-6):481-95.
- Contreras J, Camarena B, Hare L, et al. The serotonin transporter 5-HTTPR polymorphism is associated with current and lifetime depression in persons with chronic psychotic disorders. *Acta Psychiatr Scand*. 2009;119(2):117-27.
- Ulloa RE, Nicolini H, Fernández-Guasti A. Age differences in an animal model of obsessive-compulsive disorder: participation of dopamine: dopamine in an animal model of OCD. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004;78(4):661-6.
- Ulloa RE, Nicolini H, Fernández-Guasti A. Sex differences on spontaneous alternation in prepubertal rats: implications for an animal model of obsessive-compulsive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004;28(4):687-92.
- Fernández-Guasti A, Ulloa RE, Nicolini H. Age differences in the sensitivity to clomipramine in an animal model of obsessive-compulsive disorder. *Psychopharmacology*. 2003;166(3):195-201.
- Ulloa RE, Nicolini H, Avila M, Fernández-Guasti A. Age onset subtypes of obsessive compulsive disorder: differences in clinical response to treatment with clomipramine. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2007;17(1):85-96.
- Willner P. *Handbook of depression and anxiety*. Abiological approach. Nueva York: Maercl Dekker; 1994.
- Genis AD, Lopéz-Rubalcava C. ¿Es posible modelar esquizofrenia en un modelo animal? *El Residente*. 2011;6(2):120-6.
- Powell SB. Models of neurodevelopmental abnormalities in schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci*. 2010;4:435-81.
- Lipska BK, Jaskiw GE, Weinberger DR. Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1993;9(1):67-75.
- Le Pen G, Grottick AJ, Higgins GA, Martin JR, Jenck F, Moreau JL. Spatial and associative learning deficits induced by neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats: further evaluation of an animal model of schizophrenia. *Behav Pharmacol*. 2000;11(3-4):257-68.
- Lipska BK, Weinberger DR. To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*. 2000;23(3):223-39.
- Genis-Mendoza AD, Gallegos-Silva RI, López-Casamichana M, López-Rubalcava C, Nicolini H. Gene expression profiles of nucleus accumbens, prefrontal cortex and hippocampus in an animal model of schizophrenia: a proposal for candidate genes. *Actas Esp Psiquiatr*. 2013;41(3):154-63.
- Zimmermann M. Ethical principles for the maintenance and use of animals in neuroscience research. *Neurosci Lett*. 1987;73(1):1.
- Lipska BK, Jaskiw GE, Chrapusta S, Karoum F, Weinberger DR. Ibotenic acid lesion of the ventral hippocampus differentially affects dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens and prefrontal cortex in the rat. *Brain Res*. 1992;585(1-2):1-6.
- López-Rubalcava C, Fernández-Guasti A, Urbán-Holmgren R. Age-dependent differences in the rat's conditioned defensive burying behavior: effect of 5-HT1A compounds. *Dev Psychobiol*. 1996;29(2):157-69.
- Barros D, Amaral OB, Izquierdo I, et al. Behavioral and genoprotective effects of Vaccinium berries intake in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2006;84(2):229-34.
- Mello PB, Benetti F, Cammarota M, Izquierdo I. Effects of acute and chronic physical exercise and stress on different types of memory in rats. *An Acad Bras Cienc*. 2008;80(2):301-9.
- Zendehrouh S, Bakouie F, Gharibzadeh S. Modeling schizophrenic-like neuronal patterns using nonlinear delayed differential equations. *Comput Biol Med*. 2009;39(11):1058-62.
- Chen T, Guo ZP, Jiao XY, et al. Peoniflorin suppresses tumor necrosis factor- α induced chemokine production in human dermal microvascular endothelial cells by blocking nuclear factor- κ B and ERK pathway. *Arch Dermatol Res*. 2011;303(5):351-60.
- Flores G, Alquicer G, Silva-Gómez AB, et al. Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Neuroscience*. 2005;133(2):463-70.
- Silva-Gómez AB, Bermudez M, Quirion R, Srivastava LK, Picazo O, Flores G. Comparative behavioral changes between male and female postpubertal rats following neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Brain Res*. 2003;973(2):285-92.
- Miwa M, Tsuboi M, Noguchi Y, Enokishima A, Nabeshima T, Hiramatsu M. Effects of betaine on lipopolysaccharide-induced memory impairment in mice and the involvement of GABA transporter 2. *J Neuroinflammation*. 2011;8:153.
- Castner SA, Goldman-Rakic PS, Williams GV. Animal models of working memory: insights for targeting cognitive dysfunction in schizophrenia. *Psychopharmacology*. 2004;174(1):111-25.
- Huerta-Rivas A, López-Rubalcava C, Sánchez-Serrano SL, Valdez-Tapia M, Lamas M, Cruz SL. Toluene impairs learning and memory, has antinociceptive effects, and modifies histone acetylation in the dentate gyrus of adolescent and adult rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;102(1):48-57.
- Ago Y. [Beneficial effect of galantamine on sensory information-processing deficits]. *Yakugaku Zasshi*. 2010;130(10):1305-10.
- Peleg-Raibstein D, Knuesel I, Feldon J. Amphetamine sensitization in rats as an animal model of schizophrenia. *Behav Brain Res*. 2008;191(2):190-201.
- Swerdlow NR, Taaid N, Oostwegel JL, Randolph E, Geyer MA. Towards a cross-species pharmacology of sensorimotor gating: effects of amantadine, bromocriptine, pergolide and ropinirole on prepulse inhibition of acoustic startle in rats. *Behav Pharmacol*. 1998;9(5-6):389-96.
- Mostalac-Preciado CR, de Gortari P, López-Rubalcava C. Antidepressant-like effects of mineralocorticoid but not glucocorticoid antagonists in the lateral septum: interactions with the serotonergic system. *Behav Brain Res*. 2011;223(1):88-98.
- López-Rubalcava C, Hen R, Cruz SL. Anxiolytic-like actions of toluene in the burying behavior and plus-maze tests: differences in sensitivity between 5-HT (1B) knockout and wild-type mice. *Behav Brain Res*. 2000;115(1):85-94.
- Yaksh TL. Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1997;41(1 Pt 2):94-111.

39. Salter MW, Pitcher GM. Dysregulated Src upregulation of NMDA receptor activity: a common link in chronic pain and schizophrenia. *FEBS J.* 2012;279(1):2-11.
40. Sigurdsson T, Stark KL, Karayiorgou M, Gogos JA, Gordon JA. Impaired hippocampal-prefrontal synchrony in a genetic mouse model of schizophrenia. *Nature.* 2010;464(7289):763-7.
41. Berg SA, Chambers RA. Accentuated behavioral sensitization to nicotine in the neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia. *Neuropharmacology.* 2008;54(8):1201-7.
42. Flores G, Alquicer G, Silva-Gómez AB, et al. Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Neuroscience.* 2005;133(2):463-70.
43. Alquicer G, Morales-Medina JC, Quirion R, Flores G. Postweaning social isolation enhances morphological changes in the neonatal ventral hippocampal lesion rat model of psychosis. *J Chem Neuroanat.* 2008;35(2):179-87.
44. Rüter K, Staab D, Magdorf K, Bisson S, Wahn U, Paul K. The 12-min walk test as an assessment criterion for lung transplantation in subjects with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2003;2(1):8-13.
45. Al-Amin HA, Weinberger DR, Lipska BK. Exaggerated MK-801-induced motor hyperactivity in rats with the neonatal lesion of the ventral hippocampus. *Behav Pharmacol.* 2000;11(3-4):269-78.
46. Lee PR, Brady DL, Shapiro RA, Dorsa DM, Koenig JI. Social interaction deficits caused by chronic phencyclidine administration are reversed by oxytocin. *Neuropsychopharmacology.* 2005;30(10):1883-94.
47. Lipska BK, Weinberger DR. A neurodevelopmental model of schizophrenia: neonatal disconnection of the hippocampus. *Neurotox Res.* 2002;4(5-6):469-75.
48. Flores G, Alquicer G, Silva-Gómez AB, et al. Alterations in dendritic morphology of prefrontal cortical and nucleus accumbens neurons in post-pubertal rats after neonatal excitotoxic lesions of the ventral hippocampus. *Neuroscience.* 2005;133(2):463-9.
49. Al-Amin HA, Atweh SF, Jabbur SJ, Saadé NE. Effects of ventral hippocampal lesion on thermal and mechanical nociception in neonates and adult rats. *Eur J Neurosci.* 2004;20(11):3027-34.
50. de la Fuente-Sandoval C, Favila R, Gómez-Martín D, León-Ortiz P, Graff-Guerrero A. Neural response to experimental heat pain in stable patients with schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 2012;46(1):128-34.
51. Buckley PF, Miller BJ, Lehrer DS, Castle DJ. Psychiatric comorbidities and schizophrenia. *Schizophr Bull.* 2009;35(2):383-402.
52. Wood GK, Quirion R, Srivastava LK. Early environment contributes to developmental disruption of MPFC after neonatal ventral hippocampal lesions in rats. *Synapse.* 2003;50(3):223-32.
53. Sams-Dodd F, Lipska BK, Weinberger DR. Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. *Psychopharmacology.* 1997;132(3):303-10.
54. Lipska BK, Weinberger DR. Delayed effects of neonatal hippocampal damage on haloperidol-induced catalepsy and apomorphine-induced stereotypic behaviors in the rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 1993;75(2):213-22.
55. Andersen SL, Thompson AT, Rutstein M, Hostetter JC, Teicher MH. Dopamine receptor pruning in prefrontal cortex during the periadolescent period in rats. *Synapse.* 2000;37(2):167-9.
56. Teicher MH, Andersen SL, Hostetter JC. Evidence for dopamine receptor pruning between adolescence and adulthood in striatum but not nucleus accumbens. *Brain Res Dev Brain Res.* 1995;89(2):167-72.
57. Feinberg I. Cortical pruning and the development of schizophrenia. *Schizophr Bull.* 1990;16(4):567-70.
58. Feinberg I, de Bie E, Davis NM, Campbell IG. Topographic differences in the adolescent maturation of the slow wave EEG during NREM sleep. *Sleep.* 2011;34(3):325-33.
59. Stevens JR. Abnormal reinnervation as a basis for schizophrenia: a hypothesis. *Arch Gen Psychiatry.* 1992;49(3):238-43. Erratum in: *Arch Gen Psychiatry.* 1992;49(9):708.