

OP563  
G3234e



UNIVERSIDAD  
DE LOS ANDES  
MÉRIDA VENEZUELA

REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE CIENCIAS

POSTGRADO EN BIOLOGÍA CELULAR

*Laboratorio de Fisiología de la Conducta*

*Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, NICHD-NIH*

**¿ES EL AMBIENTE O LA GENÉTICA?**

**ROL DEL SISTEMA GABA Y DOPAMINA EN LOS**

**DESORDENES MENTALES:**

**Casos de Estudio: Depresión y Esquizofrenia**

*Este trabajo doctoral fue realizado como requisito para*

*optar al grado de Doctor en Biología Celular*

Autor: Miguel Skirzewski Prieto

Tutor: Dr. Luis Hernández

Co-tutor: Dr. Andrés Buonanno

Mérida, Junio de 2013



## Agradecimientos

- A Laura por su apoyo, comprensión, amor, paciencia y compañía.
- Al Dr. Luis Hernández por su orientación durante el desarrollo de mi disertación doctoral.
- Al Dr. Andrés Buonanno por su orientación y abrirme las puertas de su laboratorio.
- A la Dra. Luisana Avilán por su apoyo y versatilidad en la solución de problemas durante mi estadía en el post-grado de Biología Celular.
- A la Dra. Marínés Longart por aceptar participar en la evaluación de este trabajo.
- Al Laboratorio de Fisiología de la Conducta en la Universidad de los Andes y al Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo, donde se realizó el trabajo experimental de disertación doctoral.
- A la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado y a el National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) del National Institutes of Health (NIH) por el financiamiento parcial de mis estudios doctorales.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

	<i>Página</i>
1. INTRODUCCIÓN	(1)
2. MARCO TEÓRICO	(2)
2.1. Sistema Mesocorticolímbico y emoción	(2)
2.2. Sistema GABAérgico	(6)
2.3. Relación entre el sistema mesocorticolímbico y depresión mayor	(10)
2.4. Sistema dopamina	(11)
2.5. Sistema NRG/ErbB	(13)
2.6. Relación entre el sistema Neuregulina1/ErbB4 y la dopamina CA1-dorso hipocampal con desordenes esquizoideos	(14)
3. HIPÓTESIS	(20)
3.1. Hipótesis A: Relación del sistema GABAérgico ventro-palidal con conductas de depresión	(20)
3.2. Hipótesis B: Mecanismo del sistema NRG1/ErbB4 para inducir la activación del sistema dopaminérgico en el hipocampo dorsal y su relación con conductas psicóticas	(21)
4. OBJETIVOS	(21)
4.1. Objetivos generales: Hipótesis A	(21)
4.2. Objetivos generales: Hipótesis B	(22)
4.3. Objetivos específicos	(22)
4.3.1. Hipótesis A	(22)
4.3.2. Hipótesis B	(23)
5. MÉTODOS	(24)
5.1. Animales	(24)
5.2. Reactivos químicos y biológicos	(24)
5.3. Cirugía	(25)
5.3.1. Ratas	(25)
5.3.2. Ratones	(25)
5.4. Microdiálisis intracerebral	(26)
5.4.1. Ventro-pálido de ratas	(26)
5.4.2. Hipocampo CA1 dorsal de ratones	(27)
5.5. Microinyecciones intracerebrales	(29)
5.6. Pruebas conductuales	(30)

5.6.1. Prueba de nado forzado	(30)
5.6.1.1. Ratas	(30)
5.6.1.2. Ratones	(31)
5.6.2. Pinchazo ligero en la cola	(31)
5.6.2.1. Ratas	(31)
5.6.2.2. Ratones	(31)
5.6.3. Prueba de preferencia por la sacarosa	(31)
5.6.4. Laberinto elevado en cruz	(32)
5.6.5. Prueba de aversión a comer en ambientes novedosos	(32)
5.6.6. Prueba de campo abierto	(33)
5.6.6.1. Ratas	(33)
5.6.6.2. Ratones	(33)
5.6.7. Prueba de sensibilidad por la anfetamina	(34)
5.7. Métodos analíticos	(34)
5.7.1. Cromatografía electrocinética micelar acoplada a detección de fluorescencia inducida por laser	(34)
5.7.2. HPLC-ECD	(35)
5.7.3. RT-PCR	(36)
5.7.4. Western blot	(39)
5.8. Análisis histológicos	(41)
6. RESULTADOS	(41)
6.1. Factores ambientales que afectan la conducta en ratas	(41)
6.1.1. El nado forzado incrementa la actividad GABAérgica en el VP por un mecanismo diferente al inducido por la prueba de pinchazo ligero en la cola	(41)
6.1.1.1. Efecto del nado forzado sobre los niveles extracelulares de GABA en el ventro-pálido	(41)
6.1.1.2. Efecto del pinchazo ligero en la cola sobre los niveles extracelulares de GABA en el ventro-pálido	(42)
6.1.2. La vigabatrina potencia la activación del sistema GABAérgico del VP	(42)
6.1.3. El tono GABAérgico del VP determina el grado de motivación emocional	(43)
6.1.3.1. Efecto de microinyecciones de vigabatrina, bicuculina y vehículo en el VP sobre las conductas de motivación en el nado forzado	(43)
6.1.3.2. Efecto de microinyecciones de vigabatrina, bicuculina y vehículo en el VP sobre la preferencia por la solución de sacarosa	(44)

6.1.3.3. Efecto de microinyecciones de vigabatrina, bicuculina y vehículo en el VP sobre la actividad locomotora	(45)
6.1.4. El nado forzado y la prueba de pinchazo ligero en la cola determinan cambios rápidos selectivos en la expresión de ARNm de subunidades de GABA-A y cambios lentos en la expresión de su correspondiente proteína	(45)
6.1.4.1. Patrón de expresión de ARNm de subunidades para GABA-A, antes, durante y después del nado forzado y del pinchazo ligero en la cola	(45)
6.1.4.2. Patrón de expresión de proteínas para subunidades de GABA-A, antes, durante y después del nado forzado y del pinchazo ligero en la cola	(46)
6.2. Mecanismos genéticos que afectan la conducta en ratones	(52)
6.2.1. La ablación selectiva de la expresión de ErbB4 en neuronas TH+ de ratones no genera fenotipos tipo esquizoides que si se presentan en ratones ErbB4 <sup>-/-</sup> ó PV <sup>+</sup> /ErbB4 <sup>-/-</sup>	(52)
6.2.1.1. Niveles de ansiedad basal de ratones TH-Cre ErbB4 <sup>floxed</sup>	(52)
6.2.1.2. Actividad locomotora basal de ratones TH-Cre ErbB4 <sup>floxed</sup>	(52)
6.2.1.3. Prueba de nado forzado	(53)
6.2.1.4. Prueba de sensibilidad por la amfetamina	(53)
6.2.2. El incremento en los niveles de DA en el CA1 del hipocampo dorsal dependientes de la señalización del sistema del sistema NRG1/ErbB4 está afectada en ratones ErbB4 <sup>-/-</sup> y TH-Cre ErbB4 <sup>floxed</sup> pero no en ratones PV-Cre ErbB4 <sup>floxed</sup>	(56)
6.2.3. Los terminales DA del CA1 del hipocampo dorsal de todos los genotipos de ratones estudiados son funcionales	(61)
6.2.4. La prueba de pinchazo ligero en la cola genera una hiper-respuesta DA en ratones PV-Cre erbB4 <sup>floxed</sup> pero no en ratones ErbB4 <sup>-/-</sup> y TH-Cre ErbB4 <sup>floxed</sup>	(62)
6.3. Análisis histológico	(70)
7. DISCUSIÓN	(70)
7.1. Fenómenos ambientales que generan fenotipos tipo depresivos en ratas	(70)
7.2. Impacto del genotipo sobre la función del sistema DA y fenotipos tipo-esquizoides	(78)
8. CONCLUSIÓN	(83)
9. REFERENCIAS	(84)

## ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Página</i>
<u>Tabla 1:</u> <i>Proyecciones dopaminérgicas en el sistema nervioso central</i>	(4)
<u>Tabla 2:</u> <i>Cebadores y condiciones de amplificación de amplificación por PCR para las subunidades GABA-A</i>	(38)
<u>Tabla 3:</u> <i>Tiempos totales de conductas de lucha e inmovilidad en ratas sometidas a la prueba de nado forzado y que recibieron microinyecciones de vigabatrina y bicuculina en el ventro-pálido</i>	(45)
<u>Tabla 4:</u> <i>Índice de expresión de ARNm de subunidades GABA-A en el VP de ratas sometidas al nado forzado o pinchazo ligero en la cola</i>	(49)
<u>Tabla 5:</u> <i>Radio de la actividad motora en ratones ErbB4<sup>-/-</sup> y controles luego de recibir diferentes dosis de anfetamina sistémicamente</i>	(54)
<u>Tabla 6:</u> <i>Radio de la actividad motora en ratones TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y controles luego de recibir diferentes dosis de anfetamina sistémicamente</i>	(54)
<u>Tabla 7:</u> <i>Radio de la actividad motora en ratones PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y controles luego de recibir diferentes dosis de anfetamina sistémicamente</i>	(54)
<u>Tabla 8:</u> <i>Niveles extracelulares basales de dopamina en el CA1 de ratones y porcentaje de variación luego de recibir un pulso de NRG1<math>\beta</math></i>	(56)
<u>Tabla 9:</u> <i>Niveles extracelulares basales de DOPAC en el CA1 de ratones y porcentaje de variación luego de recibir un pulso de NRG1<math>\beta</math></i>	(57)
<u>Tabla 10:</u> <i>Niveles extracelulares basales de HVA en el CA1 de ratones y porcentaje de variación luego de recibir un pulso de NRG1<math>\beta</math></i>	(57)

Tabla 11: *Porcentaje de incremento de dopamina extracelular en el CA1 de ratones que recibieron un pulso de KCl* (61)

Tabla 12: *Porcentaje de incremento de DOPAC extracelular en el CA1 de ratones que recibieron un pulso de KCl* (61)

Tabla 13: *Porcentaje de incremento de HVA extracelular en el CA1 de ratones que recibieron un pulso de KCl* (62)

Tabla 14: *Porcentaje de incremento de dopamina extracelular en el CA1 de ratones que fueron sometidos a una prueba de estrés agudo* (62)

Tabla 15: *Porcentaje de incremento de DOPAC extracelular en el CA1 de ratones que fueron sometidos a una prueba de estrés agudo* (63)

Tabla 16: *Porcentaje de incremento de HVA extracelular en el CA1 de ratones que fueron sometidos a una prueba de estrés agudo* (63)

## INDICE DE FIGURAS

	<i>Página</i>
<u>Figura 1:</u> <i>Sistema mesocorticolímbico de roedores</i>	(3)
<u>Figura 2:</u> <i>Receptor GABA-A</i>	(8)
<u>Figura 3:</u> <i>Receptor GABA-B</i>	(9)
<u>Figura 4:</u> <i>Sistema dopaminérgico</i>	(11)
<u>Figura 5:</u> <i>Receptores dopaminérgicos</i>	(12)
<u>Figura 6:</u> <i>Neuregulinas en el sistema nervioso central</i>	(13)
<u>Figura 7:</u> <i>Receptores ErbB</i>	(15)
<u>Figura 8:</u> <i>Sistema Cre-LoxP</i>	(19)
<u>Figura 9:</u> <i>Niveles basales e incremento de GABA en el ventro-pálido de ratas antes, durante y después del nado forzado</i>	(42)
<u>Figura 10:</u> <i>Incremento de GABA en el ventro-pálido de ratas durante la prueba de pinchazo ligero en la cola</i>	(43)
<u>Figura 11:</u> <i>Efecto de la vigabatrina sobre los niveles extracelulares de GABA en el ventro-pálido antes, durante y después de la prueba del nado forzado</i>	(44)
<u>Figura 12:</u> <i>Tiempos de inmovilidad de ratas que recibieron microinyecciones de vigabatrina o bicuculina en el ventro-pálido</i>	(47)
<u>Figura 13:</u> <i>Preferencia por la sacarosa en ratas que recibieron microinyecciones de vigabatrina o bicuculina en el ventro-pálido</i>	(48)

Figura 14: *Actividad locomotora de ratas que recibieron microinyecciones de vigabatrina o bicuculina en el ventro-pálido* (48)

Figura 15: *RT-PCR semicuantitativo para subunidades del receptor GABA-A en el ventro-pálido de ratas sometidas al nado forzado y pinchazo ligero en la cola* (50)

Figura 16: *Western blot de tres subunidades de GABA-A en el ventro-pálido de ratas sometidas a la prueba de nado forzado y pinchazo ligero en la cola* (51)

Figura 17: *Prueba de aversión a alimentarse en ambientes novedosos en ratones ErbB4<sup>-/-</sup>, TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y controles* (53)

Figura 18: *Radio de la actividad locomotora de ratones ErbB4<sup>-/-</sup>, TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y controles que recibieron inyecciones sistémicas de amfetamina* (55)

Figura 19: *Porcentaje de variación de los niveles extracelulares de dopamina en el CA1 de ratones ErbB4<sup>-/-</sup>, TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y controles que recibieron un pulso de NRG1 $\beta$*  (58)

Figura 20: *Porcentaje de variación de los niveles extracelulares de DOPAC en el CA1 de ratones ErbB4<sup>-/-</sup>, TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y controles que recibieron un pulso de NRG1 $\beta$*  (59)

Figura 21: *Porcentaje de variación de los niveles extracelulares de HVA en el CA1 de ratones ErbB4<sup>-/-</sup>, TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y controles que recibieron un pulso de NRG1 $\beta$*  (60)

Figura 22: *Porcentaje de variación de los niveles extracelulares de dopamina en el CA1 de ratones ErbB4<sup>-/-</sup>, TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y controles que recibieron un pulso de KCl* (64)

Figura 23: *Porcentaje de variación de los niveles extracelulares de DOPAC en el CA1 de ratones ErbB4<sup>-/-</sup>, TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y controles que recibieron un pulso de KCl* (65)

Figura 24: *Porcentaje de variación de los niveles extracelulares de HVA en el CA1 de ratones ErbB4<sup>-/-</sup>, TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y controles que recibieron un pulso de KCl* (66)

Figura 25: *Porcentaje de variación de los niveles extracelulares de dopamina en el CA1 de ratones ErbB4<sup>-/-</sup>, TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y controles sometidos a la prueba de pinchazo ligero en la cola* (67)

Figura 26: *Porcentaje de variación de los niveles extracelulares de DOPAC en el CA1 de ratones ErbB4<sup>-/-</sup>, TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y controles sometidos a la prueba de pinchazo ligero en la cola* (68)

Figura 27: *Porcentaje de variación de los niveles extracelulares de HVA en el CA1 de ratones ErbB4<sup>-/-</sup>, TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y controles sometidos a la prueba de pinchazo ligero en la cola* (69)

Figura 28: *Localización histológica de las sondas de microdiálisis y microinyectores en ratas* (71)

Figura 29: *Localización histológica de las sondas de microdiálisis en ratones* (73)

www.bdigital.ula.ve

## RESUMEN

El sistema mesocorticolímbico está constituido por diversas estructuras cerebrales que incluyen el estriado ventral, la amígdala, la corteza prefrontal, la corteza del cíngulum, el ventro-pálido (VP), el diencéfalo y el hipocampo. Estas estructuras controlan el procesamiento cognitivo, y regulan conductas motivacionales y de recompensa. Alteraciones en la función de este sistema pueden desencadenar desordenes mentales tales como la depresión y la esquizofrenia. En este trabajo hemos estudiado el impacto del ambiente sobre la función del sistema GABA a nivel del núcleo VP en ratas y su relación con las conductas tipo-depresivas. Por su parte, para evaluar el impacto del genotipo sobre los desordenes mentales, nosotros empleamos tres líneas de ratones transgénicos que presentan déficits en la función del sistema Neuregulina1 (NRG1) y su receptor ErbB4, el cual es un sistema que ha demostrado ser capaz de incrementar los niveles extracelulares de DA en el CA1 del hipocampo de ratas y estar asociado a la esquizofrenia. Nosotros encontramos un incremento agudo en los niveles extracelulares de GABA a nivel del VP de ratas durante la prueba de nado forzado y un aumento en el tono basal extracelular posterior a la prueba. Adicionalmente, la prueba de nado forzado resultó en cambios selectivos en la composición del receptor GABA-A, traducido esto en un incremento en la expresión de la subunidad delta y una reducción en la expresión de la subunidad gama2. Microinyecciones de vigabatrina en el VP potenciaron la manifestación de signos de anhedonia y de baja motivación, medidos estos por las pruebas de sacarosa y de nado forzado respectivamente. Por otra parte, ratones ErbB4<sup>-/-</sup> y ratones transgénicos condicionales parvalbumina<sup>+</sup>/ErbB4<sup>floxed</sup> manifestaron hipersensibilidad a dosis subumbrales de anfetamina o hiperreactividad dopaminérgica hipocampal al estrés psicológico. Interesantemente, solo los ratones ErbB4<sup>-/-</sup> y ratones transgénicos condicionales tirosina-hidroxilasa<sup>+</sup>/ErbB4<sup>floxed</sup> fueron incapaces de incrementar los niveles extracelulares de DA NRG1-dependiente a nivel del hipocampo dorsal. Esto sugiere que el receptor ErbB4 expresado en neuronas monoaminérgicas (tirosina-hidroxilasa<sup>+</sup>) es responsable de regular la liberación de DA NRG1-dependiente a nivel del hipocampo, mientras que el receptor ErbB4 expresado a nivel de interneuronas hipocampales parvalbumina<sup>+</sup> regulan la función dopaminérgica mesocorticolímbica en general, desencadenando fenotipos tipo-esquizoides en ratones. En general, nosotros demostramos que factores extrínsecos e intrínsecos pueden afectar de manera genérica la homeostasis del sistema mesocorticolímbico, desencadenando conductas anormales y comunes que han sido asociadas a desordenes mentales tales como la depresión conductual y la esquizofrenia.

**Palabras Claves:** GABA, dopamina, depresión, esquizofrenia, mesocorticolímbico, psiquiatría

## ABSTRACT

The mesocorticolimbic system is constituted by several brain structures such as ventral striatum, amygdala, prefrontal cortex, cingulate cortex, ventral pallidum (VP), diencephalon and hippocampus. These brain areas control cognitive processing, and regulate motivational behaviors and reward. Changes in the overall function of this system can trigger mental disorders, such as behavioral depression and schizophrenia. We studied the environmental impact on the VP-GABA function in rats and its relationship with depressive-like behaviors. Furthermore, in order to study the genetic impact on mental disorders, we used three different transgenic mice lines that exhibit deficits in Neuregulin1 (NRG1) and its ErbB4 receptor expression; which is a system that previously has demonstrated to enhance extracellular DA levels in the dorsal hippocampus, and be associated to schizophrenia. We found that the forced swim test in rats acutely enhanced extracellular VP-GABA levels and increased basal GABA tone post-test. In addition, the forced swim test triggered selective expression changes in the GABA-A subunit composition by increasing delta subunit and decreasing gamma2 subunit expression levels. Vigabatrin microinjections in the VP enhanced anhedonic and motivational behaviors seen in rats, tested by the sucrose preference and the forced swim tests, respectively. Mice totally devoid of ErbB4 (ErbB4<sup>-/-</sup>) or harboring a target deletion of ErbB4 in a subset of parvalbumin-expression GABAergic interneurons (PV<sup>+</sup>), exhibited schizophrenia-like phenotypes related to the DA function in the hippocampus and the brain overall, such as hyper-sensitivity to sub-doses of amphetamine or hyper-reactivity to acute psychological stress. Interestingly, acute NRG1 administration by reverse microdialysis failed to enhance extracellular DA levels in the dorsal hippocampus, relative to wild-type controls, only in cases where ErbB4 was totally knocked-out (ErbB4<sup>-/-</sup>) or targeted conditionally in tyrosine-expressing neurons (TH<sup>+</sup>), but was still active in mice where receptor was ablated in PV<sup>+</sup> neurons. In general, we demonstrated that extrinsic and intrinsic factors can generically affect the mesocorticolimbic homeostasis, disrupting behaviors related to mental disorders such as behavioral depression and schizophrenia.

**Keywords:** GABA, dopamine, depression, schizophrenia, mesocorticolimbic, psychiatry

## 1. INTRODUCCION

El término “emoción” tal y como fue definido por Papez (1937) implica dos condiciones: la manera de actuar y la manera de sentir. La primera es designada como una expresión emocional y la segunda como una experiencia emocional o sentimiento subjetivo [1]. Un desbalance en la función cerebral que afecta el comportamiento emocional “normal” en los humanos se considera como un “*Desorden Mental*” [2]. Por su parte, un desorden mental es arbitrariamente clasificado como un conjunto de conductas sintomáticas anormales relacionadas entre sí [2, 3]; con lo cual, los desordenes alimentarios, autismo, trastornos bipolares, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, desordenes de ansiedad, depresión mayor y esquizofrenia, por solo mencionar alguno de ellos, son todos ellos clasificados en general por el conjunto de síntomas específicos que en cada caso se expresa [2].

Sin embargo, un desorden mental constituye más que una simple colección de síntomas de conductas anormales. Este también implica un componente neurobiológico y/o ambiental que eventualmente puede desencadenar conductas anormales [3]. En este contexto, cambios en los factores intrínsecos (neurobiológicos, genéticos) y/o extrínsecos (epigenético, ambiental), y la manera como ellos se relacionan entre sí pueden conducir a cambios en la homeostasis normal cerebral, que eventualmente podría desencadenar un proceso psiquiátrico [4]. El conocimiento de estos factores es crítico para así comprender de mejor manera la etiología de los desordenes mentales y consecuentemente, ser capaces de desarrollar nuevos y mejores tratamientos psiquiátricos que deberían de re-establecer la homeostasis cerebral “normal” del paciente.

El método de clasificación actual para los desordenes mentales ha sido útil para diagnosticar personas con desordenes psiquiátricos; sin embargo, el mismo no necesariamente describe desordenes homogéneos. Por el contrario, el método actual refleja rutas finales comunes debidas a diferentes procesos pato-fisiológicos que involucran aspectos neurobiológicos y ambientales [2, 3]. De hecho, una de la mayores reservas respecto al método actual de clasificación es que el mismo adolece de un buen consenso respecto a los criterios neurobiológicos que deben acompañar las manifestaciones conductuales expresadas en los pacientes [4].

Papez en 1937 propuso que la expresión emocional es controlada por diversas estructuras neurales interconectadas conocidas genéricamente como el sistema límbico [1]. Sin embargo, la manera específica como estas estructuras claves están neuroanatómica y neurobiológicamente relacionadas entre sí y con el resto del sistema nervioso central y periférico es aun objeto de estudio. Es crítico conocer como diferentes componentes neuroanatómicos reguladores de la emoción funcionan entre sí y con su entorno (ambiente), a manera tal de obtener una profunda comprensión de la etiología de las emociones, y consecuentemente, de los desordenes mentales.

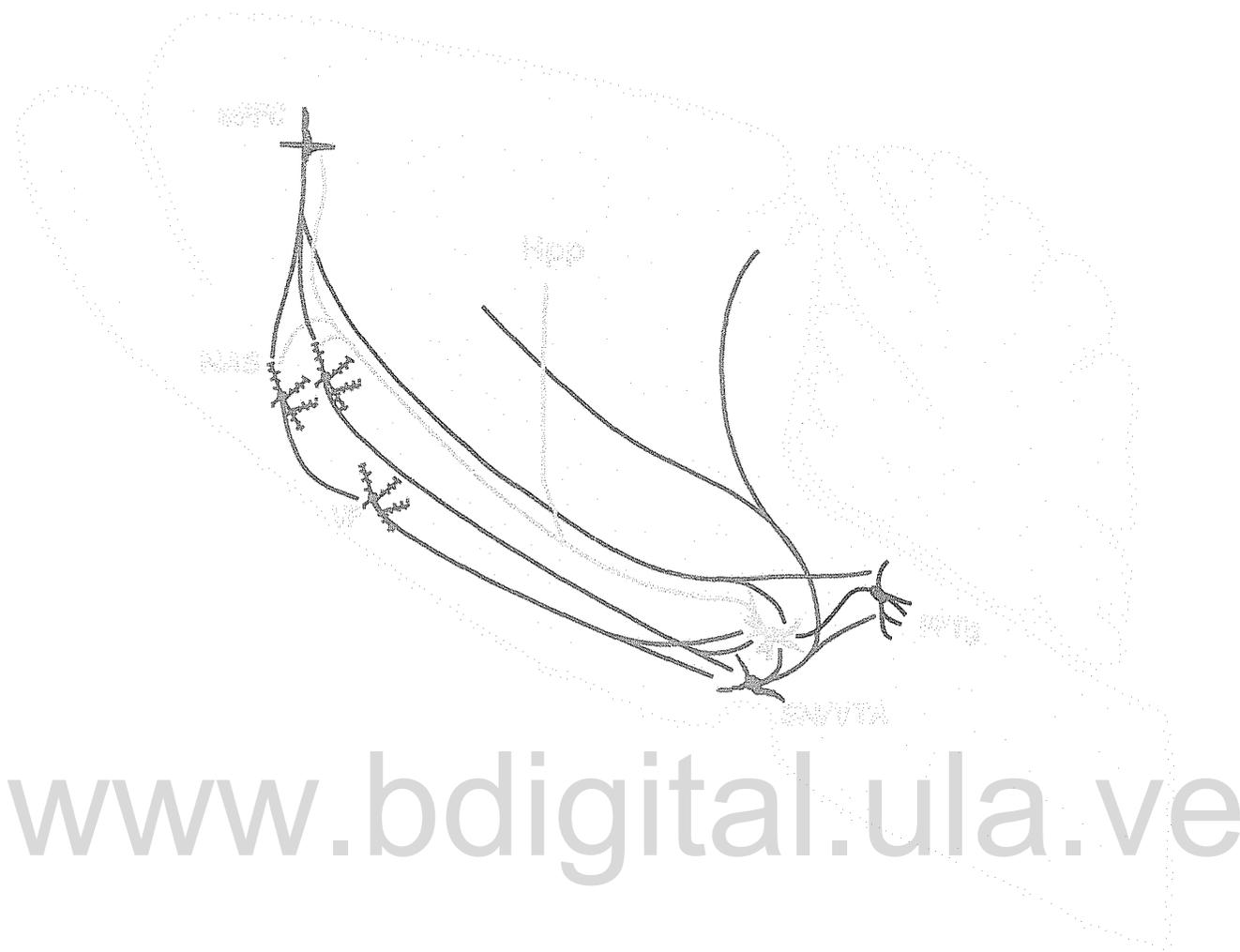
En mi disertación doctoral propongo describir el impacto de factores ambientales (extrínsecos/epigenéticos) y genéticos (intrínsecos) sobre dos sistemas neurotransmisores altamente relacionados a conductas de motivación, recompensa y psicóticas, como lo son el sistema GABAérgico y dopaminérgico a nivel mesocorticolímbico [3]. Como modelo de estudio para evaluar el rol de factores extrínsecos sobre la emoción, atención particular será dada al sistema GABA (ácido  $\gamma$ -amino butírico) en el VP sobre las conductas hedónicas y de motivación. Por otra parte, para analizar el impacto de factores intrínsecos (genéticos) sobre la génesis de trastornos mentales, se dará atención al sistema Neuregulina1-ErbB4 en el sistema CA1-dorso-hipocampal y su relación con conductas psicóticas.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. Sistema Meso-Cortico-Límbico y emoción

Hace más de cincuenta años, Olds y Milner demostraron que ratas con electrodos implantados en el núcleo accumbens (NAc) y el área ventro-tegmental (AVT) eran capaces de realizar tareas específicas con el fin de obtener estímulos eléctricos en estas áreas cerebrales [5, 6]. Posteriormente se demostró que la estimulación eléctrica de estas áreas del cerebro se debía en buena medida a la activación del sistema dopaminérgico en lo que es conocido como el sistema mesocorticolímbico (*revisado en [7]*). El sistema mesocorticolímbico lo constituye un conjunto de estructuras cerebrales relacionadas directa e indirectamente entre ellas desde una perspectiva anatomo-funcional, entre las que se puede mencionar al AVT, la corteza prefrontal (CPF), hipocampo, amígdala, NAc y VP (ver *Figura 1*) [8]. Actualmente, este sistema es considerado como un componente principal para los circuitos mesolímbico y mesocortical en el control neural para las conductas de recompensa, motivación y aversión; así como también en la patofisiología de trastornos emocionales y psiquiátricos tales como drogadicción, desordenes de atención e hiperactividad, depresión mayor, y esquizofrenia [8].

Actualmente es aun relativamente bien aceptado que el sistema dopaminérgico, aunque no es el único, tiene un papel importante en el procesamiento neural de las conductas de recompensa, motivación y aversión en el sistema mesocorticolímbico, tal y como originalmente fue establecido por Yokel y Wise [9]. En general, las evidencias experimentales sugieren que la activación del sistema mesocorticolímbico mediante la exposición del sujeto a recompensas o incentivos ambientales que generan placer va a la par de un incremento en la actividad dopaminérgica dentro de esta estructura neural, mientras que el bloqueo del sistema DA-mesocorticolímbico genera un déficit en la adquisición de conductas de recompensa que puede inclusive desencadenar en conductas anhedónicas y de desmotivación [8].



Tomado y modificado de Wise, 2002

**Figura 1:** Sistema Mesocorticolímbico en el cerebro de roedores. Los cuerpos celulares de las neuronas dopaminérgicas (amarillo) se localizan en el área ventro-tegmental (VTA) y sustancia nigra (SN) y proyectan principalmente hacia el hipocampo (Hpp), corteza prefrontal media (mPFC) y el shell del núcleo accumbens (NAS). Por su parte las proyecciones glutamatérgicas aparecen indicadas en azul y proyectan desde la mPFC hacia el NAS, SN/VTA y el núcleo tegmental pedúnculo-pontino (PPTg). En color rojo están representadas las proyecciones de tipo GABAérgicas. Se indican tres importantes núcleos (NAS, pálido ventral (VP) y SN/VTA) en los cuales existen cuerpos celulares para este sistema inhibitorio. Finalmente en verde se representa una proyección colinérgica la cual proyecta desde el PPTg hasta el SN/VTA.

Las proyecciones dopaminérgicas en el cerebro proceden de tractos anatómicos no difusos y topográficamente bien organizados y caracterizados histológicamente que se originan de diferentes zonas

cerebrales [10]. En este orden de ideas, seis proyecciones DA principales se han descrito dentro del sistema nervioso central las cuales están resumidos en la *Tabla 1*; sin embargo, el sistema DA-mesocorticolímbico que estamos considerando lo constituyen principalmente células procedentes del AVT (A10) [11, 12].

**Tabla 1:** (Tomado de Albanese et al., 1986) *Proyecciones dopaminérgicas en el sistema nervioso central.*

System	Origin	Targets
Midbrain efferent	Retrorubral area (A 8)	Caudate nucleus, nucleus accumbens
	Substantia nigra (A 9) <sup>1</sup>	Caudate nucleus, putamen, globus pallidus, nucleus accumbens, olfactory bulb, cerebral cortex (see text) locus coeruleus
	Ventral tegmental area (A 10) <sup>2</sup>	Caudate nucleus, putamen, nucleus accumbens, olfactory bulb, cerebral cortex (see text), hippocampus, amygdala, lateral habenular nucleus, locus coeruleus
Tubero-infundibular	Arcuate and periventricular hypothalamic nuclei (A 12, A 14)	Median eminence, intermediate and posterior lobes of the pituitary
Diencephalospinal	Dorsal and posterior hypothalamus (A 11)	Intermedio-lateral cell columns of spinal cord
Incerto-hypothalamic	Zona incerta, posterior hypothalamus (A 11, A 13)	Hypothalamus, lateral septum
Periventricular	Mesencephalic and diencephalic periaqueductal and periventricular gray (A 11, A 14)	Periaqueductal and periventricular gray, thalamus, hypothalamus
Olfactory bulb	Periglomerular cells (A 16)	Olfactory glomeruli
Retinal	Inner nuclear layer (A 17)	Inner and outer plexiform layers

<sup>1</sup> Main subset is the nigro-striatal pathway.

<sup>2</sup> Main subsets are the mesencephalo-limbic and mesencephalo-cortical pathways.

Como evidencias experimentales que apoyan la importancia de la proyección DA-AVT en el control de la emoción, lesiones en el AVT de roedores que generan un daño específico en células DA han demostrado producir alteraciones conductuales tales como (i) incremento en la actividad locomotora e hipo-exploración [11], (ii) déficit en discriminación espacial y alternación [13], (iii) extinción de conductas de recompensa críticas para la supervivencia de la especie (ej. social, maternal, recolección de alimentos, impulso sexual) [14, 15]; y (iv) déficits en conductas de aprendizaje, cognición, y en auto-administración de drogas psico-estimulantes [13].

Si bien es relativamente claro el rol del sistema DA-mesocorticolímbico sobre el control de las conductas de recompensa y en general en el control de las emociones, sería demasiado simplista considerar que únicamente el sistema DA participa en tan importante circuito emocional. En este sentido, un número extenso de trabajos han demostrado bajo diversos paradigmas experimentales que el sistema colinérgico, opiáceo, glutamatérgico y GABAérgico participan de manera significativa en la regulación de la propia actividad del sistema DA mesocorticolímbico, así como también en la modulación del funcionamiento del sistema en general [16].

Está relativamente bien establecido que las neuronas dopaminérgicas en el AVT pueden ser directamente reguladas por la acción de receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos [17-19]. En este sentido, la administración directa en el AVT de drogas agonistas para estos receptores son capaces de activar conductas hedónicas y de recompensa en ratas [17, 20]. Por su parte, el sistema opiáceo ejerce su mayor impacto sobre las conductas de recompensa a través de los receptores *mi* ( $\mu$ ) y *delta* ( $\delta$ ), los cuales al ser estimulados promueven la actividad DA mesocorticolímbica [21-23]. A diferencia del sistema colinérgico, en este caso se presume que el mecanismo de acción de los  $\mu$  involucra la inhibición de las células GABA, las cuales normalmente ejercen un efecto inhibitorio tónico sobre las células dopaminérgicas a nivel del AVT [24]. Al bloquear la inhibición tónica que las células GABAérgicas ejercen sobre las dopaminérgicas, están incrementan su actividad basal, promoviendo conductas hedónicas y de recompensa.

Considerando el mecanismo de acción del sistema opiáceo sobre las conductas de recompensa, no es extraño que posteriormente haya sido demostrado que agentes GABAérgicos por si mismos sean capaces también de generar conductas de auto-administración en el AVT [25-27]. Sin embargo, el mecanismo específico por el cual el sistema GABA modula la actividad DA a nivel del AVT no está completamente claro debido a que se ha demostrado que receptores GABA-A pueden ser heterogéneamente expresados tanto en células DA [28], como en neuronas GABA dentro del mismo AVT [29].

Finalmente, proyecciones polisinápticas glutamatérgicas de la CPF al AVT también modulan las conductas de recompensa. Se sabe que las ratas se auto-administran fenciclidina u otros antagonistas para el receptor NMDA en la CPF [30]. También es conocido que conductas de auto-estimulación eléctrica en la CPF promueven un incremento en la liberación de glutamato en el AVT de ratas, mientras que el empleo de antagonistas para receptores ionotrópicos glutamatérgicos directamente en el AVT suprime dichas conductas [31].

En general, el sistema mesocorticolímbico responsable del control de las conductas de recompensa parece estar regulado principalmente por el sistema DA, cuyo origen radica en células dopaminérgicas (A10) localizadas en el AVT que proyectan a regiones tales como el NAc, CPF e hipocampo (*ver Figura 1*) [32-35]. Por su parte, proyecciones colinérgicas procedentes del tallo cerebral, glutamatérgicas de la CPF y GABAérgicas del NAc y VP parecen constituir los principales reguladores endógenos de la actividad DA a nivel del AVT, que a su par regula los efectos de recompensa por la comida, agua, interacción sexual, motivación, y en general, por todas aquellas conductas que generan placer en el individuo a un nivel tal que promueven el deseo de repetir dicha experiencia en lo sucesivo.

## 2.2. Sistema GABAérgico

El ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA) es el principal neurotransmisor inhibitorio de la actividad en neuronas maduras. Su receptor está ampliamente distribuido en el sistema nervioso central y se puede clasificar farmacológica y funcionalmente en dos clases: ionotrópicos rápidos GABA-A/GABA-C y metabotrópicos lentos GABA-B [36, 37].

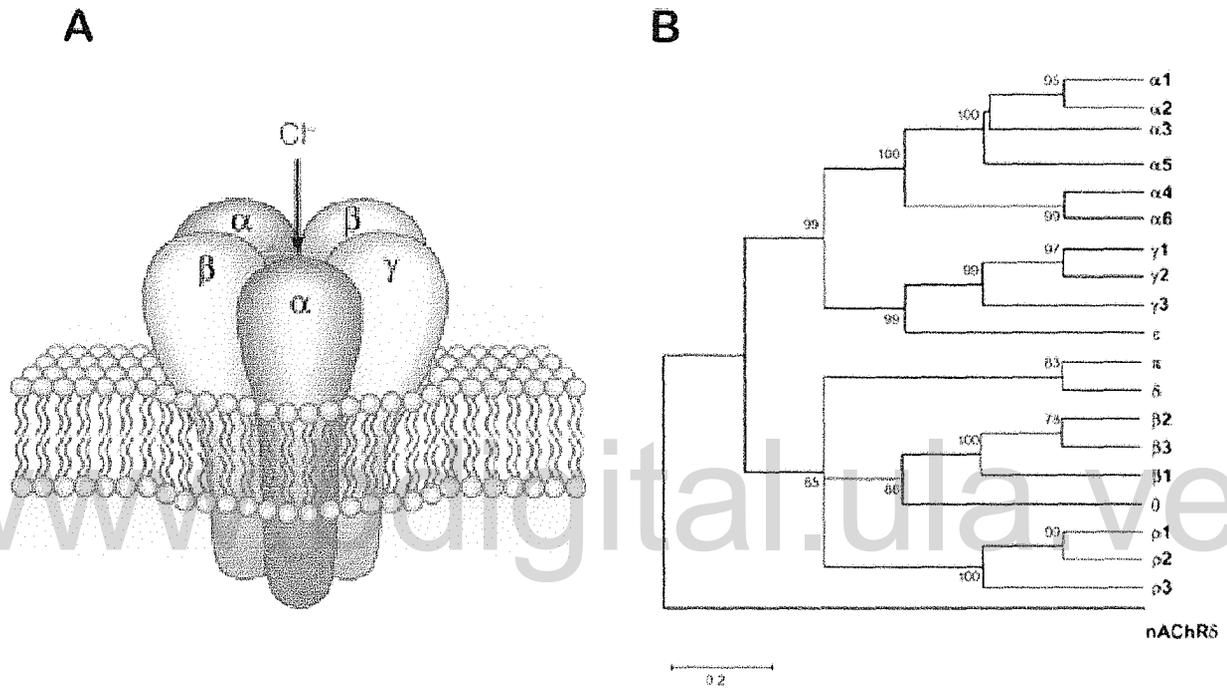
La existencia del GABA en el sistema nervioso central fue por primera vez descrita por Roberts y Frankel en el año 1950 [38]. El GABA es sintetizado por la descarboxilación del glutamato mediante la enzima glutamato decarboxilasa (GAD), la cual puede existir en dos isoformas: GAD65 y GAD67. Ambas isoformas difieren entre sí en su peso molecular (65 vs. 67 KDa), sus propiedades catalíticas y cinéticas para la síntesis de GABA, así como también en su ubicación subcelular [39]. La síntesis de GABA mediada por GAD ocurre en el citosol, para luego ser transportado al interior de las vesículas sinápticas por la acción del transportador vesicular vGAT. Finalmente, luego de la llegada del potencial de acción al terminal sináptico, el GABA vesicular es liberado al espacio sináptico en un proceso dependiente de  $Ca^{2+}$ . En muchas neuronas GABAérgicas, la homeostasis de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular a nivel del terminal sináptico es un proceso crítico que ocurre en buena medida por la presencia de una proteína conocida como "Parvalbumina" (PV), cuya función se cree es enlazar  $Ca^{2+}$

residual que pueda quedar luego de concluido un tren de potenciales de acción. Por su parte, la degradación de GABA requiere la acción de una GABA transaminasa (GABA-T) que convierte al GABA en succinato semi-aldehído, que posteriormente puede ser oxidado a succinato para incorporarse al ciclo de Krebs [40].

El receptor GABA-A fue originalmente identificado farmacológicamente debido a que el mismo era fácilmente activado por la acción de GABA y del agonista selectivo muscimol, bloqueado por bicuculina y picrotoxina, y modulado por benzodiazepinas y barbitúricos [37]. Posteriormente se demostró que un segundo tipo de receptor GABA era insensible al muscimol y la bicuculina pero estimulado por el baclofen, por lo cual se le denominó GABA-B [36]. Finalmente, un tercer grupo de receptores de GABA mostraban ser insensibles a todas las drogas para GABA-A y GABA-B pero sensibles a CACA (ácido cis-4-aminocrotónico), por lo cual los mismos fueron denominados como GABA-C [37]. Originalmente se creía que los receptores GABA-C eran una clase especial de receptores ionotrópicos GABA los cuales eran expresados exclusivamente en la retina y diversos tejidos periféricos pero que estaban ausentes en el sistema nervioso central, así como también que eran exclusivamente constituidos por subunidades  $\rho$  las cuales no se encontraban en los receptores GABA-A [41]. Sin embargo, con el refinamiento de las técnicas en biología molecular e histología se ha demostrado que receptores ionotrópicos GABA-A a nivel del sistema nervioso central también pueden estar constituidos parcialmente por subunidades  $\rho$ , con lo cual ciertos investigadores han propuesto que la clasificación GABA-C se considere como parte de la subfamilia del receptor GABA-A [37]. Tomando en cuenta lo anteriormente citado, el término GABA-C no será empleado en lo sucesivo en este trabajo y consecuentemente GABA-A y/o GABA-B serán usados exclusivamente para referirse a la forma ionotrópica y metabotrópica respectivamente.

Desde una perspectiva funcional, los receptores GABA-A se consideran ionotrópicos debido a que se los mismos son canales iónicos hetero-pentaméricos que permiten el paso de aniones cloro ( $\text{Cl}^-$ ) y bicarbonato a través de la membrana celular. Debido a que en el adulto la proporción de aniones  $\text{Cl}^-$  es mayor en el espacio intersticial que en el intracelular, cuando estos canales se activan permiten el flujo de  $\text{Cl}^-$  al espacio intracelular, hiper-polarizando el potencial de membrana celular y consecuentemente reduciendo la excitabilidad neuronal (ver *Figura 2A*) [37]. Se han clonado 19 genes para el receptor GABA-A, los cuales han sido clasificados de acuerdo al grado de homología de su secuencia aminoacídica (*Figura 2B*). En base a esto se han clasificado 8 tipos de subunidades que son  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$ ,  $\theta$  y  $\rho$  [37]. Dentro de estas subunidades, la  $\alpha$  exhibe seis isoformas ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ), mientras que la  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\rho$  exhiben respectivamente tres cada una ( $\beta 1$ - $\beta 3$ ,  $\gamma 1$ - $\gamma 3$ , y  $\rho 1$ - $\rho 3$ ). Por otra parte, ciertas subunidades pueden además presentar diversas formas de splicing siendo la más predominante de estas la subunidad  $\gamma 2$ , la

cual exhibe una forma corta y una forma larga, lo cual le confiere a su receptor diferencias electrocinéticas [37]. Dado el hecho que el receptor GABA-A es hetero-pentamérico y que existe un alto número de subunidades para el mismo, no es extraño encontrar que este receptor sea altamente heterogéneo tanto farmacológica como electrofisiológicamente dentro del sistema nervioso central [37].

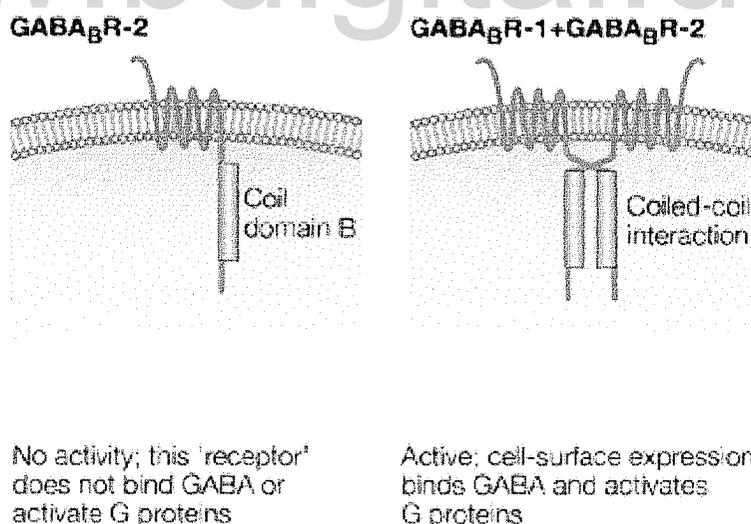


Tomado y modificado de Belelli y Lanbert, 2005 y Olsen, 2008

**Figura 2:** (A) El receptor GABA-A es un canal para iones cloro hetero-pentamérico . (B) Se conocen 19 genes para el receptor GABA-A, los cuales han sido clasificados de acuerdo al grado de homología de su secuencia aminoacídica.

Los receptores GABA-B pertenecen al grupo de receptores que están asociados a nivel intracelular a proteínas G, por lo cual los mismos se consideran metabotrópicos [36]. Estructuralmente, este es un receptor de siete dominios transmembranales (ver Figura 3) que en su forma activa heterodimeriza con las subunidades conocidas como GABA-B1 y GABA-B2 [42-46]. Se sabe que la subunidad GABA-B2 es el componente esencial que asocia en su dominio intracelular con la proteína G,

mientras que la subunidad GABA-B1 es necesaria para la activación ligando-dependiente [47-50]. De esta manera se cree que el mecanismo de activación del receptor GABA-B consiste en que una vez que el neurotransmisor GABA se une a la subunidad GABA-B1 en la superficie celular, un cambio conformacional de esta promueve la heterodimerización GABA-B1/B2, que a su vez permite que GABA-B2 active la cascada de señalización intracelular dependiente de proteína G [36]. Respecto a la diversidad de este receptor, si bien la misma es mucho menor respecto a la exhibida por parte del GABA-A, siete formas de splicing han sido reportadas para la subunidad GABA-B1 (1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f, 1g) en ratas y humanos [51-57]. Sin embargo, aunque se cree que como en el caso del receptor GABA-A, la variedad representada en las diversas formas de splicing para la subunidad GABA-B1 debería ofrecer diferencias en las propiedades farmacológicas y en la capacidad de enlazar GABA a esta, aun no está claro como sucede esto de manera específica [36]. Los mecanismos efectores asociados con los receptores GABA-B son el sistema adenilato ciclasa, y canales iónicos para calcio ( $Ca^{2+}$ ) y potasio ( $K^+$ ) [36]. Estos receptores median la activación de estos mecanismos efectores mediante la activación de proteínas G  $G_{i\alpha}/G_{o\alpha}$ , en particular  $G_{i2\alpha}$  [58, 59]. En este sentido, posterior a la activación de la cascada de señalización intracelular dependiente de proteína G se promueve la producción de AMPc mediante la activación de una adenilato ciclasa a nivel intracelular. Finalmente y dependiendo de la localización específica del receptor y de la región en particular en el sistema nervioso central, una reducción en la conductancia para  $Ca^{2+}$  o un incremento para la conductancia a  $K^+$  ocurre en la membrana neuronal [36].



Tomado y modificado de  
Pierce et al., 2002.

**Figura 3:** El receptor GABA-B es un heterodímero obligado el cual únicamente es funcional cuando las subunidades GABA-B1 y GABA-B2 se co-expresan en la misma célula. La subunidad GABA-B1 es capaz de enlazar GABA mientras que la subunidad GABA-B2 no lo hace. Por su parte, la subunidad GABA-B2 es totalmente inactiva cuando no dimeriza con su contraparte GABA-B1. Sin embargo, cuando ocurre la heterodimerización GABA-B1/GABA-B2 el receptor activa una cascada de señalización intracelular dependiente de proteína G. Se sabe que la subunidad GABA-B2 es crítica en este proceso intracelular.

### 2.3. Relación entre el Sistema GABA Mesocorticolímbico y Depresión Mayor

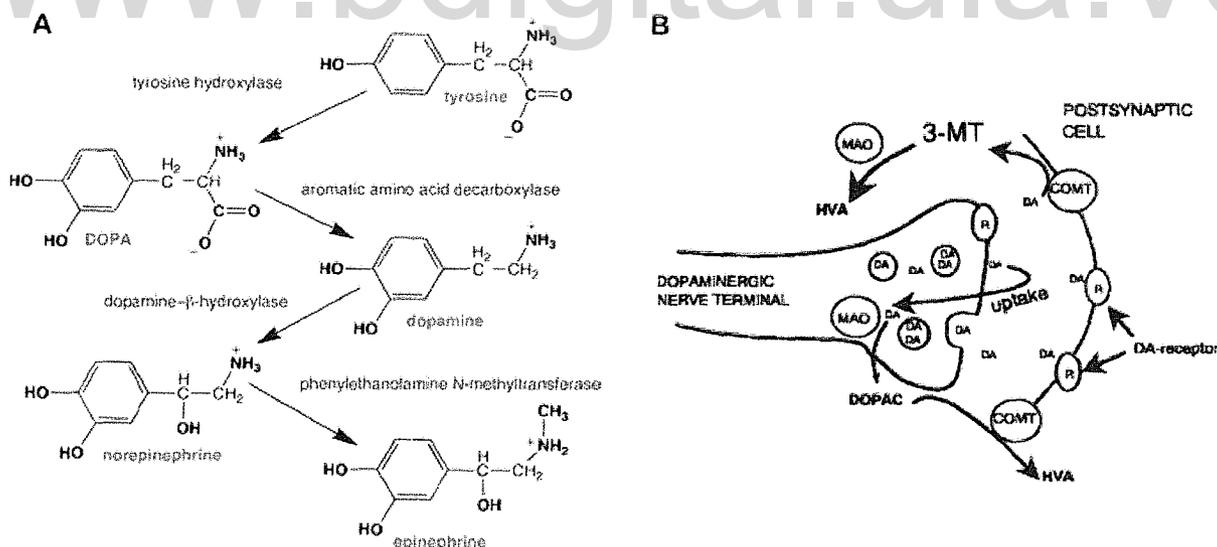
La Depresión Mayor es un desorden emocional que afecta al 3.9 % de la población mundial [60]. De acuerdo a los criterios de clasificación de DSM-IV, la misma se caracteriza en general por un estado de desmotivación y baja autoestima, desinterés por actividades cotidianas (anhedonia), trastornos del ciclo sueño-vigilia, baja energía, agitación psicomotora, cambios en el apetito por alimentos y desesperanza [2]. Por su parte, en la búsqueda de posibles sustratos neurales que permitan describir la etiología de la depresión conductual, diversos estudios en humanos y roedores han demostrado que el AVT, la CPF, el estriado, la amígdala, el tálamo y el hipocampo (en general, el sistema mesocorticolímbico) están vinculados con conductas depresivas [61-64]. Adicionalmente, el *shell* del NAc el cual es una región que integra proyecciones provenientes de la CPF, el AVT y el hipocampo (ver *Figura 1*) [65], también ha demostrado jugar un importante rol en la depresión [66-68]. En este sentido, también se sabe que diversos sistemas de neurotransmisión tales como el glutamatérgico, colinérgico, adenosinérgico y dopaminérgico en el NAc están desregulados [61, 68-72].

Diversos trabajos han señalado claramente que el NAc se proyecta casi exclusivamente al VP mediante neuronas espinosas medianas GABAérgicas (*Figura 1*) [73-75]. En general, se ha demostrado que el VP es un área cerebral de convergencia de señales de recompensa límbicas así como también integrador de diversos procesos cognitivos, afectivos y motores. De este modo, las primeras evidencias respecto a la función del sistema GABA en el VP indicaron que el mismo estaba asociado al control de la actividad locomotora inducida por la anfetamina [76-79]; aunque más recientemente, otros describieron que este sistema también es importante en el control de conductas de alimentación, saciedad, recompensas y de aversión a nuevos sabores [64, 80-84]. A modo de descripción general, lo que se sugiere es que experiencias agradables o placenteras (hedónicas) reducen el tono GABAérgico en el VP, mientras que por el contrario, todas aquellas experiencias desagradables o aversivas incrementan la actividad GABA-VP, posiblemente debido en parte a un cambio en la actividad neural del NAc [76, 84-87]. Tomando en cuenta lo anteriormente citado, mas el hecho que el NAc participa activamente en la etiología de la depresión, parece razonable considerar que el sistema GABA en el VP debería también estar asociado a conductas de desmotivación y depresión; así como también debe servir como una importante “vía final común” en el procesamiento mesocorticolímbico para conductas emocionales y de recompensa. No obstante, aun no existen reportes que prueben lo aquí sugerido.

## 2.4. Sistema Dopamina

La DA fue fisiológicamente descrita por primera vez hace más de 50 años por el premio nobel Arvid Carlsson [88]. A diferencia de neurotransmisores tales como el glutamato o el GABA en el sistema nervioso central, la DA afecta la actividad neuronal de manera relativamente lenta mediante la activación de dos grupos importantes de receptores asociados a proteína G, conocidos como receptores tipo-D1 y tipo-D2, [89].

La síntesis de las catecolaminas y en particular de la DA, se inicia en las neuronas catecolaminérgicas con la hidroxilación del aminoácido L-tirosina a L-3,4-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA) por la acción de la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH) [90]. Seguidamente, la DA, norepinefrina y epinefrina se sintetizan secuencialmente mediante una descarboxilación, hidroxilación y metilación para obtener epinefrina como producto final (ver *Figura 4A*) [91]. Por su parte, el catabolismo de las catecolaminas involucra principalmente dos enzimas: la Catecol-O-Metiltransferasa (COMT) extracelular y la mitocondrial Monoamino Oxidasa (MAO) mitocondrial, las cuales metabolizan la DA a 3-Metoxi-Tiramina (3-MT) y a ácido 3,4-Di-hidroxi-fenilacético (DOPAC) respectivamente [90]. Finalmente y dependiendo de la región cerebral en particular, tanto la 3-MT como el DOPAC son metabolizados por la acción de COMT o MAO para obtener ácido homovanílico (HVA) como producto metabólico final de la DA, el cual es posteriormente excretado a través de la orina (*Figura 4B*) [90].

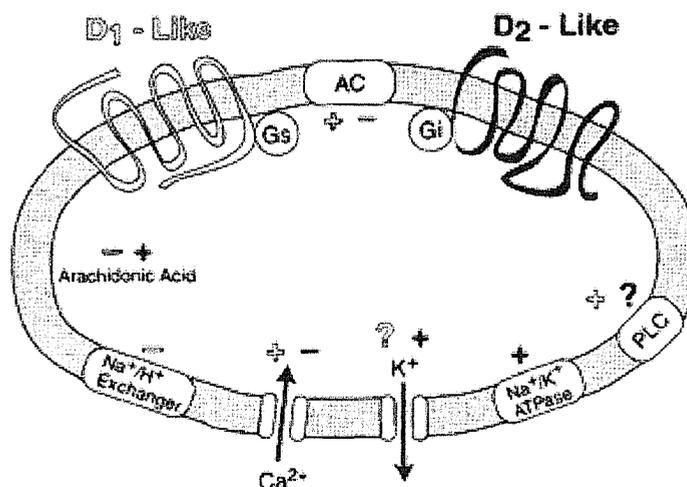


Tomado y modificado de Daubner et al., 2011 y Honkanen, 1999

**Figura 4:** (A) Ruta biosintética para las catecolaminas. (B) Metabolismo de la dopamina por la acción de la monoamino oxidasa (MAO) y la Catecol-O-Metiltransferasa (COMT). Ácido 3,4-Di-hidroxi-fenilacético (DOPAC), 3-Metoxi-Tiramina (3-MT), y ácido homovanílico (HVA).

En lo que respecta a los receptores para DA, tal y como se ha señalado previamente, los mismos se han separado en dos grupos importantes: receptores tipo-D1 y tipo-D2 [89]. Originalmente, esta clasificación general se basó en el hecho de que ciertos receptores para la DA eran capaces de estimular la activación de una adenilato ciclasa mientras que otros no lo hacían, por lo cual a los primeros se les denominó como receptores D1 y a los segundos como receptores D2 [92]. Posteriormente, con el advenimiento de nuevas tecnologías en ingeniería genética y biología molecular fue posible determinar que existen más de dos clases de receptores para la DA. De hecho, actualmente se reconoce que existen cinco subtipos de receptores para la DA denominados respectivamente D1, D2, D3, D4 y D5, los cuales difieren estructural, farmacológica y bioquímicamente entre ellos [89]. Sin embargo, aunque es ampliamente aceptada la previamente mencionada diversidad para los receptores de DA, la clasificación de los mismos continúa siendo resumida en base al tipo de cascada de señalización celular que los mismos activan. En este sentido, los receptores D1 y D5, los cuales inducen la producción de AMPc vía adenilato ciclasa activada mediante una proteína  $G_{\alpha_{s/olf}}$  se consideran receptores tipo-D1, mientras que los receptores D2, D3 y D4 los cuales inhiben la producción de AMPc al bloquear la adenilato ciclasa vía una proteína  $G_{\alpha_{i/o}}$  se consideran como receptores tipo-D2 [89]. Las respuestas intracelulares que pueden ser activadas mediante los receptores para DA son muy diversas; sin embargo, en general se considera que los receptores tipo-D1 tienen un efecto facilitador sobre la actividad neuronal, mientras que los receptores tipo-D2 la reducen [89]. Aunque el mecanismo específico por el cual esto ocurre depende del tipo de receptor que este siendo activado así como también de la neurona involucrada en la sinapsis dopaminérgica, los receptores DA facilitan o inhiben la actividad neuronal al afectar los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$  bien sea por cambios en la permeabilidad de este o por inducir la movilización de depósitos internos, así como también afectando la permeabilidad para iones  $K^+$ , alterando la actividad para transportadores de iones  $Na^+$ , la actividad de la fosfolipasa C (PLC) y afectando las corrientes dependientes de receptores glutamatérgicos NMDA/AMPA o GABAérgicos GABA-A (ver *Figura 5*) [89].

**Figura 5:** Mecanismos de transducción de señalización intracelular de receptores Tipo-D1 o Tipo-D2. AC, adenilato ciclasa; PLC, fosfolipasa C.



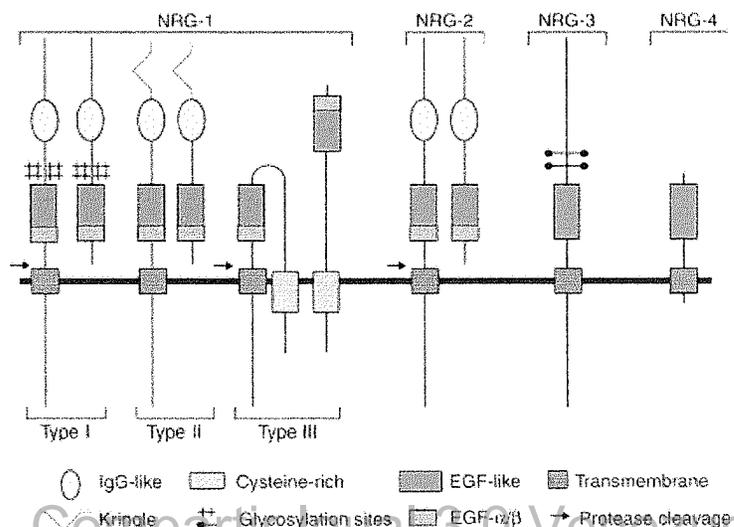
Tomado y modificado de Missale et al., 1998

## 2.5. Sistema Neuregulina/ErbB

Las neuregulinas (NRGs) son proteínas de señalización mediadoras de interacciones intercelulares principalmente en el sistema nervioso central, corazón y glándulas mamarias [93]. Para el caso particular del sistema nervioso central, se ha demostrado que las NRGs promueven la proliferación, diferenciación, migración y supervivencia de células satélite, Schwann y oligodendrocitos durante etapas tempranas y medias del desarrollo embrionario [93]. Por su parte, las NRGs constituyen una familia de cuatro miembros (NRG1, NRG2, NRG3 y NRG4) que comparten todas ellas en común un motivo de factor de crecimiento epidérmico (EGF-like) (*ver Figura 6*), el cual es el responsable principal de la activación de los mecanismos de señalización intracelular mediados por su correspondiente receptor del que se discutirá más adelante [94-99]. Se cree que cada una de las isoformas descritas para las NRGs producen diferentes respuestas biológicas gracias a las diferencias estructurales que ellas exhiben, así como también por el hecho de que las mismas presentan un patrón de expresión temporal y espacial diferencial [93].

La utilización de ratones modificados genéticamente en la biología ha sido de gran utilidad para describir la función de algún gen en particular. Sin embargo, esta estrategia ha sido difícil del emplear para el caso de la NRG-1, debido al hecho de que la carencia de la misma conduce a la muerte temprana de los embriones al decimo día de gestación (E10) debido a un deficiente desarrollo del tejido cardiaco [100], impidiendo consecuentemente estudiar el impacto de la supresión de este gen en posteriores etapas del desarrollo embrionario e inclusive durante la adultez. Sin embargo, mediante el empleo de diferentes estrategias las cuales afectan la señalización de la NRG-1 ha sido posible describir de manera relativamente clara que la NRG-1 es importante en la regulación de la proliferación de neuroepitelios, diferenciación de neuronas ganglionares de la retina, desarrollo de neuronas ganglionares de la médula y cerebelo, migración de neuronas del cerebelo y cerebro, y la expresión y función de canales ligando y voltaje dependientes en neuronas centrales [101].

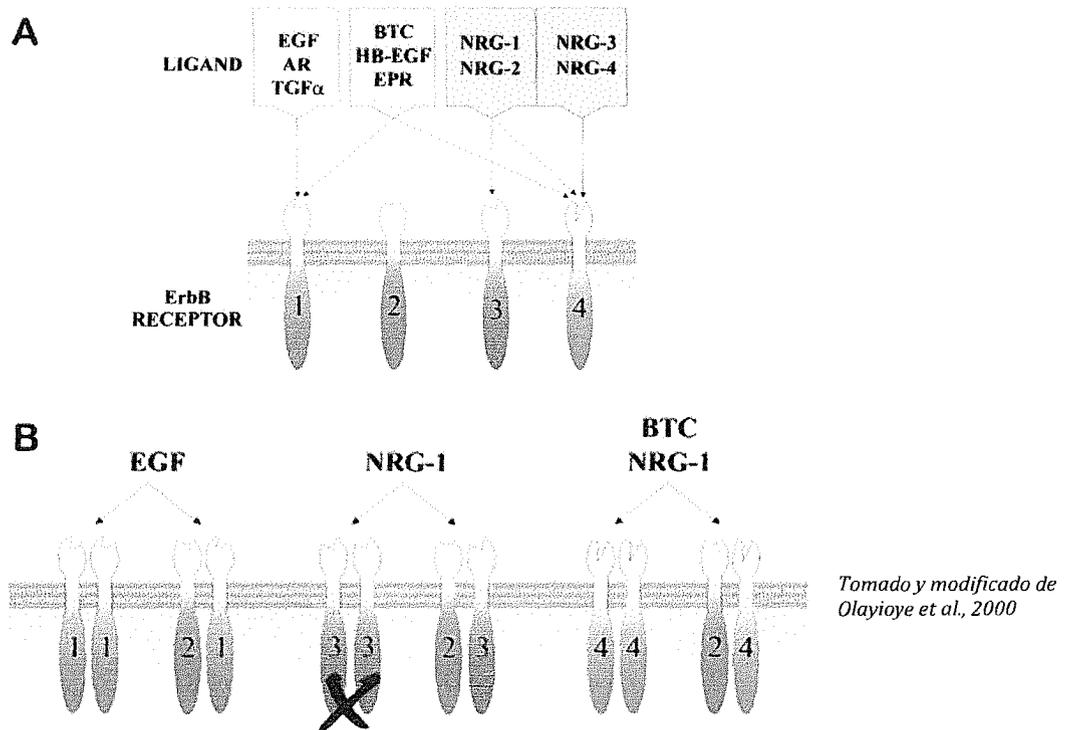
**Figura 6:** Cuatro neuregulinas (NRG) han sido descritas en los vertebrados. En general, las NRGs difieren entre sí por presentar diferentes dominios extracelulares; sin embargo, es importante hacer notar que todas ellas contienen un dominio EGF-like responsable de la activación de los mecanismos de señalización intracelular mediados por su receptor ErbB.



Por otra parte, los receptores para las NRGs son genéricamente conocidos como ErbB o HER. Estos constituyen una familia de cuatro proteínas (ErbB1-4) asociadas en su dominio intracelular a tirosina kinasa (TK), que comparten entre ellas elementos básicos estructurales [102]. Se sabe que los receptores ErbB son mediadores importantes de la regulación del desarrollo del tejido cardíaco y nervioso, así como también ha sido definido su rol en la tumorigénesis [103-105]. Por su parte, los receptores ErbB (a excepción de ErbB2) son ligandos selectivos para diversos factores de crecimiento EGF-like, tales como el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento transformador  $\alpha$ , amfíregulina, factor de crecimiento heparina enlazante, betacelulina, epiregulina y NRGs (ver *Figura 7A*) [106]. Es importante hacer mención que las NRGs han demostrado ser ligando exclusivamente para ErbB3 y ErbB4 [106]. En general, los receptores ErbB median respuestas intracelulares específicas dependientes de la fosforilación de residuos tirosina así como también median la asociación de proteínas a dominios Src [93]; sin embargo, para que esto se lleve a cabo es necesario que el receptor ErbB una vez asociado a su correspondiente ligando inicie un proceso de homo- o hetero-dimerización entre los diferentes miembros de la familia de receptores ErbB lo cual conduce a una completa activación del mismo (ver *Figura 7B*) [102]. Mediante este mecanismo de dimerización de los receptores ErbB se promueve un mecanismo de fosforilación cruzada de los residuos tirosina a nivel intracelular, para finalmente desencadenar las rutas efectoras intracelulares que median respuestas biológicas específicas dependiendo de los receptores involucrados en el proceso de dimerización [106]. La hetero-dimerización también juega un rol importante en la biología del receptor ErbB4, dado el hecho que es frecuente encontrar la formación de complejos con ErbB2, lo cual incrementa el espectro de señales intracelulares que este activa [106].

## **2.6. Relación entre el sistema Neuregulina1-ErbB4 y la Dopamina CA1-dorso-hipocampal con Desordenes Esquizoides**

Los desordenes esquizoides se caracterizan por tres clases de síntomas conductuales: positivos, negativos y cognitivos [2]. En este sentido, los síntomas positivos incluyen alucinaciones, delirios y pensamientos desorganizados, mientras que los negativos consisten en anhedonia y disociación social [107]. Finalmente, los síntomas cognitivos se caracterizan por déficits de atención y de memoria para ejecución de tareas [108]. En general lo que se propone es que los síntomas previamente mencionados están asociados con una actividad aberrante de diversos sistemas neurotransmisores en diferentes áreas cerebrales, entre las cuales el sistema mesocorticolímbico y el dopaminérgico muestran estar altamente des-regulados en la Esquizofrenia [109].



**Figura 7:** (A) Especificidades de los receptores ErbB por diferentes ligandos. BTC, betacelulina; TGF $\alpha$ , factor de crecimiento transformador  $\alpha$ ; AR, anfiregulina; EPR, epiregulina; HB-EGF, EGF-like heparina enlazante, NRG, neuregulinas. (B) Aunque no se conoce ningún ligando para el receptor ErbB2, el mismo es el receptor más comúnmente encontrado que dimeriza con las otras formas de receptores ErbB. El homodímero ErbB3 no genera señalización intracelular por lo cual es mismo está marcado con una "X". Por su parte, el heterodímero más comúnmente encontrado en el sistema nervioso central y que es activado por NRG1 es la forma ErbB2-ErbB4.

Clásicamente la etiología de la Esquizofrenia ha sido explicada por la "Hipótesis Dopaminérgica" [110, 111], la cual se basa en el hecho de que la administración de drogas que aumentan la transmisión dopaminérgica en el cerebro pueden iniciar síntomas psicóticos positivos en pacientes normales o exacerbarlos en pacientes esquizofrénicos mientras que la mayoría de las drogas anti-psicóticas usadas actualmente en el tratamiento de este desorden actúan como antagonistas del receptor tipo-D2 para la DA [112, 113]. Actualmente se sugiere que el metabolismo del sistema DA en pacientes esquizofrénicos es normal mas no la manera como este es regulado dentro del sistema nervioso central, conduciendo a cambios anormales y heterogéneos en la actividad de las neuronas dopaminérgicas en diversas zonas cerebrales [109]. De esta manera, algunos reportes indican que el estriado e hipocampo, y particularmente el sistema dopaminérgico estriatal de pacientes esquizofrénicos es hiper-reactivo a bajas dosis de amfetamina y potencia los síntomas positivos psicóticos de estos cuando normalmente no se produce

ningún síntoma psiquiátrico en pacientes normales [114-116]. En contraposición a lo anterior, otros reportes han indicado que una hipofunción dopaminérgica de la CPF es característica en pacientes esquizofrénicos [117, 118]. La CPF ha demostrado ser un área cerebral importante para el establecimiento de la memoria para la ejecución lógica de tareas y en general en el correcto procesamiento cognitivo [119]; por lo cual, la condición de “*hipo-frontalidad*” característica de pacientes esquizofrénicos ha permitido explicar en buena medida los déficits cognitivos característicos expresados en la enfermedad [120-123].

La medicación antipsicótica clásica para la Esquizofrenia (entiéndase antagonistas para receptores tipo-D2) ha sido efectiva en minimizar los síntomas positivos de la enfermedad, mas sin embargo esta ha mostrado ser inefectiva e inclusive contraproducente para corregir los síntomas negativos o cognitivos. Las razones de esta afirmación son fácilmente entendidas si consideramos los argumentos previamente citados. Dicho de otra manera, los antipsicóticos anti tipo-D2 en pacientes esquizofrénicos actúan exclusivamente en la corrección de los estados hiper-dopaminérgicos en regiones tales como el estriado; sin embargo, en regiones tales como la CPF en la cual se describe un posible estado hipo-dopaminérgico, los anti psicóticos anti tipo-D2 agravan esta condición neuroquímica, empeorando la sintomatología [124].

Si bien la “*Hipótesis Dopaminérgica*” para la Esquizofrenia fue originalmente aceptada como el componente neurobiológico esencial en este desorden mental, recientemente se reconoce que alteraciones en otros sistemas neuronales tales como el glutamatérgico, colinérgico y el GABAérgico también deben ser importantes en el establecimiento de la enfermedad [125-129]. Interesantemente, diversos reportes han sugerido que la esquizofrenia puede estar asociada a déficits en la regulación de patrones sincronizados oscilatorios de la actividad neural cerebral (*revisado en* [130]). Estos patrones sincronizados oscilatorios se sabe son importantes para facilitar el procesamiento y el flujo de información entre diferentes áreas cerebrales y posiblemente, son esenciales para la función cognitiva normal, la cual está alterada en los pacientes esquizofrénicos [131]. De hecho, diversos reportes han indicado que un tipo actividad oscilatoria sincronizada electroencefalográfica en particular (30-80 Hz), conocida como oscilaciones y (*gama*) puede estar significativamente reducida en estos pacientes [132]. Las oscilaciones y son un mecanismo neural de circuito local sincronizado que se ha reportado ocurre a nivel de la corteza y el hipocampo, las cuales requieren de interacciones excitatorias e inhibitorias recurrentes [130]. Diversos estudios apoyan la hipótesis de que interneuronas bi-estratificadas GABAérgicas y positivas para PV son importantes en la generación de las oscilaciones y en el hipocampo y la corteza [130]. De hecho se cree que la regulación de la actividad de estas interneuronas GABA-PV+ depende de la activación de receptores AMPA y NMDA localizados en esta población interneuronal en el hipocampo, y la ablación selectiva de estos receptores reduce el poder de estas oscilaciones sincrónicas en esta área cerebral [128,

129]. Adicionalmente, un reporte reciente también ha demostrado de manera interesante que el poder de las oscilaciones  $\gamma$  también es regulado por el receptor dopaminérgico D4, el cual es expresado en las mismas interneuronas GABA-PV+ [133]. Este reporte indica que activando receptores D4 en el CA1 del hipocampo se incrementa el poder de las oscilaciones  $\gamma$  y mientras que su bloqueo las reduce. De esta manera, si bien otros sistemas de neurotransmisión tales como el glutamatérgico, colinérgico y GABAérgico han comenzado a modernizar el paradigma clásico del origen de la Esquizofrenia, la DA aun sigue manteniendo vigencia dentro del contexto de la etiología para este desorden psiquiátrico.

Actualmente se sugiere que existen ciertos factores ambientales que durante etapas del desarrollo embrionario o a temprana edad pueden predisponer al desarrollo de la Esquizofrenia durante la adultez [134-140]; sin embargo, se sabe que para ello también es necesario que el individuo lleve consigo una carga específica de variantes genéticas que incrementen la susceptibilidad de desarrollar este desorden psiquiátrico [141]. En este sentido, polimorfismos en nucleótidos específicos dentro de haplotipos para el gen de la Neuregulina-1 (NRG1) y su receptor ErbB4 han demostrado estar asociados a un incremento en la susceptibilidad para desarrollar Esquizofrenia en diferentes poblaciones en Islandia, Escocia, China y Costa Rica [142-153].

El sistema NRG1-ErbB4 puede afectar la plasticidad hipocampal al revertir la inducción del LTP, así como también incrementar el poder de las oscilaciones gama ( $\gamma$ ), mediante la activación del receptor D4 para la DA en el hipocampo dorsal de ratones [133, 154]. Adicionalmente, el laboratorio del Dr. Buonanno ha demostrado de manera significativa que la administración aguda y local de NRG1 en el hipocampo dorsal de ratas es capaz de incrementar los niveles extracelulares de DA dorso-hipocampales [154], dándose un importante avance en el entendimiento de la relación directa existente entre el sistema NRG1-ErbB4, sistema DA y Esquizofrenia.

En el hipocampo dorsal de roedores, la expresión de ErbB4 está restringida a una población particular de interneuronas positivas para colecistokinina (CCK), óxido nítrico sintasa (NOs), somatostatina y para PV, las cuales se localizan en estratos celulares bien definidos dentro de esta región cerebral [155, 156]. A pesar de las evidencias anteriormente señaladas, aun no está claro el mecanismo específico por el cual la activación del receptor ErbB4 mediante NRG1 en el hipocampo dorsal es capaz de inducir un incremento en los niveles extracelulares de DA reportados previamente por el laboratorio del Dr. Buonanno [154].

El empleo de ratones con alteraciones genéticas específicas en las cuales se modifica, agrega (*knock-in*), o elimina (*knock-out*) la expresión de un gen particular ha resultado ser una herramienta poderosa para determinar la función de un gen en particular en un contexto biológico. En este mismo sentido, diversos laboratorios han desarrollado diversas líneas de ratones modificados genéticamente que presentan déficits en la expresión de la NRG1 o del receptor ErbB4, a modo tal de generar cambios en la

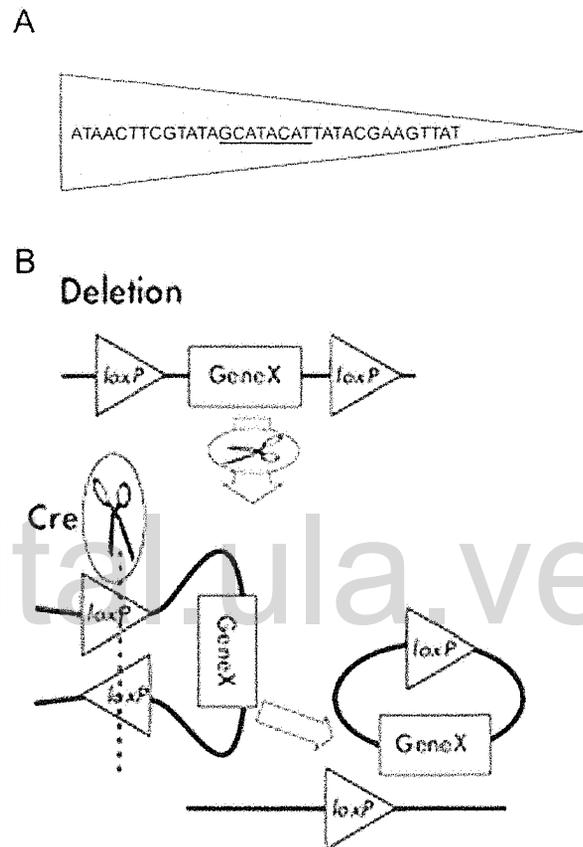
función del sistema NRG1-ErbB4 en modelos animales que permitan en primer lugar, reproducir alguno de los síntomas reportados para la Esquizofrenia en humanos, y en segundo lugar, explorar en mayor profundidad las bases neurobiológicas que desencadenan en estas conductas. Sin embargo y como ya se ha mencionado con anterioridad, dado que el sistema NRG1-ErbB4 ha demostrado ser esencial durante etapas tempranas del desarrollo embrionario [100, 157]; diversos laboratorios han procedido a desarrollar ratones viables que expresan en menor grado NRG1 o que contienen mutaciones que afectan dominios específicos de la propia NRG1. Sin embargo, los resultados obtenidos por esta vía han sido complicados de interpretar (*discutido por* [101]). Una segunda estrategia para estudiar el rol neurobiológico del receptor ErbB4 en ratones ha consistido en emplear ratones ErbB4  $-/-$  descritos originalmente por Gassman et al., 1995 [100], y rescatarlos de la letalidad embriónica debida al ineficiente desarrollo del miocardio mediante la sobre-expresión transgénica del receptor ErbB4 a nivel cardiaco ErbB4<sup>MHC-ErbB4</sup> [158]. Finalmente, una tercera estrategia para estudiar de manera específica el papel de ErbB4 sobre diferentes poblaciones celulares dentro del sistema nervioso central ha consistido en emplear el sistema Cre-lox, el cual actualmente es empleado como una herramienta refinada para desarrollar ratones *knock-out* clásicos y condicionales.

De manera breve, el sistema Cre-lox lo constituyen dos componentes: (a) una Cre recombinasa que cataliza la recombinación entre dos sitios loxP; y (b) los sitios loxP, los cuales son regiones de 34 pares de bases con una región central conservada de 8 pares de bases específica que es donde se lleva a cabo el proceso de recombinación (*ver Figura 8A*). Aunque existen diversas estrategias para introducir los genes Cre y loxP en el genoma del ratón de manera separada, estos generalmente se hacen a modo tal de garantizar la eliminación de un segmento del mismo, lo cual implica que los genes loxP deben flanquear la porción del genoma que se desea eliminar (*Figura 8B*) [159]. De esta manera, ratones que expresan Cre bajo el control del promotor para PV [160] o TH [161], han sido cruzados con ratones que tienen el exón 2 del gen de ErbB4 flanqueado por dos sitios loxP (*floxed*). De esta manera, es posible obtener ratones PV-Cre ErbB4*floxed* o TH-Cre ErbB4*floxed* que no expresan ErbB4 exclusivamente en interneuronas positivas para PV o en neuronas TH+ respectivamente.

Para determinar de qué manera específica la des-regulación del sistema NRG1-ErbB4 puede reproducir alguno de los síntomas reportados para los desordenes esquizoides en humanos, el laboratorio del Dr. Buonanno ha comenzado a emplear ratones ErbB4<sup>MHC-ErbB4</sup> y PV-Cre ErbB4*floxed* [162]. De esta manera, se ha demostrado que ratones ErbB4 $-/-$  exhiben déficits sensorimotores ante estímulos audibles, son hiperactivos y de bajo índice de ansiedad basal respecto a sus controles (ratones consanguíneos y con el mismo perfil genético aunque en este caso expresan ErbB4). Por su parte, aunque los ratones PV-Cre ErbB4*floxed* no presentan todas las alteraciones conductuales exhibidas por los ratones ErbB4 $-/-$ , estos también presentan déficits sensorimotores ante estímulos audibles e hiperlocomoción. Diferencias en la

manera como el sistema NRG1-ErbB4 actúa sobre las diferentes poblaciones celulares que expresan ErbB4 en el hipocampo dorsal, así como también en diferentes regiones cerebrales asociadas al sistema mesocorticolímbico tales como la CPF, NAc, VP, amígdala y AVT podrían explicar las diferencias conductuales tipo-esquizoides reportadas para las diferentes líneas de ratones transgénicos previamente mencionados, aunque esta hipótesis aun no ha sido explorada.

**Figura 8:** (A) la secuencia loxP está constituida por 34 pares de bases. Una región central de 8 pares de bases es el blanco para la recombinasa Cre. (B) al flanquear el gen X de interés con dos secuencias loxP, se garantiza la completa eliminación del mismo cuando también se expresa la recombinasa Cre en el mismo ratón.



Tomado y modificado de <http://cre.jax.org/introduction.html>

Considerando el hecho de que (a) el receptor ErbB4 es ampliamente expresado en interneuronas que co-expresan PV+ y GAD67+ en el hipocampo dorsal [155, 163, 164]; (b) las interneuronas PV+ están involucradas en el control de las oscilaciones gama ( $\gamma$ ) y que la intensidad de las mismas están reducidas en la esquizofrenia [165, 166]; (c) el número de interneuronas PV+ en el hipocampo de ratones ErbB4<sup>-/-</sup> está reducido en un 31% [164]; (d) ratones defectuosos para la expresión de ErbB4 en interneuronas PV+ reproducen algunos de los síntomas característicos de la Esquizofrenia [162]; y (e) el receptor dopaminérgico D4 también es co-expresado en interneuronas PV+/ErbB4+ [133]; es posible sugerir que el incremento de DA en el CA1 del hipocampo dependiente de la activación del sistema NRG1-ErbB4 previamente reportado por Kwon *et al.* [154], ocurre mediante la participación activa de interneuronas

PV+ en el CA1 del hipocampo dorsal de ratones, sin embargo, no existen reportes previos que hayan explorado lo aquí indicado.

Los ratones *knock-out* defectuosos para la expresión de ErbB4 en interneuronas PV+ se sabe reproducen algunos, pero no todos los fenotipos conductuales expresados en ratones ErbB4<sup>-/-</sup> [162]. Esto sugiere que la acción deletérea de la supresión en la expresión de ErbB4 exclusivamente en interneuronas PV+ no afecta de manera general la regulación de todos los fenotipos conductuales expresados en ratones ErbB4<sup>-/-</sup>. Esto implica que otros tipos de neuronas que también expresan ErbB4 dentro del sistema nervioso central también deben tener un rol en la regulación de estas otras conductas no expresadas en los ratones PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>. Aunque actualmente no existen evidencias de que el receptor ErbB4 sea expresado en terminales DA a nivel del hipocampo dorsal [154], otras estructuras cerebrales tales como el AVT (el cual proyecta al hipocampo dorsal [33, 34]) expresan ARNm para ErbB4 en neuronas TH+ y dopamina-β-hidroxilasa negativa, lo cual indica la naturaleza dopaminérgica de las mismas [167-169]. De esta manera, en los ratones TH-Cre ErbB4 *floxed* se debería desencadenar una regulación anormal del sistema DA en el sistema mesocorticolímbico, lo cual conduce a fenotipos conductuales tipo esquizoide tal y como otros autores han predicho [109].

### 3. HIPOTESIS

#### 3.1. Hipótesis A: Relación del sistema GABAérgico ventro-palidal con conductas de Depresión.

La activación del sistema GABAérgico en el VP está asociada a la depresión conductual. Este cambio a su vez desencadena en cambios en la expresión de subunidades del receptor GABA-A, los cuales determinan un mecanismo epigenético para el establecimiento de un fenotipo tipo-depresivo en el cerebro de la rata.

#### 3.2. Hipótesis B: Mecanismo del sistema Neuregulina1/ErbB4 para inducir activación del sistema dopaminérgico en el hipocampo dorsal y su relación con conductas psicóticas.

El incremento de DA en el CA1 del hipocampo dorsal dependiente de la activación del sistema NRG1-ErbB4, ocurre debido a la inhibición de la actividad tónica de interneuronas que co-expresan PV y ErbB4 cuando la NRG1 es aplicada de manera aguda, lo cual a su vez permite a los terminales DA presentes en esta área cerebral liberar más DA de manera temporal. Este fenómeno es suprimido en ratones genéticamente modificados que no expresan ErbB4 en interneuronas PV+, así como también los mismos exhiben conductas tipo-esquizoides. Por su parte, ratones modificados genéticamente que

suprimen la expresión de ErbB4 en células TH<sup>+</sup> responden de manera similar que ratones controles cuando un pulso de NRG1 es aplicado en el CA1, aunque expresan algunos fenotipos conductuales tipo-esquizoides.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivos Generales: Hipótesis A

- a) Monitorear los niveles extracelulares de GABA en el VP de roedores antes, durante y después de un status de depresión conductual, usando para ello microdiálisis *in vivo* en animales despiertos y con libre movilidad.
- b) Evaluar de qué manera microinyecciones directas en el VP de drogas que incrementan o reducen la actividad del sistema GABAérgico afecta diversas conductas de motivación, utilizando para ello diversos modelos conductuales.
- c) Determinar si los posibles cambios en la transmisión de GABA a nivel del VP durante un status de depresión conductual puede modificar el patrón de expresión del receptor ionotrópico GABA-A, con lo cual se podría sugerir un mecanismo epigenético para el establecimiento de mecanismos conductuales anhedónicos generalizados en el roedor. Para ello, experimentos para evaluar cambios en la expresión relativa de mARNs y proteínas para 19 subunidades del receptor GABA-A en el VP ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ - $\beta 3$ ,  $\gamma 1$ - $\gamma 3$ ,  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ,  $\epsilon$ ,  $\rho 1$ - $\rho 3$ ), antes y después del establecimiento de un estado de depresión conductual serán empleados.

### 4.2. Objetivos Generales: Hipótesis B

- a) Evaluar cambios en los niveles extracelulares de DA del hipocampo dorsal de roedores luego de que la NRG1 es directamente administrada en esta región cerebral. La utilización de tres líneas de ratones *knock-out* ( $ErbB4^{MHC-ErbB4}$ , PV-Cre  $ErbB4^{floxed}$  y TH-Cre  $ErbB4^{floxed}$ ) permitirán determinar el mecanismo de circuito local responsable de iniciar un incremento en los niveles extracelulares de DA en esta región cerebral debido a la activación del sistema NRG1-ErbB4.
- b) Emplear una batería de pruebas conductuales en ratones TH-Cre  $ErbB4^{floxed}$  a modo tal de evaluar posibles fenotipos esquizoides sobre los mismos.

### 4.3 Objetivos Específicos

#### 4.3.1. Hipótesis A

- **Explorar cambios en la actividad del sistema GABA dentro del pálido ventral durante la depresión conductual:** Experimentos de microdiálisis *in vivo* serán empleados a modo tal de evaluar cambios en los niveles extracelulares de GABA en el VP de ratas que son sometidas a condiciones ambientales que teóricamente deben desencadenar en conductas de depresión conductual. En este sentido, el test de nado forzado será empleado para generar un estado de depresión conductual en ratas. Para medir los niveles de GABA en muestras microdializadas, la técnica de cromatografía electrocinética micelar acoplada a detección de fluorescencia inducida por láser será empleada.
- **Investigar el rol de drogas directamente administradas en el pálido ventral que afectan la transmisión de GABA sobre conductas motivacionales y hedónicas:** Microinyecciones de  $\gamma$ -vinil-GABA (inhibidor irreversible de GABA-T) o bicuculina (antagonista competitivo para GABA-A) serán realizadas a modo de incrementar o reducir respectivamente la actividad del sistema GABA en el VP. Se utilizará el test de nado forzado y de preferencia por la sacarosa para evaluar el efecto conductual de estas drogas sobre conductas motivacionales y hedónicas.
- **Explorar el impacto de posibles cambios en la transmisión GABA en el pálido ventral durante conductas de depresión sobre cambios en la expresión del receptor GABA-A:** Varios reportes han previamente sugerido que cambios en la transmisión GABA en cultivos celulares son capaces de generar cambios selectivos en ciertas subunidades del receptor GABA-A, afectando las propiedades fármaco-cinéticas del mismo [170-175]. Para evaluar de que manera cambios en la actividad del sistema GABA en el VP debidos a un estado de depresión conductual en ratas puede afectar la expresión de subunidades del receptor GABA-A en este núcleo cerebral, la técnica de RT-PCR semicuantitativo y western blot serán empleados para medir la expresión de 19 genes que codifican para subunidades del receptor GABA-A ( $\alpha 1$ -  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  -  $\beta 3$ ,  $\gamma 1$ -  $\gamma 3$ ,  $\delta$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ,  $\epsilon$ ,  $\rho 1$  -  $\rho 3$ ).

#### 4. 3.2. Hipótesis B

- **Explorar el rol del sistema Neuregulina/ErbB4 sobre diferentes poblaciones de células que expresan ErbB4 dentro del hipocampo dorsal de ratones:** Una combinación de diferentes ratones tales como ErbB4<sup>MHC-ErbB4</sup>, PV-Cre ErbB4*flxed* and TH-Cre ErbB4*flxed* serán empleados para investigar como los niveles basales de DA y el incremento dependiente del sistema NRG1-ErbB4 es afectado. En este sentido, microdiálisis reversa *in vivo* será empleada para medir los niveles extracelulares de DA en el hipocampo dorsal de estos ratones así como

también para administrar NRG1 a través de la sonda de microdiálisis. Los niveles extracelulares de DA, y de sus metabolitos DOPAC y HVA serán medidos de las muestras dializadas mediante la técnica de cromatografía líquida de alta presión, acoplada a detección electroquímica amperométrica.

- **Impacto conductual de la supresión de la expresión de ErbB4 sobre neuronas Tirosina Hidroxilasa positivas:** Una batería de test conductuales se emplearán para determinar que síntomas esquizoides se expresan fenotípicamente en este tipo de ratones transgénicos. En este sentido, el test de laberinto elevado en cruz y supresión de alimentos nuevos se empleará para medir niveles basales de ansiedad, el test de campo abierto para medir actividad motora, nado forzado para medir motivación, el test de anfetamina para medir sensibilidad a drogas psicotrópicas, y finalmente el test de pinchazo ligero en la cola acoplado a microdiálisis en el CA1 del hipocampo dorsal para medir reactividad al estrés.

## 5. METODOS

### 5.1. Animales

Ratas machos Sprague-Dawley con pesos comprendidos entre 300-450 gramos se obtuvieron del vivarium de la Universidad de los Andes. Las mismas se mantuvieron en parejas dentro de cajas metabólicas con libre acceso a comida y agua, a  $22 \pm 2$  °C de temperatura ambiental y ciclos de luz-oscuridad de 12-12 horas. Ratones machos C57BL/6J fueron obtenidos de Jackson Labs ® y mantenidos en el vivarium del NIH hasta su empleo. Ratones full *knock-out* para ErbB4/- (ErbB4<sup>MHC-erbB4</sup>), y ratones *knock-out* condicionales PV-Cre ErbB4*floxed* y TH-Cre ErbB4*floxed*, fueron mantenidos *inbreed* en el vivarium del NIH. La generación de los ratones *knock-out* full y condicionales han sido descritos previamente por [100, 158, 160, 161, 176]. Estos ratones fueron mantenidos en parejas con libre acceso a comida y agua,  $22 \pm 2$  °C de temperatura ambiental y ciclos de luz-oscuridad de 12-12- horas. Los ratones tuvieron un peso de 30-40 gramos al momento de ser empleados. Todos los experimentos fueron conducidos siguiendo las normas y procedimientos establecidos por el NIH, y aprobados por los comités de bioética de la Universidad de los Andes y el *National Institutes of Health* (NIH) respectivamente. Para todos los experimentos que requirieron el empleo de animales, se realizó el mayor esfuerzo en minimizar el número de ellos y su sufrimiento.

## 5.2. Reactivos Químicos y Biológicos

La NRG1 empleada para estimular receptores ErbB4 en el CA1 del hipocampo de ratones fue generada por (Genscript Inc, NJ, USA). La misma consistió únicamente en el dominio extracelular  $\beta$ -EGF-like el cual es de aproximadamente 12 KDa y que previamente ha demostrado ser suficiente para activar la cascada de señalización intracelular dependiente de la activación de ErbB4 [177]. La razón de emplear esta forma corta (NRG1 $\beta$ -EGF-like) en lugar del dominio extracelular completo es porque esta ha demostrado ser más eficiente en su capacidad de penetración en el tejido, generando una amplia activación de ErbB4 [154]. Todas las drogas y químicos empleados fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), a excepción de la vigabatrina ( $\gamma$ -vinil-GABA) la cual se obtuvo de Tocris (Tocris Bioscience, Bristol, UK), y la anfetamina sulfato que se obtuvo de Spectrum (Spectrum, Gardena, CA). Enzimas, primers y reactivos para realizar RT-PCR fueron obtenidos de Invitrogen (Life Technologies, Grand Island, NY). Anticuerpos policlonales primarios y secundarios fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) y Millipore (EMD Millipore, Billerica, MA).

## 5.3. Cirugía

### 5.3.1. Ratas

Se empleó un aparato estereotáxico modelo "Stellar" (Stoelting, IL, USA) para implantar crónicamente cánulas guías orientadas al VP de ratas anestesiadas con una combinación de ketamina (Calox International, C.A., Argentina) (50 mg/kg i.p.) y xilacina (Laboratorios Calier, S.A., Barcelona, España) (10 mg/kg i.p.). Para los experimentos de microdiálisis intracerebral se implantaron unilateralmente cánulas guías de 10-mm de largo y 21-ga empleando las siguientes coordenadas estereotáxicas para ratas: AP 0.0 mm, L: 2.4 mm y V: 4.0 mm [178], usando como estructuras anatómicas de referencia el Bregma, línea media sagital, y superficie de la corteza cerebral. Las cánulas guía se implantaron de manera indiferente y contra balanceadamente en el hemisferio cerebral izquierdo o derecho. Para los experimentos de microinyecciones intracerebrales, cánulas guía de 15-mm de largo y 26-ga se orientaron bilateralmente al VP empleando las siguientes coordenadas: AP: 0.0 mm, L: 2.4 mm, V: 5.8 mm. Adicionalmente, un grupo de ratas se les implantó de manera bilateral cánulas guías para microinyecciones que intencionalmente fuesen realizadas fuera del VP, a modo tal de tener un grupo control anatómico negativo. Para esto, las siguientes coordenadas estereotáxicas fueron empleadas: V: 0.0 mm, L: 2.4 mm y V: 3.3. mm. En todos los casos, las cánulas guías fueron implantadas de manera crónica con la ayuda de cemento dental acrílico y cuatro micro-tornillos de acero anclados al cráneo. Luego de

realizada la cirugía, todas las ratas fueron supervisadas diariamente durante una semana antes de iniciar cualquier experimento.

### **5.3.2. Ratonés**

Se utilizó un aparato estereotáxico modelo David Kopf (Stoelting) digitalizado para implantar crónicamente cánulas guías orientadas al CA1 del hipocampo dorsal de ratones anestesiados con una combinación de O<sub>2</sub> (1ml/min)/isoflurano (1.5-2%). Las cánulas guías de 6-mm de largo y 21-ga fueron implantadas bilateralmente usando las siguientes coordenadas estereotáxicas para ratones: AP: -2.5 mm, L: 2.5 mm, V: 0.0 mm [179], usando como estructuras anatómicas de referencia el Bregma, línea media sagital, y superficie de la corteza cerebral. En todos los casos, las cánulas guías fueron implantadas de manera crónica con la ayuda de cemento dental acrílico y dos micro-tornillos de acero anclados al cráneo. Luego de realizada la cirugía, todos los ratones recibieron diariamente por tres días consecutivos una dosis de 5% ketoprofeno como analgésico y supervisados diariamente durante una semana antes de iniciar cualquier experimento.

## **5.4. Microdiálisis Intracerebral**

### **5.4.1. *Ventre pálido de ratas***

Las sondas de microdiálisis fueron construidas en el laboratorio tal y como previamente ha sido descrito [180]. Rápidamente, la sonda de microdiálisis consistió en un tubo de acero de 13-mm de largo y 26-ga más 2-mm de largo extras en el extremo final constituido por una membrana semi-permeable de celulosa (Spectrum labs, Inc., Rancho Dominguez, CA) con un límite máximo de permeabilidad a moléculas de 18 KDa. Esto permitió a la sonda de microdiálisis protruir 5 mm adicionales desde la punta de la cánula guía. En el interior del tubo de 26-ga se posicionó concéntricamente un capilar de sílica de 150- $\mu$ m de diámetro externo y 75- $\mu$ m de interno que permitió colectar la muestra dializada. La sonda de microdiálisis se posicionó en el VP 18 horas previas al experimento con ayuda de la cánula guía previamente implantada en el animal y se fijó con cemento dental acrílico para evitar movimientos de la misma. Se perfundió a través de la sonda de microdiálisis solución Ringer modificada (136 mM NaCl, 3.7 mM KCl, 1.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub> y 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4, filtrada a 22  $\mu$ m) a una velocidad de 1  $\mu$ l/min. Para el test de nado forzado y de pinchazo ligero en la cola, las muestras microdializadas fueron colectadas cada 1 minuto en tubos de hematocrito de vidrio con el extremo final cónico sellado con fuego, a modo tal de evitar la evaporación de la muestra [181]. Un grupo de ratas (n=14) fueron directamente sometidas al test de nado forzado para medir los niveles extracelulares de GABA en el VP tal y como será

descrito más adelante. Para medir el impacto neuroquímico que el estrés inherente del test del nado forzado pudiese generar sobre cambios en los niveles extracelulares de GABA, un grupo de ratas ( $n=7$ ) fué sometida exclusivamente al test de pinchazo ligero en la cola. El procedimiento de recolección de muestras de microdiálisis fué el mismo para ambos test conductuales. Explicado de manera rápida, tanto para el Dia-1 como para el Dia-2 del test de nado forzado y de pinchazo ligero en la cola, cinco muestras basales fueron colectadas en el cajón conductual antes de colocar la rata en el tanque de agua o iniciar el pinchazo ligero en la cola. Durante esta segunda etapa experimental, diez muestras fueron colectadas durante los 10 minutos de duración del test. Posteriormente y nuevamente en el cajón conductual, diez muestras post-test se colectaron durante los inmediatos 10 minutos, y tres muestras a los 30, 60, 120 y 180 minutos post-test. Finalmente, un grupo control de ratas fueron dializadas en el VP para evaluar el efecto farmacológico de la vigabatrina sobre los niveles extracelulares de GABA cuando esta era administrada por diálisis reversa en el propio VP. La vigabatrina fue disuelta en Ringer ( $20 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y perfundida a través de la sonda de microdiálisis ( $1 \mu\text{l}/\text{min}$ ) durante 20 minutos. Se recolectaron muestras de 5 minutos de duración cada una de la siguiente manera: dos muestras basales en el cajón conductual, dos muestras durante el pulso de vigabatrina o vehículo, dos muestras durante el test de nado forzado mas la perfusión de vigabatrina o vehículo, dos muestras posterior al test, una muestra 1 hora después del test y una muestra 2 horas finalizado el test de nado forzado. Para este estudio final, 7 ratas recibieron un pulso de vigabatrina y 7 ratas recibieron un pulso con vehículo.

Los niveles extracelulares de GABA para las pruebas de nado forzado y de pinchazo en la cola para el Dia-1 y Dia-2 fueron presentados como el promedio  $\pm$  SEM (error estándar de la medida) del porcentaje de variación respecto a los niveles basales (% variación) de GABA. Posteriormente los mismos fueron analizados con el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para medidas repetidas, seguido del post-test de Newman-Keuls. Adicionalmente, el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías para comparar las diferencias entre los Días 1 y 2 o entre diferentes tratamientos fue empleado. Por último, la prueba T de student se empleó para comparar las diferencias entre los niveles basales de GABA extracelular entre los Días 1 y 2. La significancia estadística se determinó a  $p<0.05$ .

#### **5.4.2. Hipocampo CA1 dorsal de ratones**

De la misma manera que en el caso de los experimentos en ratas, para este caso también se prepararon en el laboratorio las sondas de microdiálisis para ratones. En este caso en particular, la sonda de microdiálisis consistió en un tubo de acero de 7-mm de largo y 26-ga más 1-mm de largo extra en el extremo final constituido por una membrana semi-permeable de celulosa (Spectrum labs) con un límite

máximo de permeabilidad a moléculas de 18 KDa. Con las características de esta sonda de microdiálisis fue posible lograr una protrusión de 2 mm adicionales desde la punta de la cánula guía. En el interior del tubo de 26-ga se posicionó concéntricamente un capilar de sílica de 150- $\mu$ m de diámetro externo y 75- $\mu$ m de interno que permitió coleccionar la muestra dializada. Las sondas de microdiálisis fueron colocadas bilateralmente en el CA1 del hipocampo dorsal de ratones 14 horas previas al experimento con ayuda de la cánula guía previamente implantada en el animal y se fijó con un tubo de polietileno PE-50 para evitar movimientos de la misma. Se perfundió a través de la sonda de microdiálisis solución Ringer modificada (135 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.13 mM MgCl<sub>2</sub> y 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 7.4, filtrada a 22  $\mu$ m) a una velocidad de 1  $\mu$ l/min. Para probar el efecto de la NRG1 $\beta$ -EGF-like a 1nM de concentración sobre los niveles extracelulares de la DA y sus metabolitos DOPAC y HVA en las diferentes líneas de ratones *knock-out* empleados, la misma fue perfundida por diálisis reversa durante 15 minutos a través de ambas sondas de microdiálisis simultáneamente a una velocidad de flujo de 1  $\mu$ l/min. Cada muestra fue coleccionada durante 15 minutos en tubos eppendorf de 0.2 ml que contenían 3  $\mu$ l de 0.1 M HCl y 1 mM EDTA para evitar la rápida oxidación de la DA. Todas las muestras de microdiálisis fueron coleccionadas en el cajón conductual de diálisis mediante el siguiente orden: cinco muestras basales, una muestra durante la diálisis reversa de la NRG1 y ocho muestras posterior a esto. De esta manera, 10 ratones C57BL/6, 8 ErbB4<sup>-/-MHC-erbB4</sup>, 12 PV-Cre ErbB4*floxed*, 10 controles para PV-Cre ErbB4*floxed*, 12 TH-Cre ErbB4*floxed* y 12 ratones controles para TH-Cre ErbB4*floxed* recibieron un pulso de 15 minutos de NRG1 $\beta$ -EGF-like, mientras que 8 ratones C57BL/6 únicamente recibieron un pulso de vehículo para la NRG1 como grupo control. Para verificar la integridad funcional de los terminales dopaminérgicos en el CA1 del hipocampo dorsal de los ratones dializados, se procedió a aplicar un pulso despolarizante inducido por una alta concentración extracelular de KCl (50 mM) en la solución Ringer que perfundió por 15 minutos a través de la sonda de microdiálisis. Para proceder con este experimento, una hora después de haber concluido el experimento previo se coleccionaron nuevamente muestras de diálisis cada 15 minutos y se acidificaron en HCl y EDTA al momento de su recolección mediante el siguiente orden: cinco muestras basales, 1 muestra durante el pulso de 50 mM de KCl y cuatro muestras post-test. Para este experimento se emplearon 6 ratones C57BL/6, 6 ErbB4<sup>-/-MHC-erbB4</sup>, 6 PV-Cre ErbB4*floxed*, 6 controles para PV-Cre ErbB4*floxed*, 6 TH-Cre ErbB4*floxed* y 8 ratones controles para TH-Cre ErbB4*floxed*. Finalmente, para evaluar la reactividad al estrés de las diferentes líneas *knock-out* de ratones empleados en este estudio, se procedió a emplear la prueba de pinchazo ligero en la cola mientras simultáneamente se medían los niveles extracelulares de DA, DOPAC y HVA en el CA1 del hipocampo dorsal. Para esto, se utilizaron animales nuevos y se coleccionaron muestras de microdiálisis de 15 minutos de duración cada una de la siguiente manera: cinco muestras basales, una muestra durante los 15 minutos de duración del test de pinchazo en la cola, y cuatro muestras post-test. En esta prueba final, 8 ratones C57BL/6, 6 ErbB4-

*/-<sup>MHC-erbB4</sup>*, 6 PV-Cre *ErbB4floxed*, 6 controles para PV-Cre *ErbB4floxed*, 6 TH-Cre *ErbB4floxed* y 6 ratones controles para TH-Cre *ErbB4floxed* fueron utilizados. Para todos los experimentos anteriormente indicados, la sesión de recolección de muestras de microdialisis se realizaba simultáneamente para dos ratones del mismo genotipo a modo tal de que cada pareja de muestras obtenidas eran fusionadas entre sí en un solo tubo eppendorf de 0.2 ml para inmediatamente después ser inyectadas en el sistema de HPLC, el cual finalmente permitió medir la cantidad total de DA, DOPAC y HVA contenido en la muestra. Previamente se ha reportado que los niveles extracelulares de DA en el CA1 hipocampal son significativamente bajos en ratas (~0.8 nM) [154]. Al realizar esta estrategia metodológica fue posible incrementar la cantidad total en masa de DA contenida en cada muestra, incrementando de manera importante la capacidad de detección de los niveles extracelulares de DA contenidos en el CA1 hipocampal de ratones por parte del sistema de HPLC con detección electroquímica.

Los niveles extracelulares de DA, DOPAC y HVA del CA1 del hipocampo dorsal de ratones que recibieron un pulso de 1nM de NRG1 $\beta$ -EGF-like fueron presentados como el promedio  $\pm$  SEM (error estándar de la medida) del porcentaje de variación respecto a los niveles basales (% variación). Posteriormente, para determinar cambios significativos de DA y sus metabolitos, los mismos fueron analizados con el análisis de varianza de una vía (ANOVA) para medidas repetidas, seguido del post-test de Dunnet. Adicionalmente, el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías se empleó para comparar diferencias entre genotipos. Por último, la prueba T de student se usó para comparar diferencias entre los niveles basales de DA extracelular y sus metabolitos entre los diferentes genotipos de ratones. La significancia estadística se determinó a  $p < 0.05$ .

### 5.5. Microinyecciones Intracerebrales

Los inyectores fueron fabricados en el laboratorio utilizando tubos de acero de 17-mm de largo y 33-ga, los cuales protruían 2 mm extras desde el extremo final de la cánula guía. Durante cinco días consecutivos previos al día de la microinyección, cada rata fue manipulada diariamente durante 5 minutos para evitar la ansiedad inducida por la manipulación. Por su parte, la microinyección se realizó bilateralmente en el VP con vehículo (0.9 % NaCl), vigabatrina o bicuculina meta-bromuro, 5 minutos antes de la prueba de nado forzado, preferencia por la sacarosa o de campo abierto. Las microinyecciones consistieron en un volumen final de 0.5  $\mu$ l/hemisferio perfundido en un periodo total de 1 minuto. Concluida la microinyección, los inyectores se mantuvieron implantados intracerebralmente por 1 minuto extra adicional para evitar la retracción de la solución administrada. Previo al segundo día de la prueba de nado forzado, las ratas recibieron microinyecciones de vehículo (n=12); vigabatrina a 5  $\mu$ g/hemisferio

(n=11), 10 µg/hemisferio (n=11), 15 µg/hemisferio (n=11); y bicuculina a 0.1 µg/hemisferio (n=10). Para evaluar el efecto conductual de microinyecciones realizadas fuera del VP (control anatómico negativo), un nuevo grupo de ratas (n=7) recibieron una microinyección de vigabatrina (10 µg/hemisferio). Para evaluar el rol del sistema GABA en el VP en la prueba de preferencia por la sacarosa, un nuevo grupo de ratas recibieron microinyecciones de vehículo (n=10), vigabatrina a 10 µg/hemisferio (n=10), o bicuculina a 0.1 µg/hemisferio (n=10). Finalmente, otro nuevo grupo de ratas recibieron microinyecciones de vehículo (n=10), vigabatrina a 10 µg/hemisferio (n=10) y bicuculina a 0.1 µg/hemisferio (n=10) previo a la prueba de campo abierto. Para todas las pruebas conductuales, un investigador ciego al tipo de tratamiento administrado a las ratas se encargó de medir el tiempo total de conductas de escape/inmovilidad durante el nado forzado y la actividad total locomotora en el campo abierto, utilizando para ello videos grabados de las conductas de cada animal.

Para analizar estadísticamente los resultados conductuales del nado forzado, los tiempos de inmovilidad y lucha de las ratas fueron contabilizados y la diferencia entre estos tiempos (Dia2 – Dia1) fueron calculados. Para comparar la diferencia conductual entre los diferentes tratamientos aplicados para la prueba de nado forzado, preferencia por la sacarosa, y de campo abierto, se empleó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido del post-test de Dunnet. La curva de dosis-respuesta a la vigabatrina fue analizada por una prueba de correlación lineal.

## **5.6. Pruebas Conductuales**

### **5.6.1. Prueba de Nado Forzado**

#### **5.6.1.1. Ratas**

Las conductas de inmovilidad durante la prueba de nado forzado han sido correlacionadas como un indicador del nivel de conductas de desesperanza y desmotivación expresadas en roedores, tal y como originalmente fue establecido por R. Porsolt [182] y discutido por [183]. La prueba fue realizada entre las 8:00 y 12:00 horas del día en dos sesiones de dos días consecutivos. En la primera sesión (Dia-1), las ratas fueron colocadas individualmente en un tanque de agua cilíndrico opaco (30 cm diámetro, 55 cm de alto y 45 cm de profundidad del agua a 18 °C de temperatura), durante 10 minutos. La actividad de la rata durante la sesión (periodo de lucha/inmovilidad) de 10 minutos de nado forzado fue grabada en video para su posterior análisis. Veinticuatro horas después de la primera sesión, las ratas fueron nuevamente colocadas durante 10 minutos en el tanque de agua (Dia-2) y las conductas grabadas en video. Las conductas en las que la rata intentaba escapar del tanque de agua (ej: inmersiones por debajo de la

superficie del agua, patoleo intenso con las cuatro patas, exploración de todas las paredes e intento de escalar por las mismas) fueron denominadas como “*Periodo de Lucha*”. Por su parte, las conductas en las que la rata permanecía pasivamente en el tanque de agua sin intentar escapar del mismo se les denominaron como “*Inmovilidad*”. El agua del tanque fue cambiada entre cada animal.

#### **5.6.1.2. Ratonos**

Al igual que en el caso de las ratas, en este caso se empleó el test de nado forzado en ratones para determinar conductas anhedónicas que podrían estar expresadas en las diferentes líneas de ratones modificados genéticamente. El procedimiento empleado para evaluar conductas de lucha e inmovilidad en ratones se realizó al colocar a los ratones en un tanque cilíndrico de agua (20 cm de diámetro, 30 cm de alto y 15 cm de profundidad del agua a 15 °C de temperatura), iluminado a 442lux y 55 db de ruido de fondo, durante 6 minutos. Las conductas de lucha e inmovilidad fueron evaluadas únicamente durante los últimos 4 minutos de la prueba en una única sesión, lo cual ha demostrado ser suficiente para evaluar conductas de anhedonia en ratones [184]. El agua del tanque fue cambiada entre cada animal.

Los tiempos de inmovilidad (segundos) para cada genotipo fueron promediados y la comparación entre genotipo *knock-out* vs. control se comparó mediante la prueba T de student. La significancia estadística se determinó a  $p < 0.05$ .

### **5.6.2. Pinchazo ligero en la cola**

#### **5.6.2.1. Ratas**

Dada la estrecha correlación entre los fenómenos de estrés y depresión conductual [183], un grupo nuevo de ratas fueron estresadas por dos días consecutivos con la prueba de pinchazo ligero en la cola para diferenciar los fenómenos de estrés de los de depresión conductual. Básicamente, la prueba consistió en fijar una pinza de goma a 3 cm del extremo final de la cola de la rata por 10 minutos con suficiente presión para evitar que la misma se liberara por si sola de la pinza pero evitando en todo caso cualquier síntoma de dolor, permitiendo además que la rata pudiese moverse libremente en el cajón conductual durante este periodo.

#### **5.6.2.2. Ratonos**

Reportes previos han demostrado que el hipocampo dorsal es activado ante situaciones de estrés, y que el sistema dopaminérgico en esta área cerebral es hiper-reactivo en fenotipos esquizoides [185], la

prueba de pinchazo ligero en la cola se empleó en ratones para determinar el grado de reactividad al estrés del sistema DA en el CA1 del hipocampo dorsal entre los diferentes ratones modificados genéticamente. De esta manera, empleando esta prueba conductual en los ratones *knock-out* se espera identificar que genotipo en particular exhibe fenotipos tipo-esquizoide bajo este paradigma conductual. Para el caso particular, la prueba consistió en fijar un pedazo de cinta adhesiva de 2 cm de ancho y 3 cm de largo al extremo final de la cola del ratón en una única sesión de 15 minutos de duración.

### **5.6.3. Prueba de preferencia por la sacarosa**

La prueba de preferencia por la sacarosa fue empleado en ratas para determinar conductas anhedónicas, las cuales se consideran como un componente central de la depresión conductual [2]. La prueba fue realizada siguiendo el procedimiento previamente descrito por [186]. De manera breve, durante dos días consecutivos previos al experimento las ratas fueron mantenidas individualmente en cajones conductuales y habituadas a beber agua directamente de dos botellas idénticas de 100 ml de volumen. Seguidamente, el acceso a comida y agua fue restringido completamente durante un período de 20 horas. Finalmente, 5 minutos antes de la última prueba, las ratas recibieron una inyección bilateral en el VP de vehículo, vigabatrina (10 µg/hemisferio), ó bicuculina (0.1 µg/hemisferio), y dos botellas idénticas de 100 ml de volumen que contenían la primera agua y la segunda solución de sacarosa 1% fueron colocadas en cada uno de los cajones conductuales de las ratas durante un periodo total de 2 horas. El volumen total de agua/sacarosa fue determinado al final de la prueba y el índice de preferencia por la sacarosa (el cual directamente se co-relaciona con el nivel de hedonia conductual) se calculó de la siguiente manera:  $(\text{volumen sacarosa bebido (ml)})/[(\text{volumen sacarosa bebido (ml)})+(\text{volumen agua bebido(ml)})]$ .

### **5.6.4. Laberinto elevado en cruz**

Esta prueba conductual fue empleada en ratones para evaluar niveles basales de ansiedad en ratones. El laberinto en forma de cruz hecho de Plexiglas consistió en cuatro brazos (dos abiertos y dos cerrados) de 30 x 5 cm cada uno, un área central de 5 x 5 cm y elevado 50 cm del suelo. Las paredes de los brazos cerrados fueron de 20 cm de altura. La prueba se inicio una vez que el ratón fue colocado en el centro del laberinto y la conducta del animal grabada con una video cámara durante 5 minutos. El laberinto fue limpiado con alcohol 70 % entre cada experimento. El tiempo que el animal permaneció en los brazos cerrados/abiertos fue contabilizado empleando el software Any Maze (Stoelting). Diferencias

en los tiempos (promedio  $\pm$  SEM) que los ratones permanecieron en los brazos cerrados/abiertos entre genotipo *knock-out* vs. control se compararon mediante la prueba T de student. La significancia estadística se determinó a  $p < 0.05$ .

#### **5.6.5. Prueba de aversión a comer en ambientes novedosos**

La prueba de aversión a comer en ambientes novedosos es útil para medir niveles basales de ansiedad en ratones. La misma mide la latencia del animal para animarse a comer un alimento familiar en un ambiente nuevo el cual es naturalmente ansiogénico para este. De esta manera, la cantidad de tiempo total que el animal requiere para atreverse a comer el alimento familiar en el ambiente novedoso se correlaciona directamente con el nivel de ansiedad basal del ratón en cuestión [187]. Previo a iniciar los experimentos, los ratones fueron entrenados para comer directamente del suelo durante tres días consecutivos un alimento agradable al paladar, el cual consistió en ofrecerles diariamente 1 gramo de cotufa acaramelada (palomita de maíz). Al cuarto día, el acceso a cualquier clase de alimento fue suprimido a los ratones durante 24 horas hasta iniciada la prueba conductual. La prueba de aversión a alimentarse en ambientes novedosos se inicio al colocar a un ratón por vez en un cajón conductual de 35 x 35 cm y 45 cm de altura y con 2 cm de aserrín en el fondo del mismo durante 5 minutos y el ambiente iluminado a 1200 lux de intensidad. En el centro del cajón conductual se colocó una plataforma circular de 10 cm de diámetro y 1 cm de altura que tenía sujeta un par de cotufas acarameladas en el centro de esta. El tiempo que el ratón tardó en comenzar a comer el alimento de la plataforma central (pararse en sus dos patas posteriores y desprender un pedazo de cotufa acaramelada) se consideró como el tiempo de latencia, el cual posteriormente fue empleado para su posterior análisis estadístico. Diferencias entre los tiempos de latencia entre los diferentes genotipos se determinaron mediante la prueba T de student de dos colas. Se identificaron diferencias significativas a un  $p < 0.05$ .

#### **5.6.6. Prueba de campo abierto**

##### **5.6.6.1. Ratas**

Para descartar cambios en la actividad locomotora debidos a la administración de drogas en el VP, un nuevo grupo de ratas fueron sometidas a la prueba de campo abierto. La prueba de campo abierto consistió en una cámara de madera (45 cm de altura) con una base cuadrada (60x60cm<sup>2</sup>) dividida en nueve secciones de 20x20cm<sup>2</sup>. El aparato fue colocado en un cuarto aislado de ruidos a 22 °C, iluminada

con una luz blanca de 70W colocada a 180 cm por encima del centro de la cámara de conducta. Veinte minutos antes del test, los animales fueron colocados individualmente en el cajón conductual para evitar cambios en la actividad locomotora debida a conductas exploratorias [188]. Después de este tiempo, las ratas (vehículo, 10 µg-vigabatrina/hemisferio, y 0.1 µg-bicuculina/hemisferio) recibieron una única microinyección bilateral en el VP e inmediatamente fueron retornadas al cajón conductual. La prueba de campo abierto consistió en colocar las ratas en el centro del cajón conductual y contabilizar el total de entradas a cada sección previamente establecidas durante un tiempo total de 20 minutos. El cajón conductual fue lavado con alcohol 70 % entre cada animal. La prueba completa fue grabada en video y un investigador ciego al tratamiento realizado contó el número de entradas a cada sección del campo abierto.

#### **5.6.6.2. Ratonos**

La actividad basal locomotora en los diferentes genotipos de ratones fue evaluada mediante la prueba de campo abierto. El cajón conductual para este caso fue de 35x35 y 45 cm de altura. Los ratones fueron colocados en el centro del campo abierto y la actividad motora medida durante 30 minutos con la utilización del Software Any Maze (Stoelting). El cajón de conducta fue lavado con alcohol 70 % entre cada animal. Para determinar diferencias en la actividad locomotora entre diferentes genotipos de ratones, la prueba de ANOVA de dos vías fue empleada.

#### **5.6.7. Prueba de sensibilidad por la anfetamina**

La prueba de sensibilidad por la anfetamina en roedores ha sido empleada para identificar fenotipos tipo-esquizoides, dado el hecho que pacientes Esquizofrénicos han mostrado ser hiper-reactivos a sub-dosis de esta droga respecto a pacientes normales, exacerbando la actividad dopaminérgica cerebral e incrementando los síntomas positivos de la enfermedad [189, 190]. La prueba consistió en dos fases consecutivas: “pre-inyección” y “post-inyección” de anfetamina, la cual cada una consistió en colocar al ratón en el centro de un cajón conductual de 35x35x45 cm con aserrín en el fondo de este durante 1 hora, evaluando la actividad locomotora horizontal durante estos periodos de tiempo. Luego de concluida la fase de pre-inyección, los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales de vehículo (0.9% NaCl) o anfetamina a dosis de 0.5, 1.5, 2.5, 3.5 y 4.5 mg/kg. La actividad locomotora horizontal total para cada fase de la prueba fue determinada mediante la utilización del software Any Maze (Stoelting). Finalmente se determinó el radio de la actividad motora total dividiendo la actividad motora total “post-inyección” entre la actividad motora total “pre-inyección”. La prueba *t* de student de dos colas para variables independientes fue empleada para cada dosis de anfetamina de manera separada para comparar las

diferencias entre los radios de cada pareja de genotipo (control vs. transgénico). Diferencias estadísticas significativas fueron determinadas a  $p < 0.01$ .

## 5.7. Métodos analíticos

### 5.7.1. Cromatografía electrocinética micelar acoplada a detección de fluorescencia inducida por laser

Los niveles extracelulares de GABA fueron monitoreados en muestras de microdiálisis obtenidas del VP de ratas durante las pruebas de nado forzado y pinchazo ligero en la cola. El procedimiento para medir GABA por la técnica de cromatografía electrocinética micelar con detección de fluorescencia inducida por laser ha sido reportada previamente [191]. Cada muestra de 1  $\mu$ l de volumen total fue mezclada en una relación 1:1 con solución derivatizante. Esta solución fue preparada al mezclar solución 66  $\mu$ M de fluoresceína en 20 mM de buffer carbonato a pH 9.4 con 2.5 mM de solución de isotiocianato de fluoresceína isómero-I (FITC) en acetona 1:1 v/v. Adicionalmente, 10  $\mu$ l de solución derivatizante fueron mezclados con 1 ml de solución de GABA 9.7 mM. Se permitió derivatizar las muestras en oscuridad y en una cámara húmeda por 16 horas. Se empleó un sistema capilar de electroforesis de zona (Modelo R2D2, Mérida, Venezuela) equipado con un laser de argón (20 mW) (Omnichrom, CA, USA) de 488 nm de longitud de onda. Una fibra óptica condujo el rayo laser a un espejo dicróico de 510 nm y enfocado a la ventana del capilar (Polimicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) con un objetivo de 0.85 de apertura numérica. La ventana del capilar de sílica fundida se realizó al quemar la cubierta de polimida con un mechero a 35 cm del extremo anódico en un capilar de 45 cm de largo, con 26  $\mu$ m de diámetro interno y 358  $\mu$ m de externo. La fluorescencia fue capturada a través del objetivo y enfocada en un fotomultiplicador, el cual transformaba la fluorescencia del capilar en una señal digital que era convertida a electroferogramas por un computador. El buffer de corrida consistió en 40 mM de buffer borato con 20 mM de dodecil-sulfato de sodio (SDS). La muestra de microdiálisis previamente derivatizada fue cargada en el extremo anódico del capilar aplicando presión negativa (-12 p.s.i.) durante 12 segundos por el extremo catódico del mismo. La separación electroforética fue lograda al aplicar 28 kV entre el ánodo y el cátodo del capilar durante 25 minutos. Antes de cada separación electroforética, el capilar fue lavado con 1 M de NaOH por 5 minutos seguido por un lavado de 5 minutos de agua y finalmente cargar el capilar con 5 minutos de buffer de corrida. Finalizada la separación electroforética un electroferograma se obtuvo de cada muestra, el cual sirvió para determinar la altura de los picos (AP) correspondientes a GABA y fluoresceína. Las AP de GABA fueron normalizadas de acuerdo a lo siguiente:  $(AP\ GABA_{muestra} \times AP\ fluoresceína_{inicial}) / AP\ fluoresceína_{muestra}$ . Por último, el porcentaje de

variación de las AP de GABA normalizada respecto a la línea basal se calculó de acuerdo a lo siguiente:  $\{AP\ GABA_{normalizada}/promedio\ (basal\ AP\ GABA_{normalizada})\} \times 100$ . Finalmente, los datos correspondientes a cada tratamiento fueron agrupados y los resultados presentados como el promedio  $\pm$  SEM. Para determinar si el tratamiento en particular fue capaz de generar cambios significativos de los niveles de GABA, la prueba de ANOVA para medidas repetidas fue empleada, seguida del post-test de Dunnett. La significancia estadística se determinó a  $p < 0.05$ .

### 5.7.2. HPLC-ECD

La DA, DOPAC y HVA fueron separadas mediante cromatografía líquida de alta resolución con fase reversa, usando para ello una columna de 10 cm de largo y 3.2 mm de diámetro RP-C18 (Velosep, Perkin Elmer, Massachusetts, USA). La fase móvil de separación consistió en 1.19 mM de ácido 2-octanesulfónico, 1 mM EDTA, 144 mM ácido monocloroacético, 100 mM NaOH y 2 % acetonitrilo, pH 3.45, y la solución filtrada a 0.22  $\mu$ m y degasificada antes de pasarla a través de la columna a 35°C y a un flujo de 1 ml/min. El volumen total de cada muestra dializada (~60  $\mu$ l) fue inyectada en un asa de 100  $\mu$ l y luego de su separación, detectada amperométricamente a 700 mV (amperometric detector model LC-4C, BASi, Indiana, USA) y un rango de detección de 1 nA, empleando un electrodo de platino de 6 mm (BASi) de diámetro y un electrodo de referencia de Ag-AgCl (BASi). Los cromatogramas fueron obtenidos a través de una interfase DA-5 (BASi) y la altura de los picos correspondientes a DA, DOPAC y HVA determinados a través del software ChromGraph (BASi). La altura de los picos (AP) correspondientes a cada neurotransmisor se correlacionaron a una concentración en particular, al comparar estas alturas respecto a las alturas previamente obtenidas con estándares para DA, DOPAC y HVA. Finalizada la separación cromatográfica y determinada las AP de interés, el porcentaje de variación de cada neurotransmisor fue determinado respecto a los niveles obtenidos en las muestras basales. Para ello la siguiente fórmula fue empleada:  $[AP\ DA/promedio\ (basales\ AP\ DA)] \times 100$ . Finalmente, los datos correspondientes a cada genotipo fueron agrupados y los resultados presentados como el promedio  $\pm$  SEM. Para determinar si la NRG1 fue capaz de generar cambios significativos de DA y de sus metabolitos analizados, la prueba de ANOVA para medidas repetidas fue empleada, seguida del post-test de Dunnett. La significancia estadística se determinó a  $p < 0.05$ .

### 5.7.3. RT-PCR

El método de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) fue empleado para valorar los niveles de expresión relativa de ARNm para 19 subunidades del receptor GABA-A ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ - $\beta 3$ ,  $\gamma 1$ - $\gamma 3$ ,  $\delta$ ,  $\pi$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\rho 1$ - $\rho 3$ ) en el VP de ratas. El ARN total fue aislado inmediatamente de VP extraídos bilateralmente de ratas no entrenadas (controles) o luego de concluido el Día-2 del nado forzado o del test de pinchazo en la cola mediante el método de Trizol (Invitrogen, CA, USA). La disección bilateral de los VP de ratas se realizó mediante el empleo de un estereoscopio y con la ayuda de las siguientes coordenadas estereotáxicas [178]: (AP: 0,0 a +1 mm; L: 1,2 a 2,4 mm; V: 7,4 a 9,0 mm). Las muestras fueron colectadas de manera independiente para cada tratamiento y un pool de 5 ratas por grupo fue homogenizado, a modo total de obtener cantidades mínimas suficientes de ARN para los experimentos sucesivos. Todas las muestras de ARN total extraído fueron tratadas con DNasa I y luego transcritas a ADNc mediante el protocolo previamente descrito en [71].

Los cebadores para amplificar por PCR las 19 subunidades de GABA-A fueron diseñados mediante el software Oligo Explorer (v. 1.1.2) (Teemu Kuulasmaa Kuopio, Finlandia) para amplificar regiones intrónicas de ADN para cada gen estudiado, empleando para ello las secuencias nucleotídicas indicadas en el GenBank [192] y comprados a Invitrogen. Un par de cebadores previamente diseñados por [193] los cuales amplifican el gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fueron empleados como control interno para normalizar los niveles de expresión de los genes para las subunidades de GABA-A. Antes de examinar la expresión de cada gen, una curva estándar para determinar el número de ciclos de amplificación por PCR fue generada, a modo tal de determinar la fase exponencial de amplificación por PCR del templado en cuestión. La composición de ácidos nucleicos de cada cebador, los números de acceso GenBank, tamaño del amplicón obtenido, y número de ciclos de PCR de amplificación dentro de la fase exponencial son presentados en la Tabla 2.

Cada producto de PCR fue resuelto mediante separación electroforética en gel de agarosa 2 %, aplicando 100 V entre el ánodo y cátodo con 0.5  $\mu$ g/ml de concentración de bromuro de etidio, y 100 bp DNA Ladder (Promega, Madison, WI, USA) como marcador de peso molecular. Finalmente, los geles fueron visualizados mediante el Gel Logic Imaging System (Kodak, New Haven, USA), con un tiempo de exposición al sistema de CCD de 0.5 segundos para evitar sobre-exposición de las bandas. Posteriormente, la densidad de las bandas (pixels<sup>2</sup>) fue cuantificada con el Software Molecular Imaging (v. 4.0.1)(Kodak), para las bandas correspondientes a los grupos controles, nado forzado y pinchazo en la cola, y normalizadas con respecto a la densidad de la banda correspondiente a los niveles de expresión del GAPDH. Para la normalización de la densidad de las bandas se empleó la siguiente fórmula: (densidad banda GAPDH<sub>control</sub>/densidad banda GAPDH<sub>muestra</sub>)x(densidad banda<sub>muestra</sub>). Finalmente, el índice de expresión fue calculado mediante la siguiente fórmula: (densidad banda<sub>muestra</sub>/densidad banda<sub>control</sub>)-1.

Cada experimento que representó a un total de 5 ratas se realizó de manera independiente al menos tres veces y los datos obtenidos empleados para su posterior análisis estadístico. Los datos son representados como el promedio  $\pm$  SEM del radio de variación de expresión respecto al grupo control, y para determinar diferencias significativas en los niveles de expresión de cada subunidad, los grupos control, pinchazo en la cola y nado forzado fueron comparados mediante el ANOVA de una vía, seguido del post-test de Dunnet. La significancia estadística fue determinada a un  $p < 0.05$ . Las secuencias nucleotídicas de cada fragmento de PCR obtenido fueron verificadas mediante secuenciamiento por MGW Biotech AG (Elbersberg, USA) y CESAAN (IVIC, Venezuela).

**Tabla2:** Composición de ácidos nucleicos de cada cebador (Fw-sentido, Rv-antisentido), los números de acceso GenBank, tamaño del amplicón obtenido, número de ciclos de PCR de amplificación dentro de la fase exponencial y temperatura de alineamiento de la reacción de PCR.

Subunidad	Acceso GenBank	Cebadores (5'→3')	Amplicón (pb)	Nº. de ciclos PCR	Tm (°C)
$\alpha 1$	L08490	Fw: CCCACACCCCATCAATAGG Rv: GATTTTGCTCTCTGGCTTCCTCTC	245	30	60
$\alpha 2$	L08491	Fw: TGTATTAGGGGTTAGTCCTTG Rv: CTAGGTAATGTGTTGAAAAGG	271	25	50
$\alpha 3$	L08492	Fw: AGTAGATAATATGGGCAGCACAGC Rv: ATGGCAGTGAAAGGCTCAATC	219	35	55
$\alpha 4$	L08493	Fw: GCTGCCCAGGAGTCTCTG Rv: TCTATTTACTTGTGCCAGATCCAG	308	30	59
$\alpha 5$	L08494	Fw: AAGTTGACCCATCCTCCAAAC Rv: TCTCCTCAGGTTTCATTTCTGTG	292	30	60
$\alpha 6$	L08495	Fw: ACTTTGCCAATCGTTCATC Rv: AATAATTTGTGTTCTGTAAGCGAGG	304	30	59
$\beta 1$	X15466	Fw: TAACCCACAGATTTCCAAC Rv: GCCAACAATGTCTAACACCC	243	30	50
$\beta 2$	X15467	Fw: CATCAATCCAGGACAAAAGC Rv: AACTGCGTGCCAACCTTAG	312	30	55
$\beta 3$	X15468	Fw: CACACACACACACATACACAG	310	30	59

		Rv: AAGACACACTTTGGGATGACTG			
$\gamma 1$	X57514	Fw: CTTAGTCCAATATAATCAC Rv: AAAAATTATTAAGTTTACTG	205	$i^?$	$i^?$
$\gamma 2$	L08497	Fw: ATCTGTGAGGAGGTTTGGG Rv: AGGTATCTTGCTCAGTCTAACAG	266	35	50
$\gamma 3$	X63324	Fw: GTGTTACCTTTTCAGCAGGATGGG Rv: TGAGTGTGTGTGTGTATGTGTGTG	212	$i^?$	$i^?$
$\rho 1$	X95579	Fw: GGTTCCTCTGTCCCTGTTTCAGC Rv: TGAGTTTTATTTAGGTCCTCCAGATC	294	30	60
$\rho 2$	D38494	Fw: CTAGGGATTCTAAGGCTGGATCTGG Rv: AGTCAAAAGTGTGATCTGGAATAGTGTG	195	30	60
$\rho 3$	NM_138897	Fw: GACTTCCTTCTTCTACACTCTG Rv: ACTGCCCAACTTATATCCAG	381	30	55
$\delta$	L08496	Fw: CGTGAGGAACGCCATTGTCC Rv: GTGTACGCACTGCCGTCACATG	301	35	60
$\pi$	U95368	Fw: GCAAAGGACTCAGAAGAAGTCAAT Rv: GCCAACATAAAAATCAAAGGAAAC	260	35	58
$\theta$	AF419333	Fw: AAAGGGGATGCTGACAGTATC Rv: AGGAAAGAGGGGAGAGGAAAC	211	30	58
$\epsilon$	U92284	Fw: GITTGTGTGTGAGATTGTTAC2ATG Rv: GAAGAAGAATGTAATGGGGAAAAG	250	30	58
GAPDH	M17701	Fw: GTGGACATTGTTGCCATCAACGAC Rv: TTTCTCGTGGTTCACCCATCA	336	30	58

#### 5.7.4. Western Blot

Los experimentos de Western Blot fueron empleados para determinar los niveles de expresión relativos para tres subunidades del receptor GABA-A ( $\alpha 3$ ,  $\delta$  y  $\gamma 2$ ) en VP de ratas control, ratas sometidas al pinchazo en la cola y al nado forzado, detectando al mismo tiempo los niveles de expresión de la proteína citoesquelética  $\alpha$ -tubulina como estándar interno. VP bilaterales de ratas fueron disecados posterior al Día-2 o Día-8 de ratas control, pinchazo en la cola y nado forzado tal y como ha sido descrito en la sección anterior (sección 5.7.3). Las muestras fueron colectadas de manera independiente para cada grupo experimental, usando un pool de VP equivalente a 5 ratas/grupo. Las muestras de VP de cada grupo

fueron homogenizadas independientemente en buffer de homogenización (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM NaF, 10 mM β-glicerol fosfato, 1 % nonidet P-40, 10 μg/ml leupeptina, 5 μg/ml de aprotinina, pH 7.4 y a 4 °C. La concentración total de proteínas fue estimado mediante el método de Bradford [194]. Posteriormente las muestras fueron diluidas en buffer SDS (10 % glicerol, 143 mM β-mercaptoetanol, 187.5 mM Tris-HCl, 0.1 % azul bromofenol, y 22.9 mM SDS en buffer de homogenización, pH 7.4) a una concentración final de proteínas de 5 μg/μl, llevadas a 100 °C por 10 minutos y guardadas a -20 °C hasta su uso.

Las muestras desnaturalizadas de proteínas fueron separadas electroforéticamente en un gel de 12 % poliacrilamida-SDS (150 μg/pozo) a 100 V y transferidos a una membrana de nitrocelulosa (0.45 μm) (Hybond ECL, Amersham GE Healthcare, Noruega). La transferencia de proteínas a la membrana se verificó mediante la tinción de *Ponceau*. Para la inmunodetección de las subunidades de interés, los blots fueron bloqueados de la siguiente manera: para α3, 2 horas de incubación en TBST y 5 % de caseína; para δ, 1 hora en TBST y leche descremada al 5 %; para γ2, 2 horas en TBST y 5% caseína-1% BSA. Seguidamente, la incubación con anticuerpos primarios policlonales se realizó a 4 °C durante 18 horas tal y como se indica a continuación: para α3, dilución 1:100 de GABAA Rα3 N-19 (sc-7353, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); para δ, dilución 1:500 de GABAA Rδ H-100 (sc-25705, Santa Cruz); para γ2, 1:550 de rabbit-polyclonal IgG anti-γ2 subunit (AB5954, Millipore, MA, USA). La incubación con anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano picante (IgG-HRP) se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente con donkey anti-goat IgG-HRP (sc-2020, Santa Cruz) diluido a 1:4500 para detectar α3 y goat anti-rabbit IgG-HRP (AP187P, Millipore) diluido a 1:5000 para δ y 1:6000 para γ2. La inmunoreactividad se logró mediante el uso de solución quimioluminiscente (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, IL, USA), y películas de rayos X fueron expuestas a los blots bajo condiciones no saturantes. Los blots fueron desnudados de la presencia de complejos anticuerpo primario/secundario mediante el uso de solución Stripping (Restore Western blot Stripping Buffer, Thermo Scientific) durante 10 minutos a temperatura ambiente, bloqueados 1 hora con leche descremada 4 %, incubados 1 hora con anticuerpo primario 1:100 anti-αTubulina P16 (sc-31779, Santa Cruz), y 1 hora con anticuerpo secundario 1:3000 donkey anti-goat IgG-HRP (sc-2020, Santa Cruz) para su detección quimioluminiscente. Finalmente, las bandas para las subunidades GABA-A y del estándar interno fueron digitalizados en condiciones no saturantes con un sistema CCD, Gel Logic Imaging System (Kodak) y las densidades de las bandas cuantificadas con el software Molecular Imaging Software (V 4.0.1) (Kodak), para los grupos control, pinchazo en la cola y nado forzado, para posteriormente ser normalizados respecto a la densidad de la banda del estándar interno de la misma manera como previamente ha sido explicado. Las condiciones de Western blot fueron verificados usando extracto de

proteína total cerebelar como control positivo. Cada experimento fue realizado de manera independiente al menos tres veces antes de proceder con el análisis estadístico correspondiente. Los datos son representados como el promedio  $\pm$  SEM del radio de variación de expresión respecto al grupo control, y para determinar diferencias significativas en los niveles de expresión de cada subunidad, los grupos control, pinchazo en la cola y nado forzado fueron comparados mediante el ANOVA de una vía, seguido del post-test de Dunnet. La significancia estadística fue determinada a un  $p < 0.05$ .

### **5.8. Análisis histológicos**

Los análisis histológicos fueron empleados para verificar de manera precisa la localización final de las sondas de microdiálisis e inyectores implantados. Las ratas recibieron una sobredosis de fenobarbital sódico y fueron perfundidas transcardíacamente con 0.1 M PBS a pH 7.4 seguido de 4 % formaldehído en 0.1 M PBS a pH 7.4. Para el caso de los ratones, los mismos fueron sacrificados en una cámara de CO<sub>2</sub> la cual indujo la muerte rápida de los mismos. Seguidamente, estos fueron perfundidos de la misma manera que para el caso de las ratas. Para todos los casos, los cerebros fueron removidos y mantenidos en 4 % formaldehído en 0.1 M PBS a pH 7.4 por 48 horas antes de seccionarlos de manera coronal a 40  $\mu$ m de grueso hasta que la lesión del inyector o la sonda de microdiálisis fuese completamente expuesta.

## **6. RESULTADOS**

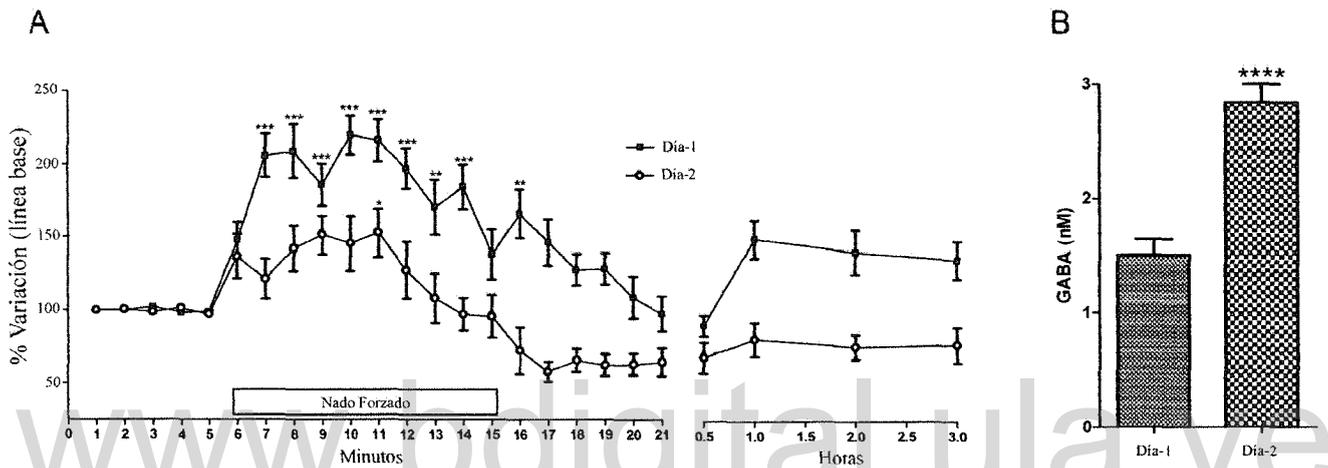
### **6.1. Factores ambientales que afectan la conducta en ratas**

#### ***6.1.1 El nado forzado incrementa la actividad GABAérgica en el VP por un mecanismo diferente al inducido por la prueba de pinchazo en la cola***

##### ***6.1.1.1. Efecto del nado forzado sobre los niveles extracelulares de GABA en el VP***

Durante la prueba de nado forzado, los niveles extracelulares de GABA en el VP incrementaron significativamente a  $219,6 \pm 13.2$  % para el Día-1 y a  $152,8 \pm 16.7$  % para el Día-2 con respecto a los niveles basales de GABA antes de la prueba. Este incremento significativo ocurrió únicamente durante el período de nado forzado, por lo cual, finalizada la sesión los niveles de GABA retornaron a los niveles

basales originales para ambos días de la prueba (Día-1:  $F(13,312)=13.51$ ,  $p<0.0001$ ; Día-2:  $F(12,288)=7.733$ ,  $p<0.0001$ ;  $n=14$ ) (Figura 9A). El incremento en los niveles de extracelulares de GABA durante la prueba de nado forzado resultaron ser diferentes entre ambos días, esto al ser comparados por el análisis de varianza de dos vías ( $F=34.81$ ,  $df=1/576$ ,  $p<0.0001$ ). Al comparar los niveles extracelulares basales absolutos de GABA en el VP, se encontró que los mismos estaban incrementados significativamente al inicio del segundo día de la prueba de nado forzado (Día-1:  $1.50 \pm 0.14$  nM; Día-2:  $2.84 \pm 0.16$  nM;  $t(12)=8.253$ ,  $p<0.0001$ ) (Figura 9B).



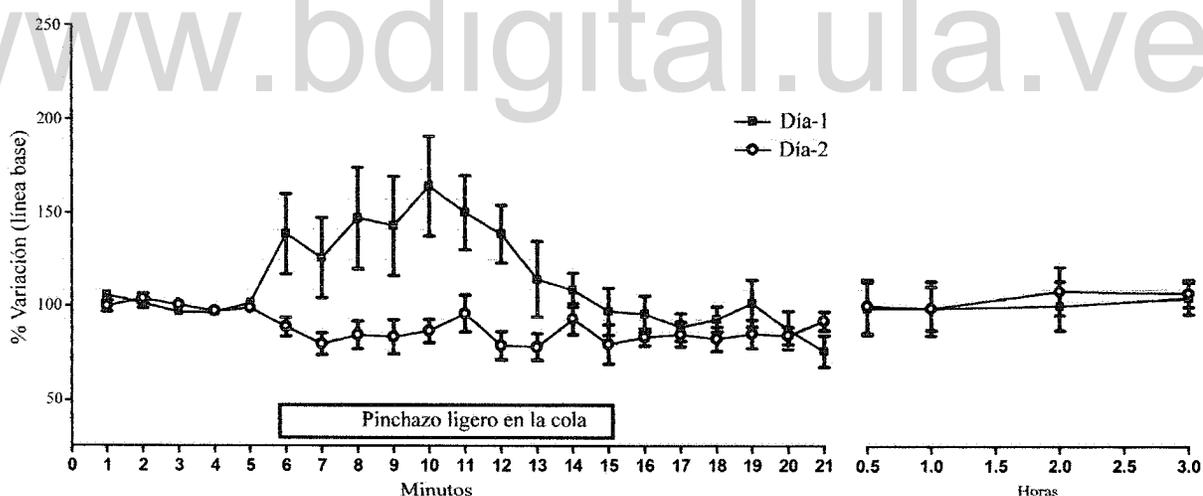
**Figura 9:** (A) Porcentaje de variación de los niveles extracelulares de GABA respecto a los niveles basales de ratas sometidas a la prueba de nado forzado. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.001$ . (B) Los niveles basales absolutos de GABA se incrementaron significativamente al Día-2 de la prueba; \*\*\*\* $p<0.0001$ .

#### 6.1.1.2. Efecto del pinchazo ligero en la cola sobre los niveles extracelulares de GABA en el VP

Tal y como puede ser apreciado en la Figura 10, las ratas sometidas a la prueba del pinchazo ligero en la cola ( $n=7$ ) incrementaron significativamente los niveles de GABA únicamente durante la etapa de estrés a un  $164,2 \pm 26.9$  % en el primer día de la prueba ( $F(6,144)=2.46$ ,  $p<0.001$ ). En contraste, el segundo día de la prueba redujo de manera significativa los niveles de GABA por debajo de los niveles basales ( $78,0 \pm 7,2$  %) únicamente durante la fase de pinchazo ligero en la cola ( $F(6,144)=1.867$ ,  $p<0.02$ ). También se encontró que la manera como variaron los niveles de GABA durante la prueba para ambos días fue estadísticamente significativa ( $F=13.20$ ,  $df=1/288$ ,  $p<0.004$ ). Los niveles basales extracelulares absolutos entre ambos días de la prueba no resultaron estar alterados de manera significativa (Día-1:  $1.26 \pm 0.32$  nM; Día-2:  $1.23 \pm 0.19$  nM).

### 6.1.2. La vigabatrina potencia la activación del sistema GABAérgico del VP

La vigabatrina (20 µg/ml) perfundida a través de la sonda de microdiálisis implantada en el VP demostró ser capaz de incrementar de manera significativa los niveles extracelulares de GABA en esta área cerebral (ver niveles de GABA a los minutos 15 y 20, *Figura 11*). Por su parte, cuando la rata fue sometida a la prueba de nado forzado los niveles de GABA se incrementaron por encima de los niveles previamente estimulados por la acción de la vigabatrina (ver niveles de GABA a los minutos 25 y 30, *Figura 11*). Este incremento en los niveles extracelulares de GABA fue mantenido aun después de terminado el pulso de vigabatrina y el periodo de nado forzado para la rata (hasta 2 horas después del nado forzado) ( $F(6,54)=18.80$ ,  $p<0.0001$ ). La aplicación de un pulso de solución vehículo para vigabatrina (0.9% NaCl) por sí mismo no fue capaz de incrementar los niveles extracelulares de GABA en el VP (ver niveles de GABA a los minutos 15 y 20, *Figura 11*), mientras que un incremento de menor magnitud respecto a las ratas que recibieron vigabatrina fue registrado durante la etapa de nado forzado ( $F(6,54)=17.12$ ,  $p<0.0001$ ). Al comparar ambos tratamientos (vehículo vs. vigabatrina) se encontró que la vigabatrina genera cambios significativos en como los niveles extracelulares de GABA en el VP cambian respecto al tiempo ( $F=25.90$ ,  $df=1/108$ ,  $p<0.0004$ ).

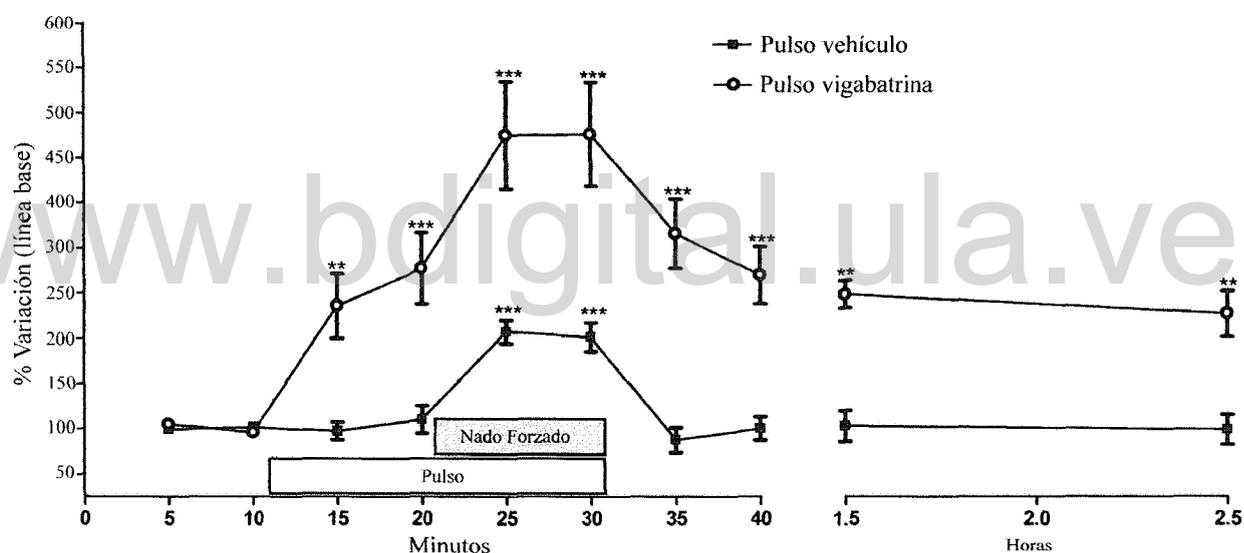


**Figura 10:** Porcentaje de variación de los niveles extracelulares de GABA respecto a los niveles basales de ratas sometidas a la prueba de pinchazo en la cola. Los niveles de GABA incrementaron significativamente durante el primer día de la prueba, mientras que para el segundo día los niveles de GABA fueron reducidos respecto a la línea base.

### 6.1.3. El tono GABAérgico del VP determina el grado de motivación emocional

### 6.1.3.1. Efecto de microinyecciones de vigabatrina, bicuculina y vehículo en el VP sobre las conductas de motivación en el nado forzado

Cuando la vigabatrina fue directamente microinyectada en el VP 5 minutos antes del segundo día de la prueba de nado forzado, las ratas incrementaron de manera significativa y dosis-dependiente las conductas de inmovilidad, respecto a ratas que recibieron microinyecciones de vehículo (0,9 % NaCl) ( $Y=24.17x+26.35$ ;  $R=0.9$ ) (ver Tabla 3 y Figura 12). De manera contraria, microinyecciones de bicuculina en el VP redujo de manera significativa los tiempos de inmovilidad en ratas (Tabla 3). Microinyecciones de vigabatrina (10  $\mu\text{g}$ /hemisferio) a 2,5 mm por encima (dorsal) del VP genero un efecto conductual opuesto al observado cuando las ratas recibieron microinyecciones en el VP; el cual consistió en una reducción significativa en las conductas de inmovilidad en ratas ( $F(5,56)=15.72$ ,  $p<0.0001$ ) (Figura 12).



**Figura 11:** La vigabatrina (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) administrada durante 20 minutos por diálisis reversa en el VP de ratas incrementó significativamente los niveles de GABA (ver tiempo a 15 y 20 min) en comparación con ratas que recibieron un pulso de vehículo (control). El nado forzado incrementó significativamente los niveles de GABA en ratas que recibían un pulso de vehículo durante la etapa de nado forzado; sin embargo, este incremento fue mayor para el caso de las ratas que simultáneamente recibían un pulso de vigabatrina (ver tiempo a 25 y 30 min). Este incremento en los niveles de GABA se mantuvo luego de culminada la fase de nado forzado para aquellas ratas que recibieron el pulso de vigabatrina exclusivamente. \*\* $p<0.01$ ; \*\*\* $p<0.0001$ .

**6.1.3.2. Efecto de microinyecciones de vigabatrina, bicuculina y vehículo en el VP sobre la preferencia por la solución de sacarosa**

Ratas que recibieron microinyecciones de vigabatrina (10 µg/hemisferio) en el VP redujeron de manera significativa la preferencia por una solución de sacarosa en comparación con aquellas ratas que recibieron una microinyección de vehículo; sin embargo, la bicuculina microinyectada en el VP no fue capaz de modificar la preferencia de las ratas por la solución de sacarosa (vehículo:  $0.85 \pm 0.03$ , n=10; vigabatrina:  $0.73 \pm 0.03$  n=10; bicuculina:  $0.86 \pm 0.03$ , n=10) ( $F(2,27)=6.728$ ,  $p<0.005$ ) (Figura 13).

**Tabla 3:** Tiempo total en segundos (seg) de las conductas de lucha e inmovilidad, y la diferencia entre ambos días (día2 – día1) en ratas sometidas a la prueba de nado forzado y que recibieron una única microinyección bilateral en el VP 5 minutos antes de la segunda sesión de nado (día-2). Cada microinyección consistió en administrar vehículo, vigabatrina (5, 10 y 15 µg/hemisferio), ó bicuculina (0.1 µg/hemisferio). Un grupo diferente de ratas también recibieron una microinyección bilateral de vigabatrina (10 µg/hemisferio) a 2.5 mm por encima del VP (dorsal) como control anatómico negativo. ns- no significativo.

	Lucha (seg)			Inmovilidad (seg)			n	p
	Día-1	Día-2	Día 2 – Día 1	Día-1	Día-2	Día 2 – Día 1		
Vehículo	229.8 ± 31.4	183.3 ± 25.6	-46.5 ± 16.4	370.3 ± 31.4	416.8 ± 25.6	46.5 ± 16.4	12	ns
Vigabatrina 5 µg	295.0 ± 28.6	225.1 ± 22.0	-69.9 ± 14.5	305.0 ± 28.6	374.9 ± 22.0	69.9 ± 14.5	11	ns
Vigabatrina 10 µg	210.6 ± 42.9	90.1 ± 24.5	-120.5 ± 18.9	389.4 ± 42.9	509.9 ± 24.5	120.5 ± 18.9	11	<0.01
Vigabatrina 15 µg	213.3 ± 28.8	103.1 ± 16.8	-110.2 ± 16.3	359.6 ± 37.7	504.7 ± 22.3	110.2 ± 16.3	11	<0.05
Bicuculina 0.1 µg	208.9 ± 25.6	241.9 ± 26.2	33.0 ± 16.6	391.1 ± 25.9	358.1 ± 26.2	-33.0 ± 16.6	10	<0.01
Por encima del VP Vigabatrina 10 µg	265.9 ± 15.8	312.6 ± 28.0	46.7 ± 18.4	334.1 ± 15.8	287.4 ± 28.0	-46.7 ± 18.4	7	<0.01

### **6.1.3.3. Efecto de microinyecciones de vigabatrina, bicuculina y vehículo en el VP sobre la actividad locomotora**

Microinyecciones de vigabatrina en el VP (10 µg/hemisferio) no produjo cambios significativos en la actividad locomotora de ratas ( $98.4 \pm 14.7$  cuentas,  $n=10$ ), respecto a la actividad locomotora exhibida por ratas que recibieron microinyecciones de vehículo ( $90.3 \pm 5.5$  cuentas,  $n=10$ ); sin embargo, microinyecciones de bicuculina en el VP si fueron capaz de incrementar dicha actividad ( $217 \pm 23.3$  cuentas,  $n=10$ ) ( $F(2,27)=19.21$ ,  $p<0.0001$ ) (Figura 14).

### **6.1.4. El nado forzado y la prueba de pinchazo en la cola determinan cambios rápidos selectivos en la expresión de ARNm de subunidades de GABA-A y cambios lentos en la expresión de su correspondiente proteína**

#### **6.1.4.1. Patrón de expresión de ARNm de subunidades para GABA-A, antes, durante y después del nado forzado y del pinchazo ligero en la cola**

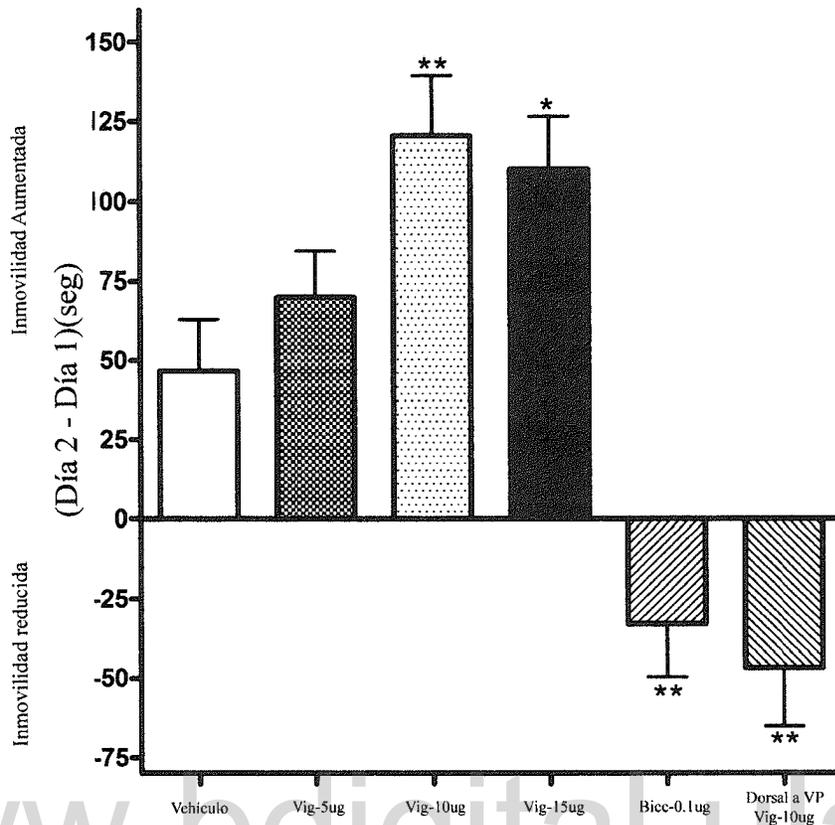
De las 19 subunidades que se intentaron estudiar en este trabajo, únicamente 17 se lograron amplificar por RT-PCR a partir de ARNm obtenido de extracto total cerebral (no fue posible amplificar las subunidades  $\gamma 1$  y  $\gamma 3$ ). Las subunidades amplificadas por este método mostraron el siguiente porcentaje de identidad respecto a las secuencias de ADNc depositadas en el GenBank para las subunidades del receptor GABA-A:  $\alpha 1$ -98%,  $\alpha 2$ -99%,  $\alpha 3$ -100%,  $\alpha 4$ -95%,  $\alpha 5$ -99%,  $\alpha 6$ -95%,  $\beta 1$ -99%,  $\beta 2$ -100%,  $\beta 3$ -95%,  $\gamma 2$ -95%,  $\delta$ -97%,  $\epsilon$ -99%,  $\theta$ -100%,  $\pi$ -99%,  $\rho 1$ -100%,  $\rho 2$ -99%,  $\rho 3$ -100%. Los porcentajes de identidad nucleotídica ( $\geq 95\%$ ) sirvió para confirmar que los cebadores diseñados para este estudio efectivamente amplificaron regiones de ADN correspondientes a las subunidades del receptores GABA-A.

Cuando se empleo el método de RT-PCR semicuantitativo a muestras de VP de ratas luego de finalizado la segunda sesión de nado forzado, no fue posible detectar la expresión de ARNm para las subunidades  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 3$  y  $\rho 1$ , mientras que las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ,  $\epsilon$ ,  $\rho 2$  y  $\rho 3$ , aunque estas si pudieron ser detectadas por el método, las mismas no cambiaron su patrón de expresión para los diferentes tratamientos aplicados a las ratas (Nado forzado, pinchazo en la cola y controles). Por el contrario, las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\delta$ , y  $\gamma 2$  expresadas en el VP de ratas mostraron cambios significativos en los niveles de expresión relativa de ARNm cuando las ratas fueron sometidas a la prueba de nado forzado. Finalizado el segundo día de nado forzado, se pudo detectar un incremento significativo en la expresión de la subunidad  $\delta$  ( $F(2,9)=4.489$ ,  $p<0.05$ ,  $n=4$ ), mientras que las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 2$  redujeron los niveles de expresión respecto a ratas no sometidas a ningún tratamiento conductual (control) ( $\alpha 3$ :  $F(2,12)=4.329$ ,  $p<0.04$ ,  $n=5$ ;  $\gamma 2$ :  $F(5,15)=4.656$ ,  $p<0.03$ ,  $n=6$ ) (Figura 15). Los niveles de expresión de

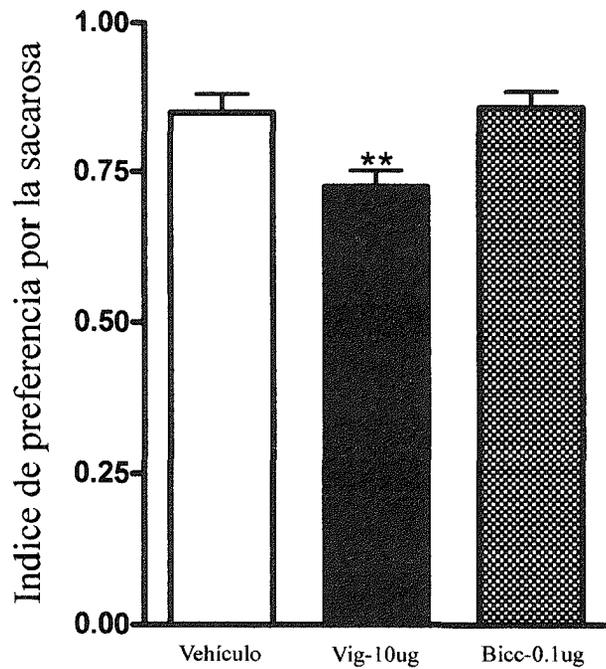
todos los genes expresados en el VP de ratas tratadas en los diferentes modelos conductuales se presentan en la Tabla 4.

#### 6.1.4.2. Patrón de expresión de proteínas para subunidades de GABA-A, antes, durante y después del nado forzado y del pinchazo ligero en la cola

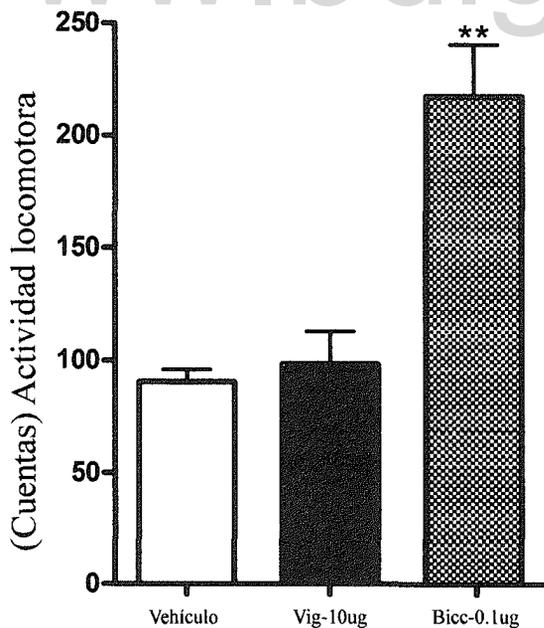
Luego de identificadas las subunidades del receptor GABA-A que se expresaban y mostraban cambios significativos en sus niveles de expresión de ARNm luego de que las ratas fueron sometidas a las pruebas de pinchazo ligero en la cola y de nado forzado, procedí a verificar si sus correspondientes proteínas mostraban el mismo patrón de expresión en el VP. De esta manera, emplee el método de Western blot para identificar los niveles de expresión de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\delta$  y  $\gamma 2$  del receptor GABA-A en el VP de ratas sometidas a las mismas pruebas conductuales utilizadas en la sección anterior. Sin embargo, los niveles de expresión de la subunidad  $\alpha 3$  (proteína) nunca pudo ser detectada por este método para ninguno de los grupos experimentales o controles empleados. Por su parte, aunque las subunidades  $\delta$  y  $\gamma 2$  pudieron ser detectadas por este método, las mismas no mostraron cambios significativos en los niveles de expresión de sus proteínas luego de que las ratas fueron sometidas a dos sesiones consecutivas para las pruebas de pinchazo ligero en la cola y del nado forzado (Índices de expresión Dia-2:  $\delta$ -pinchazo en la cola:  $0.06 \pm 0.11$ ;  $\delta$ -nado forzado:  $0.22 \pm 0.24$ ,  $n=3$ )( Índices de expresión Dia-2:  $\gamma 2$ -pinchazo en la cola:  $-0.05 \pm 0.10$ ;  $\gamma 2$ -nado forzado:  $0.07 \pm 0.06$ ,  $n=3$ ). Posteriormente, empleando un nuevo grupo de ratas sometidas a las pruebas de pinchazo en la cola y de nado forzado por dos sesiones, procedí nuevamente a analizar los patrones de expresión proteica para estas subunidades pero en esta ocasión esperando 6 días extras antes de proceder con las disecciones bilaterales de los VP de ratas (equivalente al Dia-8). De manera interesante, en esta ocasión fue posible detectar cambios significativos en la expresión para las subunidades  $\delta$  y  $\gamma 2$  durante la prueba de nado forzado en la misma dirección de cambio de expresión de sus correspondientes ARNm (Índices de expresión Dia-8:  $\delta$ -pinchazo en la cola:  $0.07 \pm 0.24$ ;  $\delta$ -nado forzado:  $0.93 \pm 0.19$ ;  $F(2,6)=8.498$ ,  $p<0.02$ ,  $n=3$ ) (Índices de expresión Dia-8:  $\gamma 2$ -pinchazo en la cola:  $-0.04 \pm 0.06$ ;  $\gamma 2$ -nado forzado:  $-0.39 \pm 0.07$ ;  $F(2,6)=16.66$ ,  $p<0.004$ ,  $n=3$ ) (Figura 16). En esta ocasión nuevamente no fue posible detectar por el método la subunidad  $\alpha 3$ .



**Figura 12:** Diferencias entre los tiempos de inmovilidad de ratas (día2 – día1) sometidas a la prueba de nado forzado. Ratas que recibieron microinyecciones intra-VP de vigabatrina (Vig) fueron más inmóviles respecto a ratas que recibieron microinyecciones de vehículo (dosis de 10 y 15  $\mu\text{g}$  vigabatrina / hemisferio). Microinyecciones de bicuculina (Bicc) redujeron de manera significativa las conductas de inmovilidad en ratas. Resultados similares se obtuvieron para microinyecciones de vigabatrina 10  $\mu\text{g}$ /hemisferio a 2.5 mm por encima del VP (coordinada ventral). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .



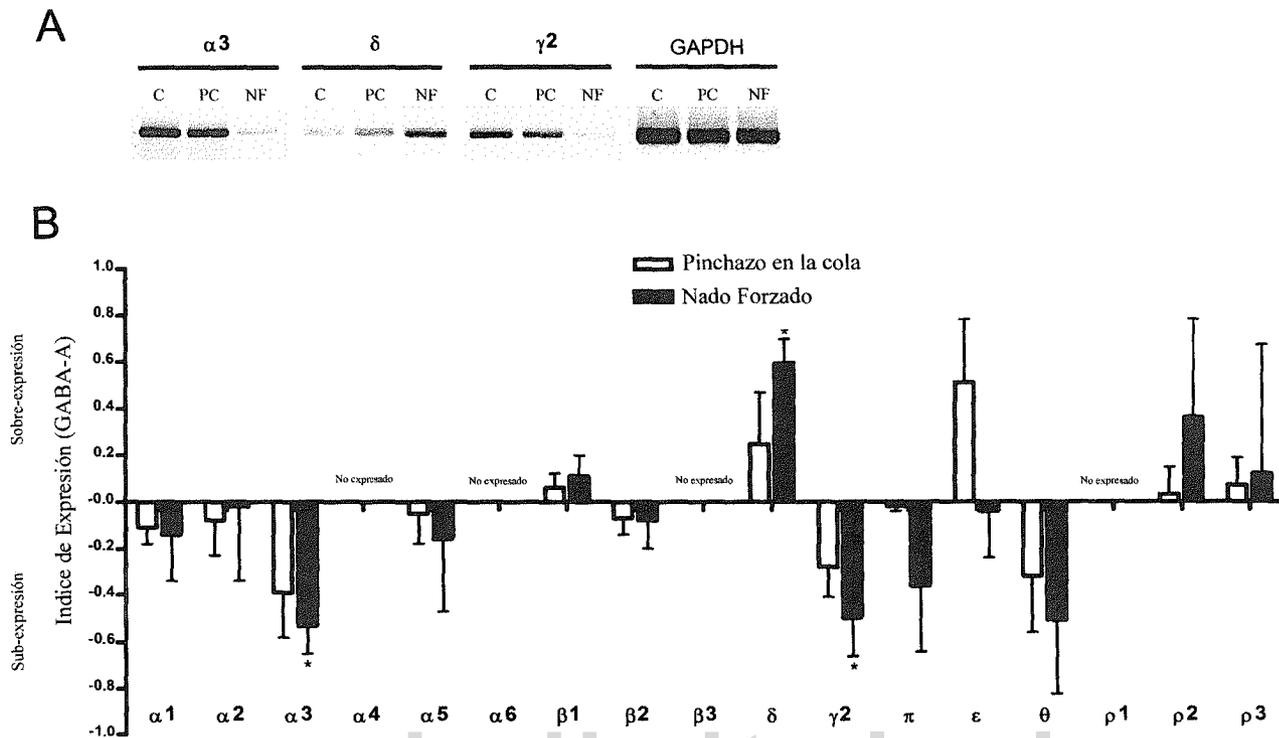
**Figura 13:** Microinyecciones de vigabatrina (Vig) (10  $\mu\text{g}$ /hemisferio) en el VP redujeron significativamente la preferencia por la solución a sacarosa en ratas. Microinyecciones de bicuculina (Bicc)(0.1  $\mu\text{g}$ /hemisferio) no produjo ningún cambio por la preferencia a la solución de sacarosa. \*\* $p < 0.01$ .



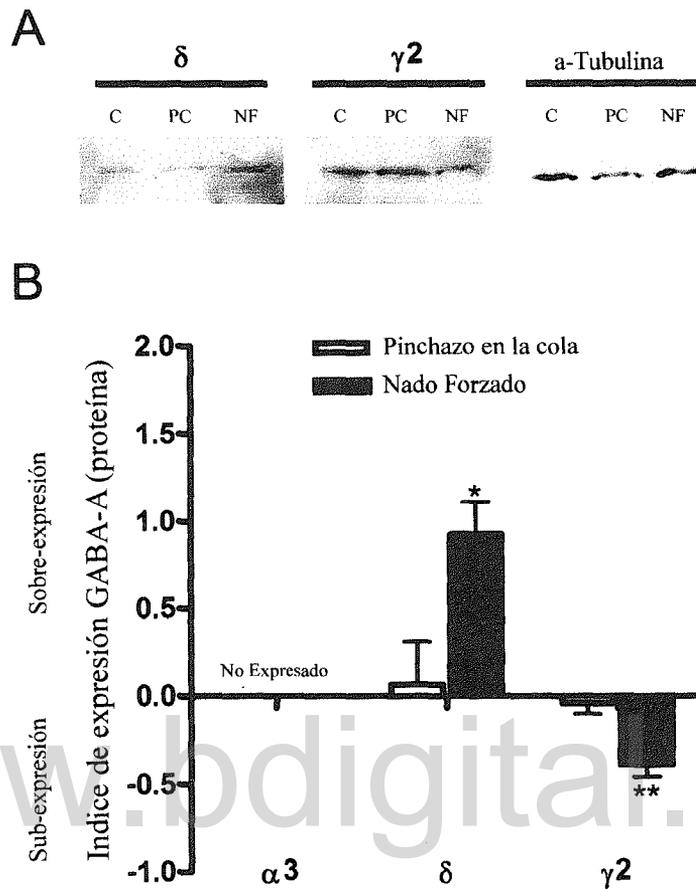
**Figura 14:** Microinyecciones de bicuculina (Bicc) (0.1  $\mu\text{g}$ /hemisferio) directamente en el VP incrementaron de manera significativa la actividad locomotora de ratas. En contraste, la vigabatrina no generó ningún cambio en la actividad locomotora. \*\* $p < 0.01$ .

**Tabla 4:** Índice de expresión de ARNm de subunidades del receptor GABA-A en ratas sometidas a la prueba de pinchazo en la cola y del nado forzado, comparadas respecto a los niveles de expresión en ratas no tratadas (línea base). Datos son presentados como el promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ .

Gen	Índice de expresión GABAA-R (ARNm)		n
	Pinchazo en la cola	Nado forzado	
GABAAR $\alpha 1$	-0.11 $\pm$ 0.07	-0.14 $\pm$ 0.20	3
GABAA R $\alpha 2$	-0.08 $\pm$ 0.15	-0.02 $\pm$ 0.32	5
GABAA R $\alpha 3$	-0.39 $\pm$ 0.19	<b>-0.53 <math>\pm</math> 0.12*</b>	5
GABAA R $\alpha 4$	<i>No expresado</i>		3
GABAA R $\alpha 5$	-0.05 $\pm$ 0.13	-0.16 $\pm$ 0.31	4
GABAA R $\alpha 6$	<i>No expresado</i>		3
GABAA R $\beta 1$	0.06 $\pm$ 0.06	0.11 $\pm$ 0.09	3
GABAA R $\beta 2$	-0.07 $\pm$ 0.07	-0.08 $\pm$ 0.12	4
GABAA R $\beta 3$	<i>No expresado</i>		3
GABAA R $\delta$	0.25 $\pm$ 0.22	<b>0.59 <math>\pm</math> 0.10*</b>	4
GABAA R $\gamma 2$	-0.28 $\pm$ 0.13	<b>-0.50 <math>\pm</math> 0.16*</b>	6
GABAA R $\theta$	-0.32 $\pm$ 0.24	-0.51 $\pm$ 0.31	3
GABAA R $\pi$	-0.02 $\pm$ 0.02	-0.36 $\pm$ 0.28	3
GABAA R $\epsilon$	0.51 $\pm$ 0.27	-0.04 $\pm$ 0.20	3
GABAA R $\rho 1$	<i>No expresado</i>		3
GABAA R $\rho 2$	0.03 $\pm$ 0.12	0.36 $\pm$ 0.42	4
GABAA R $\rho 3$	0.07 $\pm$ 0.12	0.12 $\pm$ 0.55	4



**Figura 15:** (A) RT-PCR semi-cuantitativo del VP de ratas control (C), pinchazo ligero en la cola (PC), y nado forzado (NF) de subunidades del receptor GABA-A que muestran cambios significativos al segundo día de las pruebas, en relación a los niveles de expresión del gen estándar interno GAPDH. Las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 2$  redujeron sus niveles de expresión luego de la prueba de nado forzado mientras que la subunidad  $\delta$  aumentó su expresión. (B) Índice de expresión relativo de ARNm de 17 subunidades del receptor GABA-A en el VP de ratas. Para cada gen, los datos expresados son equivalentes al promedio de los índices de expresión  $\pm$  SEM. Cuatro subunidades ( $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 3$  y  $\rho 1$ ) no fueron detectadas en esta región cerebral bajo ninguna condición experimental, mientras que las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 2$  fueron significativamente sub-expresadas luego de la prueba de nado forzado. De manera contraria, la subunidad  $\delta$  incremento significativamente su expresión luego del la prueba de nado forzado. No se encontraron diferencias significativas en la expresión del ARNm para las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\pi$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\rho 2$  y  $\rho 3$ . \* $p < 0.05$ .



**Figura 16:** (A) Expresión proteica de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\delta$  y  $\gamma 2$  en el VP de ratas sometidas a las pruebas de pinchazo ligero en la cola (PC) y nado forzado (NF) y controles (C). Los niveles de expresión relativos de cada subunidad se contrastaron respecto a los niveles de expresión de la proteína citoesquelética  $\alpha$ -tubulina. (B) El índice de expresión para cada subunidad esta expresado como el promedio  $\pm$  SEM. La subunidad  $\delta$  incrementó sus niveles de expresión relativa en el VP de ratas 6 días (Día-8 del test) luego de culminada la prueba de nado forzado, mientras que la subunidad  $\gamma$  redujo su expresión para este grupo experimental. Por otro lado, la subunidad  $\alpha 3$  no fue detectada en el VP en ninguna condición conductual. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## 6.2. Mecanismos genéticos que afectan la conducta en ratones

### 6.2.1. La ablación selectiva de la expresión de *ErbB4* en neuronas TH<sup>+</sup> de ratones no genera fenotipos tipo esquizoides que si se presentan en ratones *ErbB4*<sup>-/-</sup> o PV<sup>+</sup>/*ErbB4*<sup>-/-</sup>

#### 6.2.1.1. Niveles de ansiedad basales de ratones TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup>.

##### *Laberinto elevado en cruz*

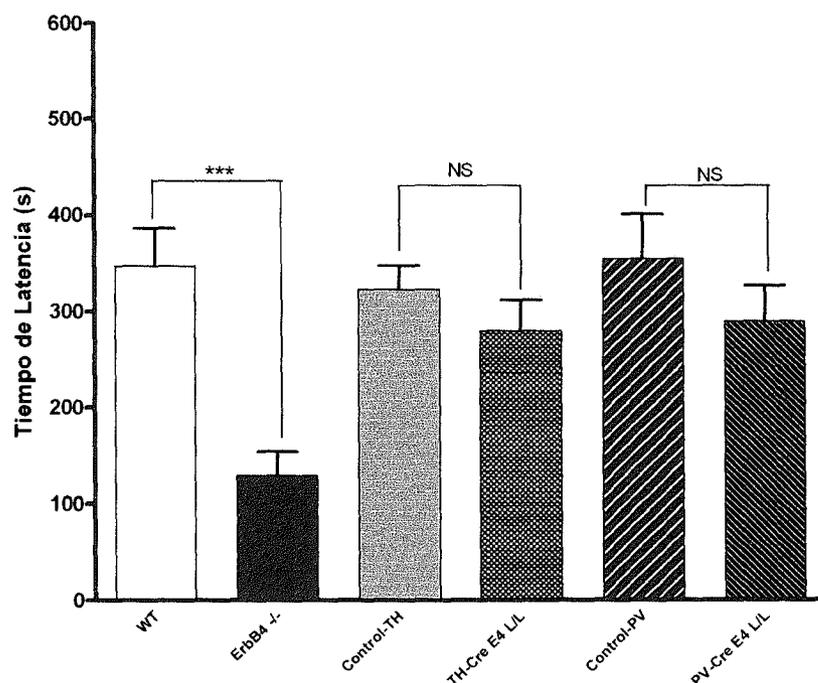
Los ratones TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup> no mostraron diferencias significativas en los niveles de ansiedad basal en relación con sus correspondientes controles, cuando esta fue evaluada mediante la prueba de laberinto elevado en cruz. Los ratones controles (n=30) se mantuvieron  $229 \pm 9$  s en los brazos cerrados del laberinto mientras que los ratones TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup> (n=28) permanecieron  $238 \pm 7$  s en esta región del laberinto. Por su parte, los ratones controles estuvieron  $16 \pm 3$  s en los brazos abiertos mientras que los TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup> permanecieron  $14 \pm 3$  s en los mismos.

##### *Aversión a comer en ambientes novedosos*

En esta prueba, únicamente los ratones de genotipo *ErbB4*<sup>-/-</sup> mostraron tener menores niveles de ansiedad basal respecto a sus correspondientes controles cuando se empleó la prueba de aversión a comer en ambientes novedosos. En este sentido, los tiempos de latencia para los ratones *ErbB4*<sup>-/-</sup> fue de  $129 \pm 25$  s (n=11) mientras que los tiempos para sus controles fueron de  $347 \pm 39$  s (n=16) ( $t(25)=4.28$ ,  $p=0.0002$ ). Por su parte, los ratones con genotipos TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup> no mostraron diferencias en los tiempos de latencia respecto a sus controles (control:  $323 \pm 25$  s, n=18; TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup>:  $279 \pm 32$  s, n=14); así como tampoco los ratones PV-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup> tuvieron diferencias significativas en los tiempos de latencia al ser comparados con sus correspondientes controles (control:  $355 \pm 46$  s, n=12; PV-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup>:  $289 \pm 37$  s, n=18) (Figura 17).

#### 6.2.1.2. Actividad locomotora basal de ratones TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup>

La actividad locomotora basal que exhiben los ratones TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup> fue comparada respecto a sus correspondientes controles, empleando para ello la prueba de campo abierto. Los ratones TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup> no mostraron diferencias significativas en dicha actividad locomotora basal cuando esta se comparó con su correspondiente control (control:  $45 \pm 4$  m, n=19; TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup>:  $49 \pm 3$  m, n=22).



**Figura 17:** Test de aversión a comer en ambientes novedosos. Los tiempos de latencias indican los niveles basales de ansiedad para los diferentes genotipos estudiados. Únicamente los ratones *ErbB4*<sup>-/-</sup> exhibieron tiempos de latencia significativamente menores respecto a sus correspondientes controles (WT). \*\*\* $p=0.0002$ . NS-no significativo.

#### 6.2.1.3. Prueba de nado forzado

Los ratones TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup> no mostraron diferencias significativas en las conductas de inmovilidad respecto a sus controles cuando fueron estudiadas mediante la prueba de nado forzado (control:  $157 \pm 19$  s, n=6; TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup>:  $172 \pm 12$  s, n=8).

#### 6.2.1.4. Prueba de sensibilidad por la anfetamina

Ratones *ErbB4*<sup>-/-</sup> y PV-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup> mostraron ser más sensibles a dosis de anfetamina que no generaron incrementos significativos en la actividad motora de sus correspondientes controles. Para el caso de los ratones *ErbB4*<sup>-/-</sup>, estos mostraron un incremento significativo en el radio de su actividad motora respecto a su correspondiente control a una dosis de anfetamina de 0.5 mg/kg, mientras que los ratones PV-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup> exhibieron un incremento significativo en su actividad motora a una dosis de 2.5 mg/kg respecto a su control. Por otra parte, los ratones TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup> no mostraron diferencias en la sensibilidad por la anfetamina a ninguna de las dosis empleadas (*Figura 18*). Los promedios de los

radios  $\pm$  SEM en la actividad motora obtenida para cada dosis de anfetamina y genotipo de ratón empleado, y significancia estadística para cada grupo es presentada en la Tabla 5 (ErbB4<sup>-/-</sup> vs. Control), Tabla 6 (TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> vs. Control) y Tabla 7 (PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>).

**Tabla 5:** Radio de la actividad motora en ratones ErbB4<sup>-/-</sup> y control luego de inyectar anfetamina sistémicamente. NS-no significativo.

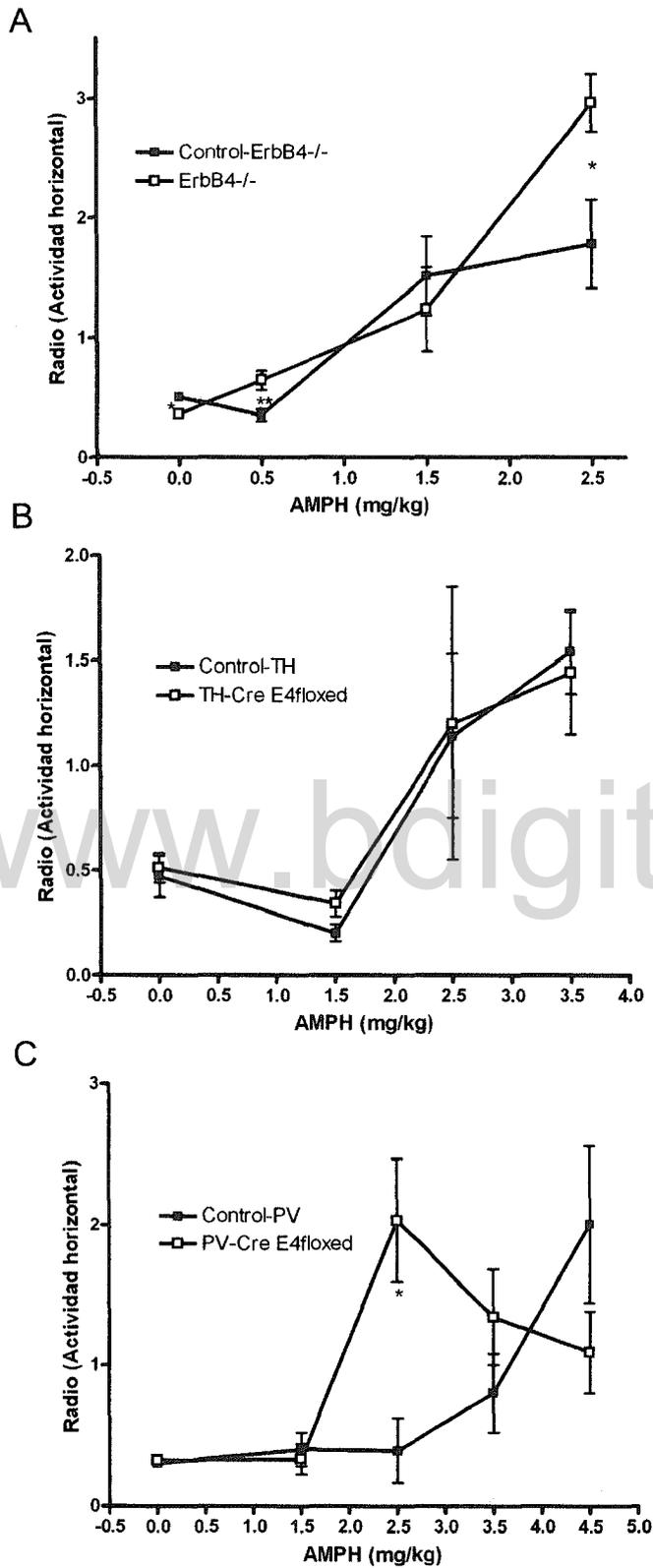
Anfetamina (mg/kg)	Control	n	ErbB4 <sup>-/-</sup>	n	Prueba t
0	0.50 $\pm$ 0.02	6	0.36 $\pm$ 0.04	6	t(10)=3.166, p=0.0101
0.5	0.35 $\pm$ 0.05	10	0.64 $\pm$ 0.08	8	t(16)=3.186, p=0.0057
1.5	1.51 $\pm$ 0.33	6	1.23 $\pm$ 0.35	8	NS
2.5	1.78 $\pm$ 0.37	6	2.96 $\pm$ 0.24	5	t(9)=2.572, p=0.0301

**Tabla 6:** Radio de la actividad motora en ratones TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y control luego de inyectar anfetamina sistémicamente. NS-no significativo.

Anfetamina (mg/kg)	Control-TH	n	TH-Cre ErbB4 <sup>floxed</sup>	n	Prueba t
0	0.47 $\pm$ 0.10	6	0.51 $\pm$ 0.07	5	NS
1.5	0.20 $\pm$ 0.04	6	0.34 $\pm$ 0.06	6	NS
2.5	1.14 $\pm$ 0.39	6	1.20 $\pm$ 0.65	5	NS
3.5	1.54 $\pm$ 0.16	5	1.44 $\pm$ 0.29	6	NS

**Tabla 7:** Radio de la actividad motora en ratones PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> y control luego de inyectar anfetamina sistémicamente. NS-no significativo.

Anfetamina (mg/kg)	Control-PV	n	PV-Cre ErbB4 <sup>floxed</sup>	n	Prueba t
0	0.30 $\pm$ 0.03	8	0.32 $\pm$ 0.03	8	NS
1.5	0.40 $\pm$ 0.12	6	0.33 $\pm$ 0.11	6	NS
2.5	0.39 $\pm$ 0.23	5	2.03 $\pm$ 0.44	8	t(11)=2.767, p=0.0183
3.5	0.80 $\pm$ 0.28	7	1.34 $\pm$ 0.34	8	NS
4.5	2.00 $\pm$ 0.56	8	1.10 $\pm$ 0.30	8	NS



**Figura 18:** Radio de la actividad motora en ratones (A) *ErbB*<sup>-/-</sup> vs. Control, (B) *TH-Cre ErbB4*<sup>floxed</sup> vs. Control, y (C) *PV-Cre ErbB4*<sup>floxed</sup>, luego de recibir de manera independiente inyecciones i.p. de anfetamina. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01.

**6.2.2. El incremento en los niveles de DA en el CA1 del hipocampo dorsal dependientes de la señalización del sistema NRG1-ErbB4 está afectada en ratones ErbB4<sup>-/-</sup> y TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> pero no en ratones PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>**

En general, la NRG1 $\beta$ -EGF-like a 1 nM perfundida directamente en el CA1 del hipocampo dorsal de ratones controles (expresan ErbB4) fue capaz de incrementar de manera significativamente los niveles extracelulares de DA, así como también de incrementar los niveles de sus catabolitos DOPAC y HVA. Por su parte, los ratones PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> también fueron capaces de incrementar los niveles extracelulares de DA mientras que los ratones ErbB4<sup>-/-</sup> y TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> no incrementaron los niveles de DA en esta área cerebral. Los datos y estadísticas relacionadas con estos resultados es presentada en la Tabla 8 y *Figura 19* para DA, Tabla 9 y *Figura 20* para DOPAC y Tabla 10 y *Figura 21* para HVA. Un grupo control de ratones de genotipo salvaje se les aplico un pulso de vehículo en lugar de NRG1 y no se detectaron cambios significativos en los niveles extracelulares para DA, DOPAC y HVA.

**Tabla 8:** Niveles extracelulares basales de dopamina (nM) en el CA1 del hipocampo dorsal de ratones empleados en este estudio, y porcentajes de variación respecto a los niveles basales cuando es aplicado por diálisis reversa un pulso de 1 nM de NRG1 $\beta$ -EGF-like en esta misma región cerebral.

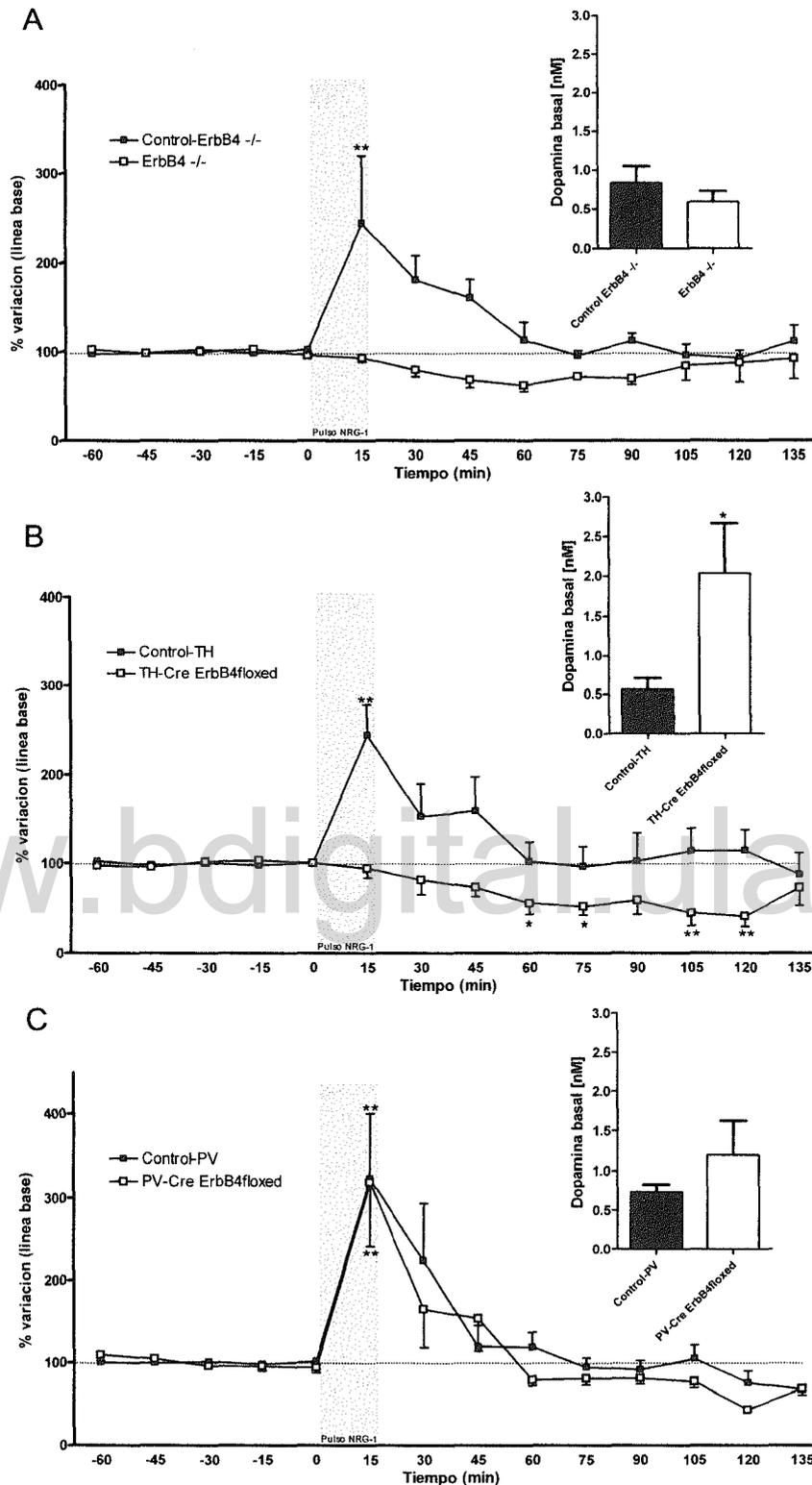
Dopamina						
Genotipo	Nivel basal (nM)	Prueba <i>t</i>	Pulso NRG1 (1nM)	ANOVA una vía	ANOVA dos vías	<i>n</i>
Control-ErbB4 <sup>-/-</sup>	0,83 ± 0,22	ns	244,1 ± 75,17 %	<i>F</i> (4,36) = 2,938 p = 0,0102	F = 30,74 df = 1/63 p = 0,0009	5
ErbB4 <sup>-/-</sup>	0,59 ± 0,14		93,16 ± 4,44 %	ns		4
Control-TH	0,56 ± 0,15	<i>t</i> (10) = 2,282 p = 0,0456	244,6 ± 34,23 %	<i>F</i> (5,45) = 5,074 p < 0,0001	F = 8,15 df = 1/90 p = 0,0171	6
TH-Cre ErbB4 <sup>floxed</sup>	2,04 ± 0,63		94,36 ± 10,44 %	<i>F</i> (5,45) = 3,710 p = 0,0015		6
Control-PV	0,73 ± 0,09	ns	323,0 ± 77,07 %	<i>F</i> (5,45) = 5,276 p < 0,0001	ns	6
PV-Cre ErbB4 <sup>floxed</sup>	1,19 ± 0,44		319,0 ± 77,42 %	<i>F</i> (4,36) = 7,392 p < 0,0001		5

**Tabla 9:** Niveles extracelulares basales de DOPAC (nM) en el CA1 del hipocampo dorsal de ratones empleados en este estudio, y porcentajes de variación respecto a los niveles basales cuando es aplicado por diálisis reversa un pulso de 1 nM de NRG1 $\beta$ -EGF-like en esta misma región cerebral.

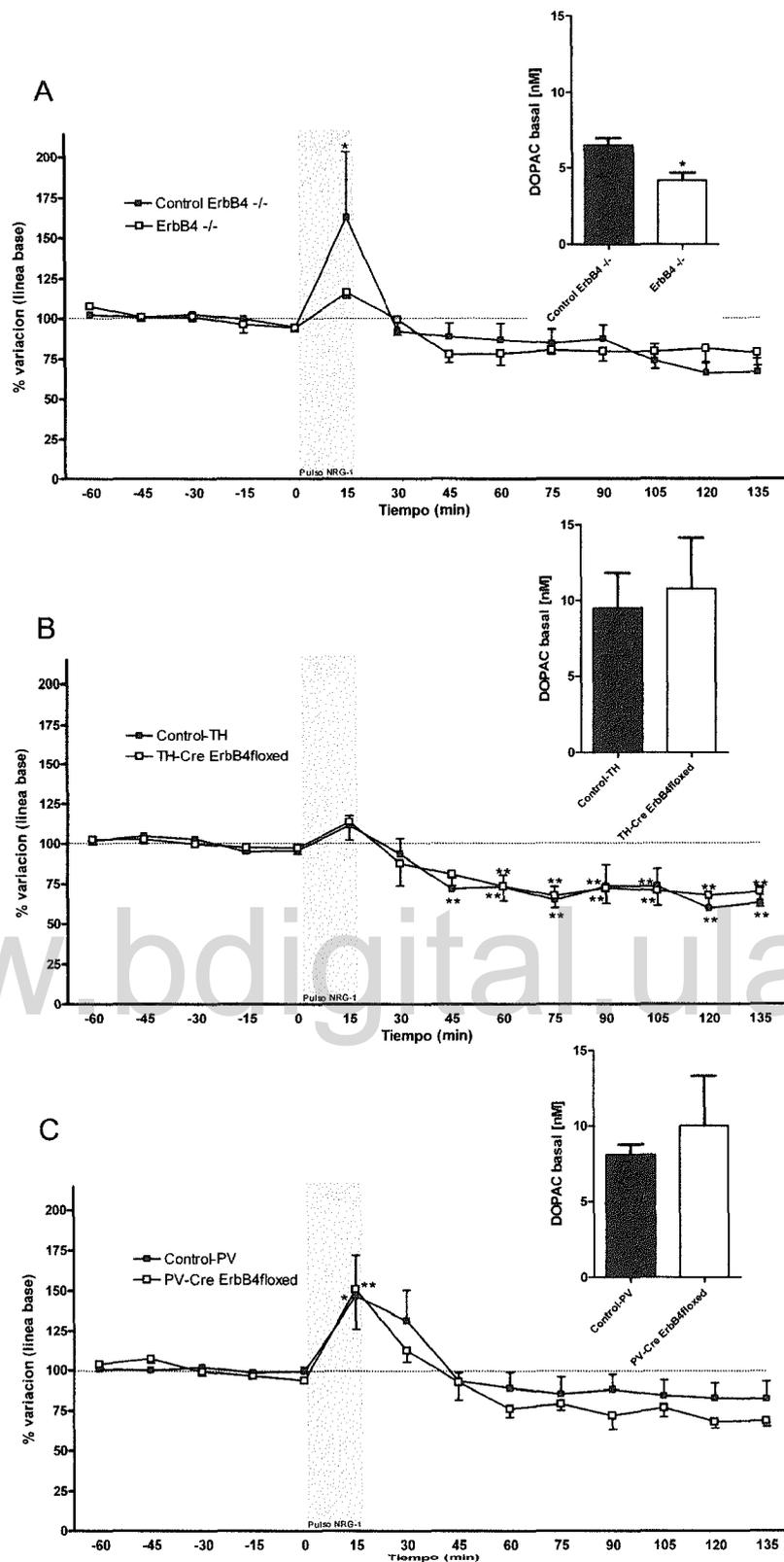
DOPAC						
Genotipo	Nivel basal (nM)	Prueba <i>t</i>	Pulso NRG1 (1nM)	ANOVA una vía	ANOVA dos vías	<i>n</i>
Control-ErbB4 $^{-/-}$	6,51 $\pm$ 0,49	<i>t</i> (7) = 3,365 p = 0,012	162,8 $\pm$ 40,75 %	<i>F</i> (4,36) = 4,153 p = 0,001	ns	5
ErbB4 $^{-/-}$	4,21 $\pm$ 0,45		116,2 $\pm$ 3,41 %	<i>F</i> (3,27) = 4,92 p = 0,0006		4
Control-TH	9,5 $\pm$ 2,34	ns	111,3 $\pm$ 6,33 %	<i>F</i> (5,45) = 10,93 p < 0,0001	ns	6
TH-Cre ErbB4 $^{\text{floxed}}$	10,78 $\pm$ 3,32		113,5 $\pm$ 11,36 %	<i>F</i> (5,45) = 10,31 p < 0,0001		6
Control-PV	8,09 $\pm$ 0,66	ns	146,6 $\pm$ 25,52 %	<i>F</i> (5,45) = 4,581 p = 0,0003	ns	6
PV-Cre ErbB4 $^{\text{floxed}}$	10,0 $\pm$ 3,29		150,9 $\pm$ 24,80 %	<i>F</i> (4,36) = 8,526 p < 0,0001		5

**Tabla 10:** Niveles extracelulares basales de HVA (nM) en el CA1 del hipocampo dorsal de ratones empleados en este estudio, y porcentajes de variación respecto a los niveles basales cuando es aplicado por diálisis reversa un pulso de 1 nM de NRG1 $\beta$ -EGF-like en esta misma región cerebral.

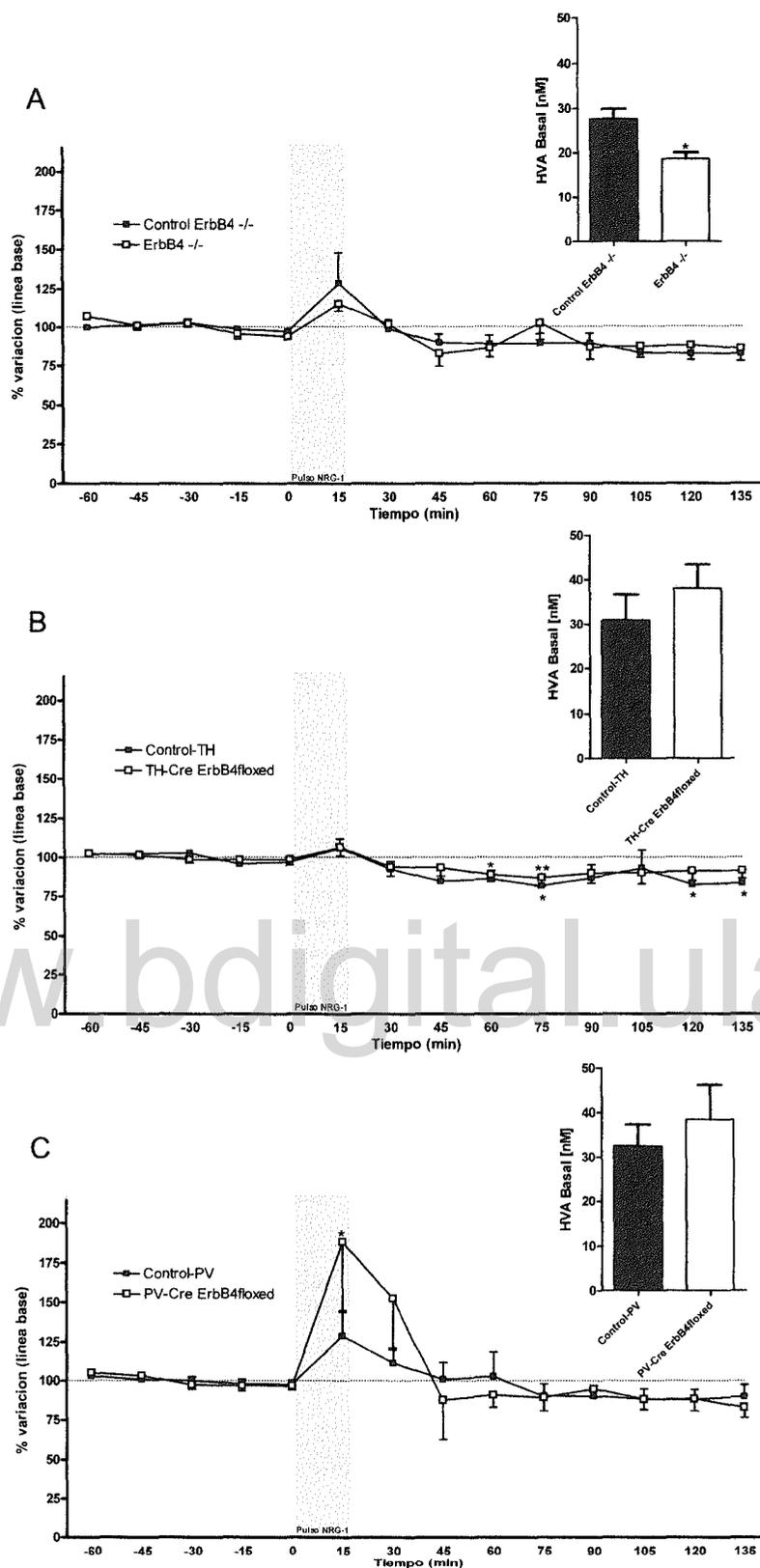
HVA						
Genotipo	Nivel basal (nM)	Prueba <i>t</i>	Pulso NRG1 (1nM)	ANOVA una vía	ANOVA dos vías	<i>n</i>
Control-ErbB4 $^{-/-}$	27,63 $\pm$ 2,31	<i>t</i> (7) = 3,11 p = 0,0171	128,7 $\pm$ 18,89 %	<i>F</i> (4,36) = 2,583 p = 0,0028	ns	5
ErbB4 $^{-/-}$	18,72 $\pm$ 1,34		115,0 $\pm$ 4,76 %	<i>F</i> (3,27) = 2,84 p = 0,0172		4
Control-TH	30,91 $\pm$ 5,76	ns	105,7 $\pm$ 6,31 %	<i>F</i> (5,45) = 3,976 p = 0,0009	ns	6
TH-Cre ErbB4 $^{\text{floxed}}$	38,11 $\pm$ 5,28		106,4 $\pm$ 5,46 %	<i>F</i> (5,45) = 4,688 p = 0,0002		6
Control-PV	32,48 $\pm$ 4,81	ns	129,9 $\pm$ 15,75 %	<i>F</i> (5,45) = 3,026 p = 0,0065	ns	6
PV-Cre ErbB4 $^{\text{floxed}}$	38,45 $\pm$ 7,62		188,5 $\pm$ 44,56 %	<i>F</i> (4,36) = 3,419 p = 0,0039		5



**Figura 19:** Porcentaje de variación de los niveles extracelulares de dopamina en el CA1 del hipocampo dorsal para ratones *ErbB4*<sup>-/-</sup> y controles (A), ratones *TH-Cre ErbB4floxed* y controles (B), y ratones *PV-Cre ErbB4floxed* y controles (C), que recibieron un pulso de *NRG1-β* 1nM durante 15 minutos (indicado en gris). Los cambios expresados son relativos a los niveles extracelulares basales también expresados en cada caso. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Figura 20:** Porcentaje de variación de los niveles extracelulares de DOPAC en el CA1 del hipocampo dorsal para ratones *ErbB4*  $-/-$  y controles (A), ratones *TH-Cre ErbB4 floxed* y controles (B), y ratones *PV-Cre ErbB4 floxed* y controles (C), que recibieron un pulso de *NRG1- $\beta$*  1nM durante 15 minutos (indicado en gris). Los cambios expresados son relativos a los niveles extracelulares basales también expresados en cada caso. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .



**Figura 21:** Porcentaje de variación de los niveles extracelulares de DOPAC en el CA1 del hipocampo dorsal para ratones *ErbB4*<sup>-/-</sup> y controles (A), ratones *TH-Cre ErbB4floxed* y controles (B), y ratones *PV-Cre ErbB4floxed* y controles (C), que recibieron un pulso de *NRG1-β* 1nM durante 15 minutos (indicado en gris). Los cambios expresados son relativos a los niveles extracelulares basales también expresados en cada caso. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01.

**6.2.3. Los terminales DA del CA1 del hipocampo dorsal de todos los genotipos de ratones estudiados son funcionales**

La aplicación de un pulso de KCl 50 mM durante 15 minutos en el CA1 del hipocampo dorsal de los ratones estudiados fue capaz de incrementar en todos los casos de manera significativa los niveles extracelulares de DA. De la misma manera, los niveles de los metabolitos DOPAC y HVA se incrementaron de manera significativa luego de concluido el pulso de KCl. Los porcentajes de incremento de DA, DOPAC y HVA, así como el análisis estadístico para cada tratamiento son presentados en la Tabla 11 y Figura 22 para DA, Tabla 12 y Figura 23 para DOPAC y Tabla 13 y Figura 24 para HVA.

**Tabla 11:** Porcentaje de incremento de DA respecto a los niveles basales en ratones que recibieron un pulso de KCl 50 nM en el CA1 del hipocampo dorsal bilateralmente.

Dopamina				
Genotipo	Pulso KCl (50mM)	ANOVA una vía	ANOVA dos vías	n
Control-ErbB4-/-	228,7 ± 13,49 %	$F(2,10)=24,53$ ; $p<0,0001$	$F=8,07$ ; $df=1/20$ ; $p=0,0468$	3
ErbB4-/-	273,2 ± 28,08 %	$F(2,10)=7,48$ ; $p=0,0037$		3
Control-TH	232,1 ± 24,94 %	$F(3,15)=4,258$ ; $p=0,0131$	ns	4
TH-Cre ErbB4floxed	423,2 ± 131,0 %	$F(2,10)=3,584$ ; $p=0,0407$		3
Control-PV	227,1 ± 3,46 %	$F(2,10)=4,749$ ; $p=0,0247$	ns	3
PV-Cre ErbB4floxed	197,4 ± 2,76 %	$F(2,10)=6,63$ ; $p=0,0057$		3

**Tabla 12:** Porcentaje de incremento de DOPAC respecto a los niveles basales en ratones que recibieron un pulso de KCl 50 nM en el CA1 del hipocampo dorsal bilateralmente.

DOPAC				
Genotipo	Pulso KCl (50mM)	ANOVA una vía	ANOVA dos vías	n
Control-ErbB4-/-	120,3 ± 22,82 %	ns	ns	3
ErbB4-/-	124,0 ± 16,99 %	$F(2,10)=4,333$ ; $p=0,0233$		3
Control-TH	127,5 ± 8,72 %	$F(3,15)=4,258$ ; $p=0,0131$	ns	4
TH-Cre ErbB4floxed	161,0 ± 18,14 %	$F(2,10)=5,032$ ; $p=0,0146$		3
Control-PV	160,2 ± 9,53 %	$F(2,10)=3,992$ ; $p=0,0299$	ns	3
PV-Cre ErbB4floxed	127,5 ± 7,24 %	$F(2,10)=4,808$ ; $p=0,0169$		3

**Tabla 13:** Porcentaje de incremento de HVA respecto a los niveles basales en ratones que recibieron un pulso de KCl 50 nM en el CA1 del hipocampo dorsal bilateralmente.

HVA				
Genotipo	Pulso KCl (50mM)	ANOVA una vía	ANOVA dos vías	n
<i>Control-ErbB4<sup>-/-</sup></i>	90,67 ± 11,34 %	F(2,10)=3,725; p=0,0365	ns	3
<i>ErbB4<sup>-/-</sup></i>	94,50 ± 17,46 %	ns		3
<i>Control-TH</i>	98,35 ± 5,045 %	F(3,15)=10,38; p=0,0002	F=28,59; df=1/20; p=0,0059	4
<i>TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup></i>	107,7 ± 5,074 %	F(2,10)=7,328; p=0,004		3
<i>Control-PV</i>	139,8 ± 16,19 %	ns	ns	3
<i>PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup></i>	110,4 ± 5,431 %	ns		3

#### 6.2.4. La prueba de pinchazo ligero en la cola genera una hiper-respuesta DA en ratones PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> pero no en ratones ErbB4<sup>-/-</sup> y TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>

Todos los ratones sometidos a la prueba de pinchazo en la cola (con la excepción de los ratones de genotipo TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>) incrementaron de manera significativa los niveles de DA CA1 dorso-hipocampal. Por otra parte, los metabolitos DOPAC y HVA no incrementaron sus niveles extracelulares durante la prueba. Los datos para DA son presentados en la Tabla 14 y Figura 25, para DOPAC en la Tabla 15 y Figura 26, y HVA en la Tabla 16 y Figura 27.

**Tabla 14:** Porcentaje de incremento de DA respecto a los niveles basales en el CA1 del hipocampo dorsal en ratones sometidos a la prueba de pinchazo en la cola (estrés agudo).

Dopamina				
Genotipo	Estrés agudo	ANOVA una vía	ANOVA dos vías	n
<i>Control-ErbB4<sup>-/-</sup></i>	216,7 ± 23,23 %	F(3,18)=2,803; p=0,0418	ns	4
<i>ErbB4<sup>-/-</sup></i>	306,7 ± 69,52 %	F(2,12)=3,459; p=0,032		3
<i>Control-TH</i>	204,5 ± 45,18 %	F(2,12)=3,47; p=0,0317	ns	3
<i>TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup></i>	121,6 ± 9,99 %	ns		3
<i>Control-PV</i>	264,0 ± 21,39 %	F(2,12)=45,28; p<0,0001	F=5,96; df=1/24; p=0,0711	3
<i>PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup></i>	394,4 ± 46,26 %	F(2,12)=21,04; p<0,0001		3

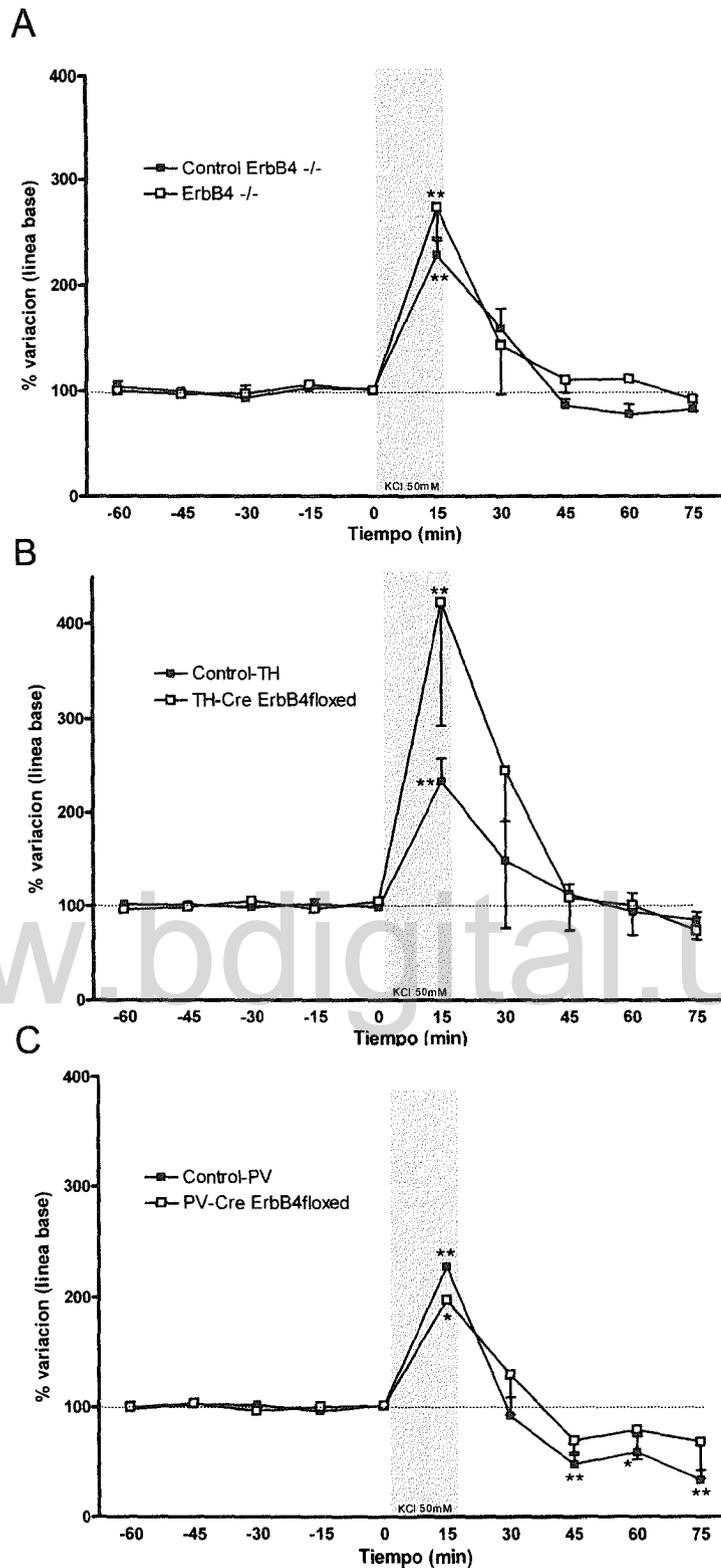
**Tabla 15:** Porcentaje de incremento de DOPAC respecto a los niveles basales en el CA1 del hipocampo dorsal en ratones sometidos a la prueba de pinchazo en la cola.

DOPAC				
Genotipo	Estrés agudo	ANOVA una vía	ANOVA dos vías	n
Control-ErbB4 <sup>-/-</sup>	109,4 ± 4,71 %	ns	ns	4
ErbB4 <sup>-/-</sup>	97,63 ± 3,82 %	ns		3
Control-TH	99,50 ± 17,92 %	ns	ns	3
TH-Cre ErbB4 <sup>floxed</sup>	97,77 ± 1,73 %	F(2,12)=3,543; p=0,0296		3
Control-PV	104,6 ± 1,27 %	ns	ns	3
PV-Cre ErbB4 <sup>floxed</sup>	117,2 ± 4,12 %	ns		3

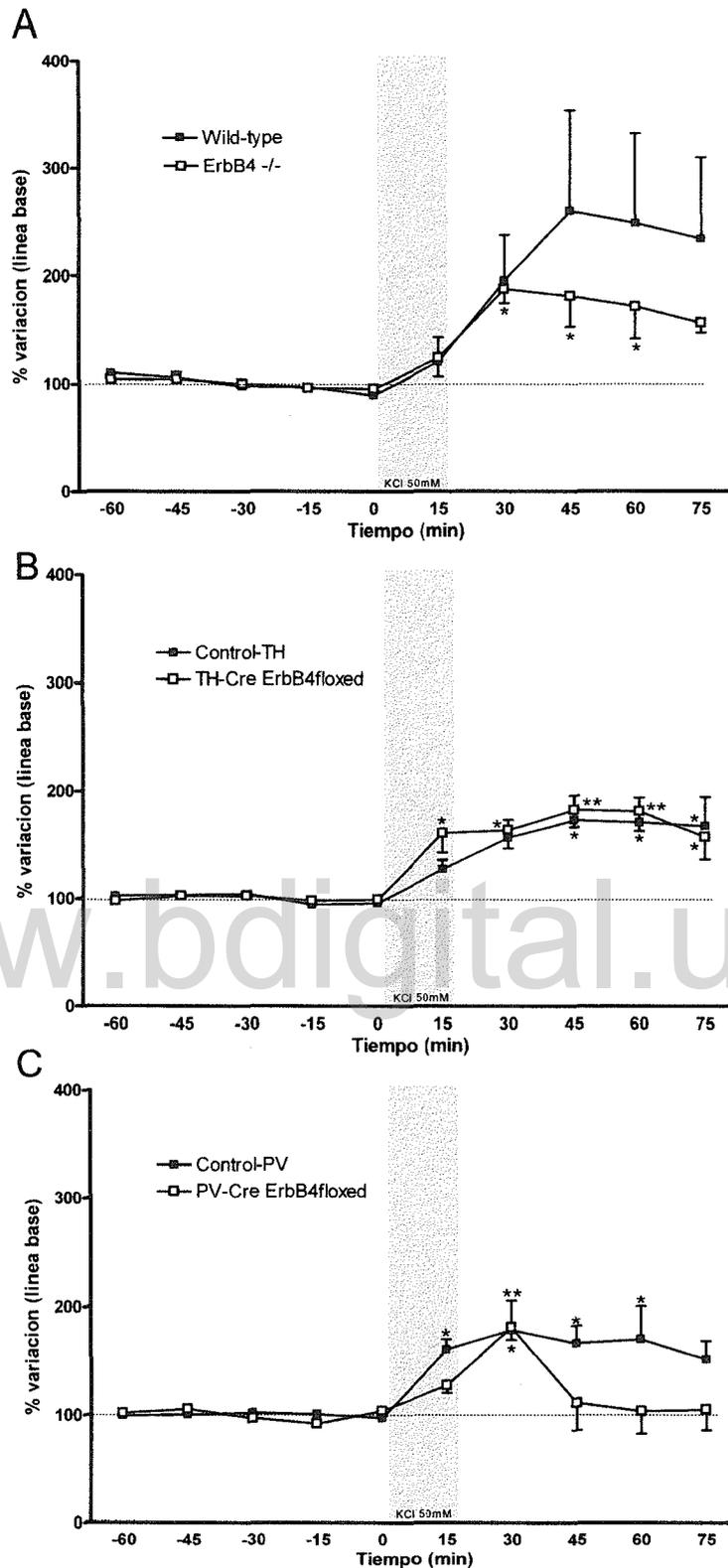
www.bdigital.ula.ve

**Tabla 16:** Porcentaje de incremento de HVA respecto a los niveles basales en el CA1 del hipocampo dorsal en ratones sometidos a la prueba de pinchazo en la cola.

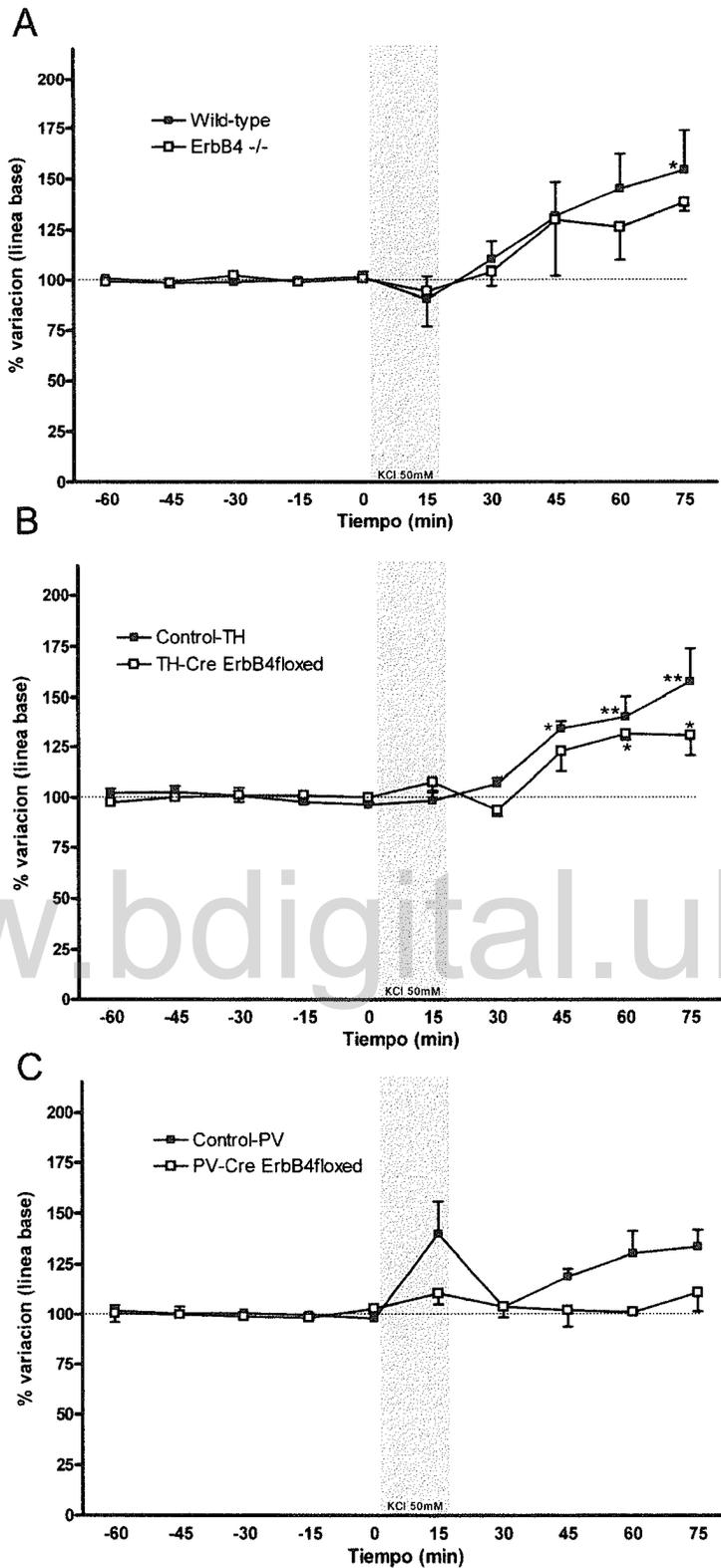
HVA				
Genotipo	Estrés agudo	ANOVA una vía	ANOVA dos vías	n
Control-ErbB4 <sup>-/-</sup>	101,7 ± 3,42 %	ns	ns	4
ErbB4 <sup>-/-</sup>	91,27 ± 4,12 %	ns		3
Control-TH	102,8 ± 4,67 %	F(2,12)=6,987; p=0,0022	F=3,28; df=1/24; p=0,0328	3
TH-Cre ErbB4 <sup>floxed</sup>	114,2 ± 7,45 %	ns		3
Control-PV	101,5 ± 2,02 %	ns	ns	3
PV-Cre ErbB4 <sup>floxed</sup>	105,9 ± 4,86 %	ns		3



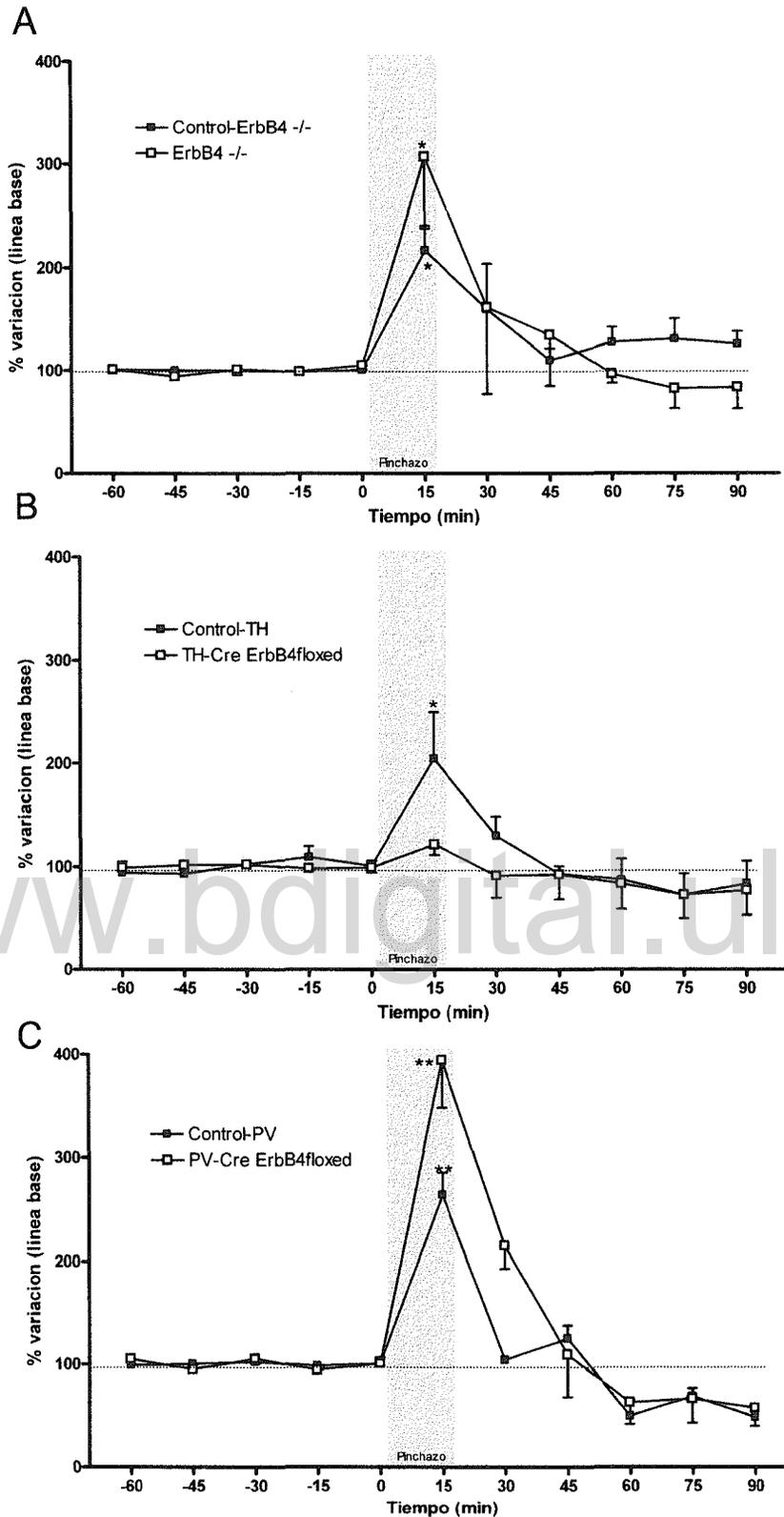
**Figura 22:** Porcentaje de incremento respecto a los niveles basales extracelulares de DA de ratones que recibieron un pulso bilateral de 15 minutos de KCl 50 mM en el CA1 del hipocampo dorsal (región gris). (A) Control vs. ErbB4 -/-, (B) Control vs. TH-Cre ErbB4floxed, (C) control vs. PV-Cre ErbB4floxed. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



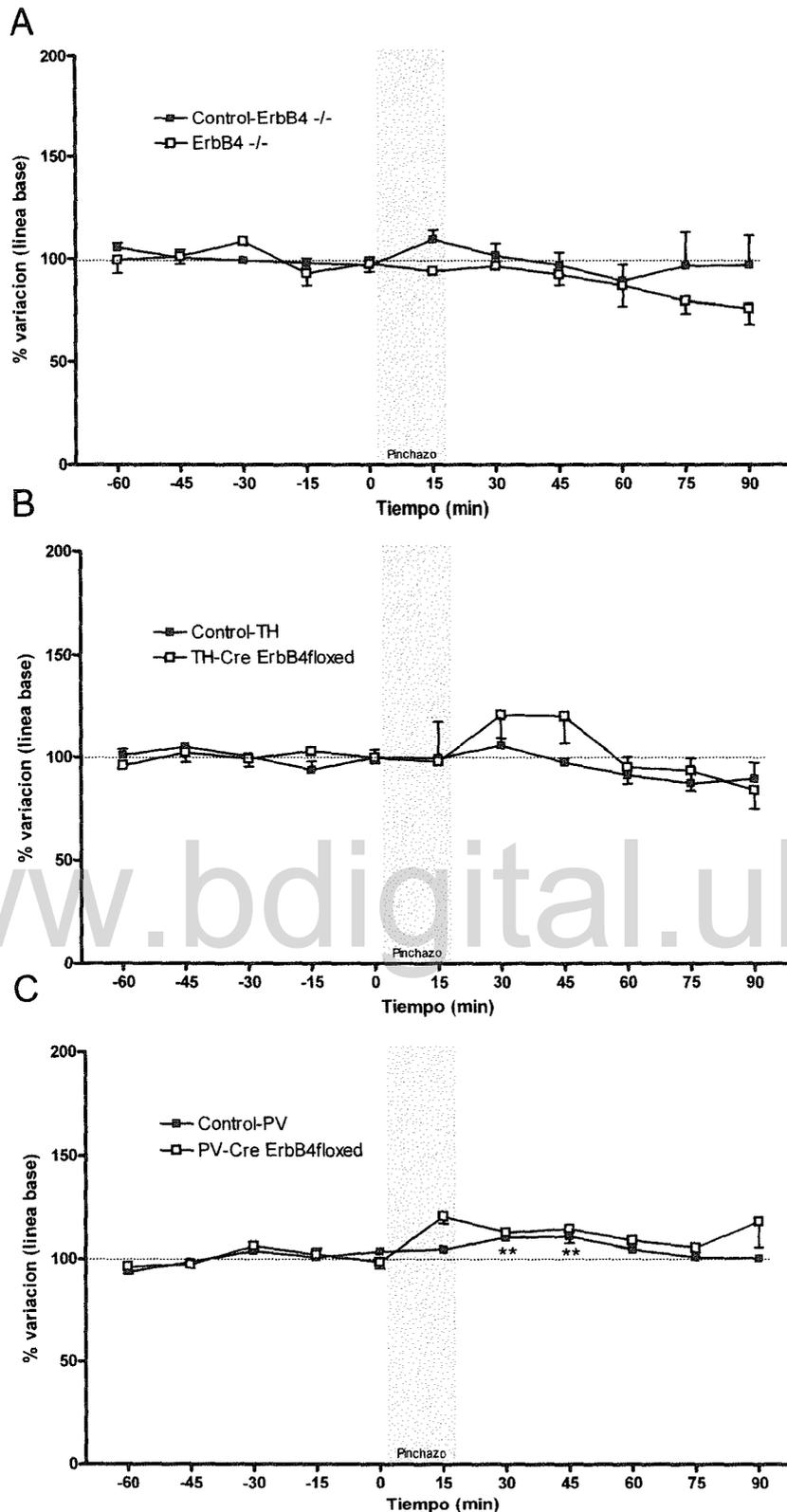
**Figura 23:** Porcentaje de incremento respecto a los niveles basales extracelulares de DOPAC de ratones que recibieron un pulso bilateral de 15 minutos de KCl 50 mM en el CA1 del hipocampo dorsal (región gris). (A) Control vs. ErbB4 -/-, (B) Control vs. TH-Cre ErbB4 floxed, (C) control vs. PV-Cre ErbB4 floxed. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



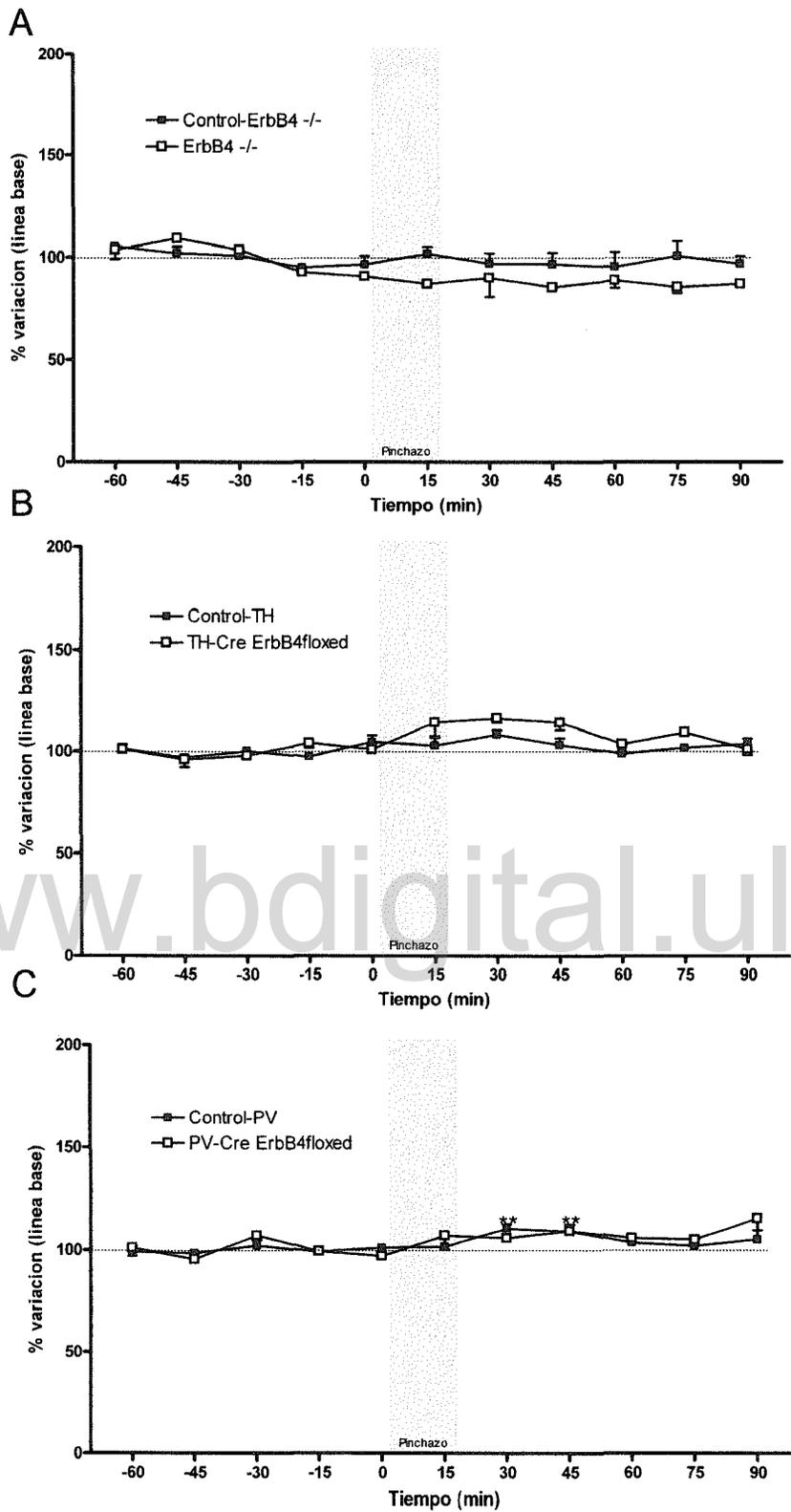
**Figura 24:** Porcentaje de incremento respecto a los niveles basales extracelulares de HVA de ratones que recibieron un pulso bilateral de 15 minutos de KCl 50 mM en el CA1 del hipocampo dorsal (región gris). (A) Control vs. ErbB4 -/-, (B) Control vs. TH-Cre ErbB4floxed, (C) control vs. PV-Cre ErbB4floxed. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



**Figura 25:** Porcentaje de incremento respecto a los niveles basales extracelulares de DA en el CA1 dorso-hipocampal de ratones sometidos a la prueba de pinchazo ligero en la cola (región gris). (A) Control vs. *ErbB4* *-/-*, (B) Control vs. *TH-Cre ErbB4 floxed*, (C) control vs. *PV-Cre ErbB4 floxed*. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .



**Figura 26:** Porcentaje de incremento respecto a los niveles basales extracelulares de DOPAC en el CA1 dorso-hipocámpal de ratones sometidos a la prueba de pinchazo ligero en la cola (región gris). (A) Control vs. *ErbB4*  $-/-$ , (B) Control vs. *TH-Cre ErbB4* floxed, (C) control vs. *PV-Cre ErbB4* floxed.  $**p < 0,01$ .



**Figura 27:** Porcentaje de incremento respecto a los niveles basales extracelulares de HVA en el CA1 dorso-hipocampal de ratones sometidos a la prueba de pinchazo ligero en la cola (región gris). (A) Control vs. *ErbB4* -/-, (B) Control vs. *TH-Cre ErbB4* floxed, (C) control vs. *PV-Cre ErbB4* floxed. \*\* $p < 0,01$ .

### 6.3. Análisis histológico

Para el análisis de los datos neuroquímicos y conductuales que requirieron realizar microdiálisis intracerebral o microinyecciones en ratas y ratones, únicamente aquellos que mostraron evidencias histológicas de que las sondas de microdiálisis o inyectores fueron implantados dentro del VP para el caso de ratas, o en el hipocampo dorsal para el caso de ratones, fueron incluidos en el análisis estadístico. En la *Figura 28* se muestra la localización de las sondas de microdiálisis e inyectores para las ratas empleadas en este estudio, mientras que en la *Figura 29* se indica la localización precisa de las sondas de microdiálisis implantadas en los ratones empleados.

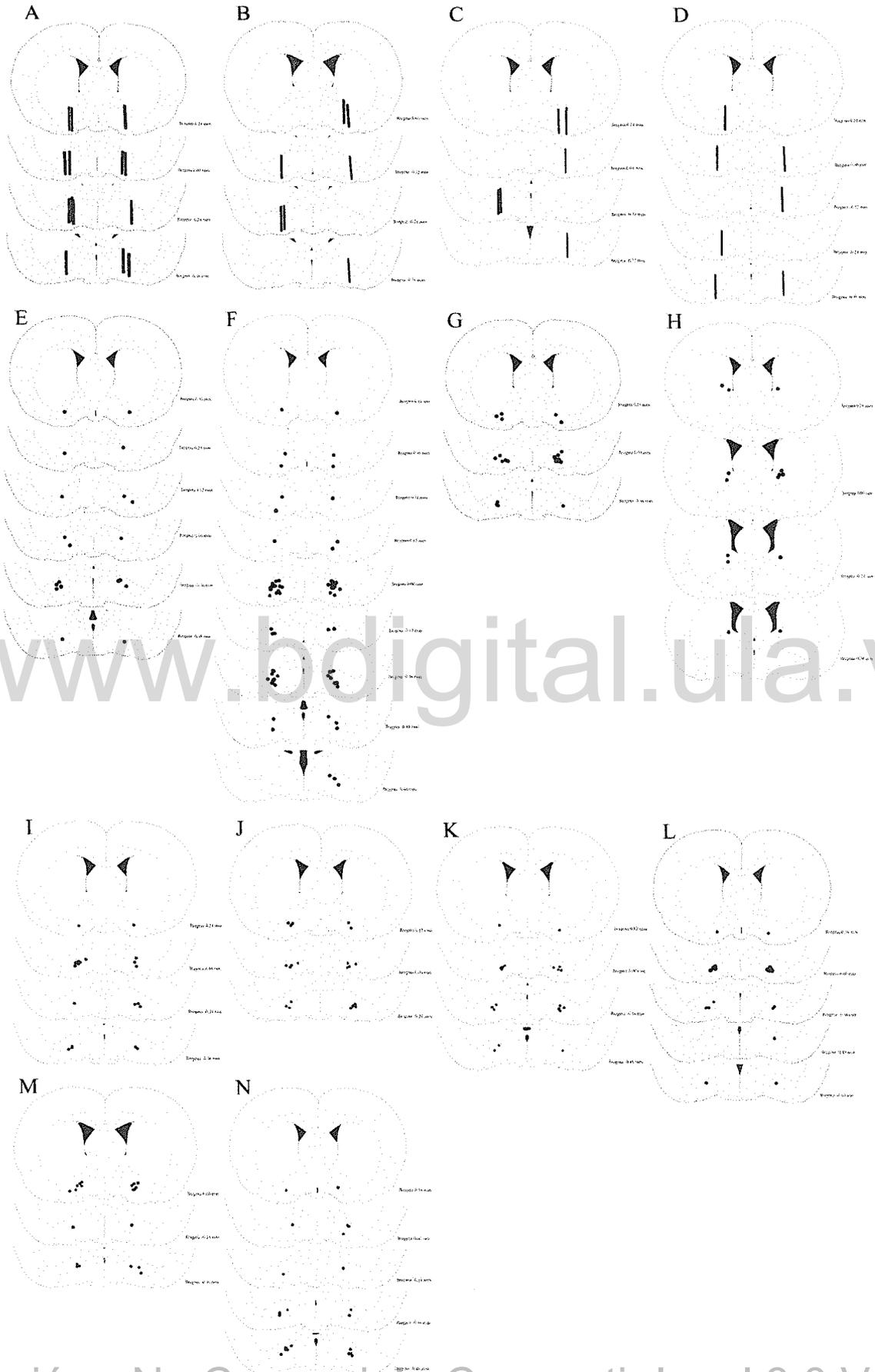
## 7. DISCUSION

Cuando las ratas fueron sometidas a una experiencia ambiental aversiva, como lo es la prueba de nado forzado, los siguientes mecanismos neuroquímicos y neurobiológicos fueron generados en el VP: (i) incremento en los niveles extracelulares de GABA durante las dos sesiones de nado forzado, (ii) aumento del tono GABAérgico basal luego de la primera sesión de nado forzado, y (iii) cambios selectivos en el patrón de expresión de subunidades del receptor GABA-A. Por su parte, la regulación del tono GABAérgico en el VP demostró ser un mecanismo epigenético capaz de modular el grado de motivación y hedonía en ratas. En este sentido, un tono GABAérgico elevado en el VP determinó conductas de baja motivación y anhedonia en ratas.

Por otra parte, inhabilitando la función del sistema NRG1/ErbB4 mediante el uso de ratones modificados genéticamente que no expresan ErbB4<sup>-/-</sup>, o que de manera selectiva no expresan ErbB4 en interneuronas PV+ (ratones PV-Cre ErbB4<sup>flxed</sup>), fue posible identificar fenotipos “tipo-esquizoides” positivos dependientes de la función DA, tales como hiper-reactividad al estrés hipocampal e hiper-sensibilidad a sub-dosis de Anfetamina [189, 190]. Interesantemente, los genotipos ErbB4<sup>-/-</sup> y TH-Cre ErbB4<sup>flxed</sup>, pero no el genotipo PV-Cre ErbB4<sup>flxed</sup> mostraron ser insensibles a la aplicación de un pulso agudo de NRG1 en el CA1 del hipocampo dorsal, con lo cual los niveles extracelulares de DA permanecieron inalterados durante la prueba. Finalmente, únicamente los ratones TH-Cre ErbB4<sup>flxed</sup> exhibieron un estado hiper-dopaminérgico basal a nivel del CA1 del hipocampo dorsal.

### 7.1. Fenómenos ambientales que generan fenotipos tipo-depresivos en ratas

Los niveles extracelulares de GABA fueron incrementados de manera significativa durante las dos sesiones de la prueba de nado forzado. Sin embargo, los niveles basales extracelulares de GABA fueron superiores para el segundo día de la prueba, cuando coincidentemente los tiempos de inmovilidad en las ratas fueron mayores respecto a la primera sesión de la prueba. A favor de este hallazgo, otros



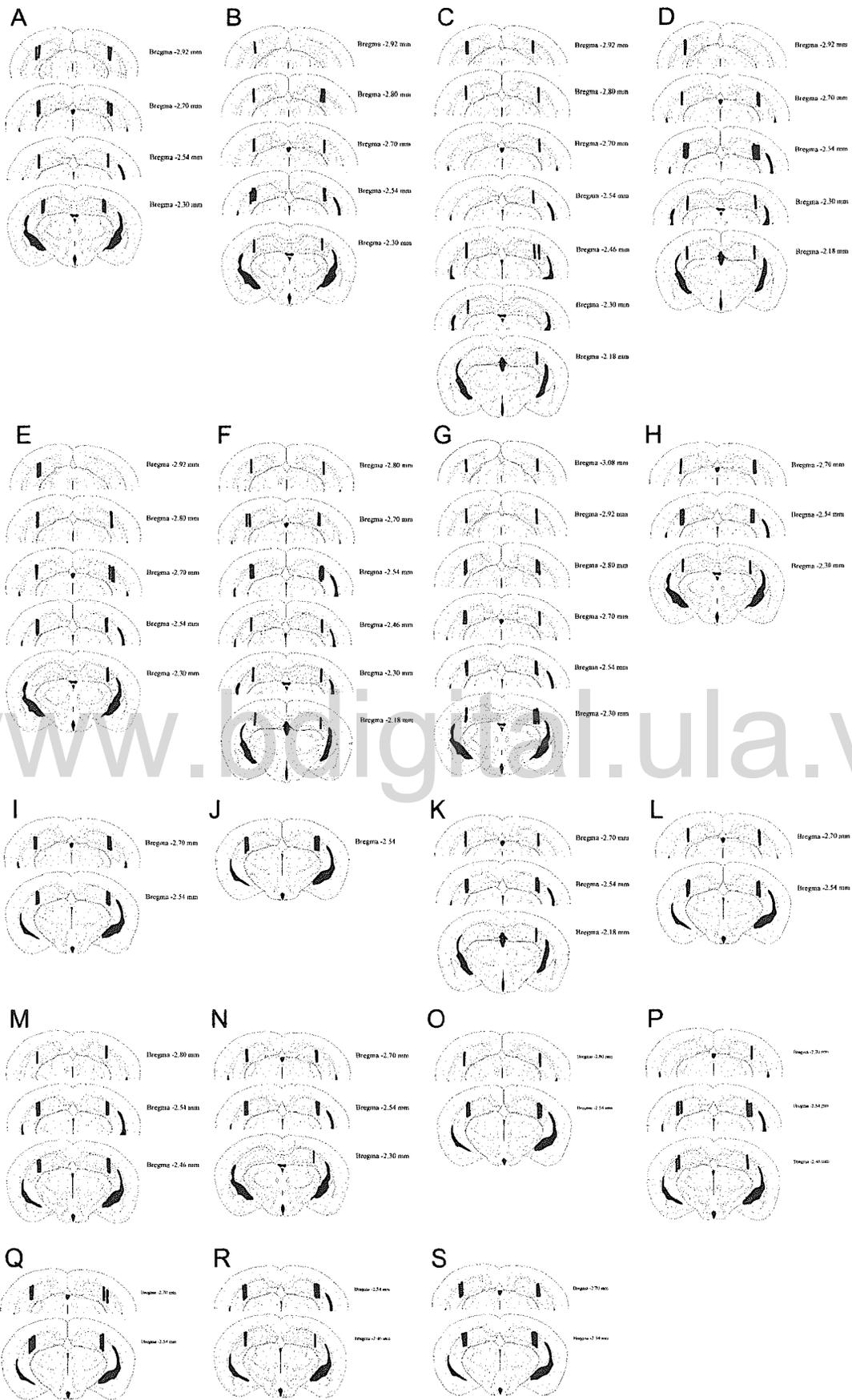
www.bdigital.ula.ve

**Figura 28:** Localización histológica de sondas de microdiálisis de 2 mm de largo en el VP de ratas (A) sometidas a la prueba de nado forzado o (B), sometidas a la prueba de pinchazo ligero en la cola. (C) Ratas sometidas a la prueba de nado forzado que también recibieron un pulso de vehículo de vigabatrina o (D) vigabatrina (20 µg/ml). Localización de la punta de microinyectores de ratas que 5 minutos antes de la prueba de nado forzado recibieron una microinyección bilateral de (E) vehículo, (F) vigabatrina (5, 10, o 15 µg/hemisferio), o (G) bicuculina (0.1 µg/hemisferio). (H) localización de microinyectores dirigidos 2.5 mm por encima del VP (control anatómico negativo) en ratas que recibieron previo a la prueba de nado forzado una dosis de 10 µg/hemisferio de vigabatrina. (I) Ratas sometidas a la prueba de preferencia por la solución de sacarosa que previamente recibieron una microinyección de vehículo, (J) vigabatrina (10 µg/hemisferio), o (K) bicuculina (0.1 µg/hemisferio). (L) Ratas sometidas a la prueba de campo abierto que recibieron previamente una microinyección de vehículo, (M) vigabatrina (10 µg/hemisferio), o (N) bicuculina (0.1 µg/hemisferio).

reportes han previamente demostrado que la prueba de aversión condicionada a sabores novedosos también se correlaciona con un incremento en la transmisión GABAérgica en el VP de ratas [84, 86]. Por el contrario, otros reportes han indicado que la activación de conductas de recompensa y de placer están directamente asociadas con una reducción de los niveles extracelulares de GABA en el VP [76, 85, 87, 195]. Considerando las evidencias previamente indicadas mas los hallazgos aquí reportados, la regulación del sistema GABAérgico en el VP parece ser un mecanismo general regulador de las conductas motivacionales y de hedonia en ratas, por lo cual incrementando el tono de este sistema se promueven conductas de baja motivación y anhedonia, mientras que la reducción del tono conduce a conductas de placer y recompensa.

Los cambios en la transmisión GABAérgica en el VP de ratas mostraron ser específicos para fenómenos de depresión conductual debido a que al emplear la prueba de pinchazo ligero en la cola, la cual es una prueba de estrés agudo, solo pudo generar un incremento de menor amplitud en los niveles de GABA al primer día de la prueba. Adicionalmente, la prueba de estrés no fue capaz de alterar los niveles basales extracelulares de GABA de manera tónica, como si fue el caso para la prueba de nado forzado.

La administración directa de vigabatrina en el VP de ratas por microdiálisis reversa incrementó los niveles extracelulares de GABA en esta región cerebral. Previamente ha sido reportado que otras aéreas cerebrales tales como el estriado, hipocampo y sustancia nigra reticulada también generan este efecto neuroquímico vigabatrina-dependiente [196-198]. La vigabatrina es un derivado sintético de GABA ( $\gamma$ -vinil GABA) que de manera irreversible bloquea a la GABA-T [199], incrementando concomitantemente los niveles extracelulares de GABA [200, 201]. Por su parte, la vigabatrina



www.digital.ula.ve

**Figura 29:** Localización histológica de sondas de microdiálisis de 1 mm de largo dirigidas al CA-1 del hipocampo dorsal de ratones C57BL/6J que recibieron (A) un pulso de vehículo para NRG1 $\beta$ -EGF-like, o (B) un pulso de 1nM NRG1 $\beta$ -EGF-like. Ratones (C) ErbB4<sup>-/-</sup>, (D) control-TH, (E) TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, (F) control-PV, (G) PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, que recibieron un pulso de 1nM NRG1 $\beta$ -EGF-like. Ratones (H) C57BL/6J, (I) ErbB4<sup>-/-</sup>, (J) control-TH, (K) TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, (L) control-PV, y (M) PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, que recibieron un pulso de 50 mM KCl en el CA1 del hipocampo dorsal. Ratones (N) C57BL/6J, (O) ErbB4<sup>-/-</sup>, (P) control-TH, (Q) TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, (R) control-PV, y (S) PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup>, que fueron sometidos por 15 minutos a la prueba de pinchazo ligero en la cola.

directamente administrada en el VP fue capaz de potenciar las conductas de inmovilidad durante la prueba de nado forzado, mientras que el bloqueo del receptor GABA-A redujo este tipo de conductas durante la prueba. Mediante estos resultados es posible sugerir que la neurotransmisión GABAérgica mediada por el receptor GABA-A en el VP de ratas puede tener un rol importante en la regulación de las conductas de inmovilidad en la prueba de nado forzado.

Dada la estrecha relación que existe entre la función del receptor GABA-A en el VP con el control de la actividad motora en ratas, y en orden de descartar cambios inespecíficos en la función motora que podrían determinar cambios inespecíficos en los tiempos de inmovilidad reportados para la prueba de nado forzado, fue necesario explorar de que manera la administración de drogas que afectan la actividad del sistema GABAérgico en el VP afectaban la actividad locomotora en ratas. Varios reportes han señalado que la activación de GABA-A en el VP reduce la actividad motora general en ratas, mientras que su inactivación la incrementa [78, 202-208], tal y como fue el caso nuestro. Sin embargo, interesantemente nosotros encontramos que la administración directa de vigabatrina en el VP no modificó la actividad motora en ratas. Previamente ha sido demostrado que el VP de ratas expresa receptores GABA-A y GABA-B [209, 210], y recientemente en nuestro laboratorio ha sido analizado el rol del receptor GABA-B en el VP de ratas sobre el control de la actividad motora y conductas motivacionales durante la prueba de nado forzado en ratas (comunicación personal). En este análisis, el empleo de agonistas o antagonistas para el receptor GABA-B directamente administrados en el VP de ratas demostraron no alterar la actividad motora durante la prueba de campo abierto, mientras que la administración del agonista GABA-B baclofen incrementó significativamente los tiempos de inmovilidad (comunicación personal). En nuestro caso, es posible que la vigabatrina al coactivar ambas clases de receptores de manera simultánea contrarreste la acción selectiva del receptor GABA-A sobre el control de la actividad motora. En cualquier caso, es importante destacar que el incremento de las conductas de inmovilidad durante la segunda sesión del nado forzado en ratas previamente pre-inyectadas con

vigabatrina en el VP, no se correlacionaron con una reducción de la actividad motora generalizada, tal y como originalmente pudo ser sugerido.

Adicionalmente, las inyecciones de vigabatrina en el VP también redujeron el consumo total de una solución de sacarosa, lo cual sugiere signos de anhedonia en ratas [183], mientras que bloqueando la función de GABA-A no afectó el consumo de sacarosa respecto a ratas que recibieron inyecciones intra-VP de solución salina. Previos reportes han sugerido que el VP es un substrato para conductas hedónicas (*revisado por* [211]). Inyecciones directas del agonista para receptores opioides  $\mu$  D-Ala2-N-Me-Phe4-Glicol5-encefalina (DAMGO) en el VP ha demostrado incrementar el gusto o placer a una solución de sacarosa, mientras que la bicuculina mostro ser incapaz generar este tipo de reacción en ratas [82]. Nuestros resultados demostraron que un incremento en la actividad del sistema GABA en el VP desencadena en conductas anhedónicas y de inmovilidad. La incapacidad de la bicuculina en el VP de producir cambios hedónicos durante la prueba de preferencia por la solución de sacarosa sugiere que el receptor GABA-B, en lugar del receptor GABA-A, podría estar involucrado activamente en el establecimiento inicial de conductas de placer y motivación. Futuros experimentos serán necesarios para ampliar la hipótesis aquí planteada.

Para determinar si los cambios motivacionales observados durante la prueba de nado forzado se debieron a la acción inespecífica de la función del sistema GABA en el VP, y no a la activación inespecífica de regiones cerebrales localizadas en regiones más dorsales al VP, procedimos a realizar inyecciones de vigabatrina en el estriado de ratas. Contrariamente al efecto conductual encontrado para el caso de inyecciones en el VP, inyecciones en esta región incrementaron las conductas de escape en ratas durante la prueba de nado forzado. Esto sugiere que la inmovilidad inducida por la vigabatrina depende de que la misma sea administrada específicamente en el VP. Adicionalmente, si bien estos resultados no forman parte de la hipótesis central de este trabajo, los mismos sugieren que el estriado también puede tener un rol importante en el control de las conductas motivacionales y futuros trabajos deberán explorar esta hipótesis.

La técnica de RT-PCR semicuantitativo evaluó la expresión relativa de ARNm de subunidades del receptor GABA-A en el VP respecto a los niveles de expresión de un gen constitutivo (GAPDH) que se cree no debe cambiar sus niveles de expresión cuando las ratas son sometidas a las diferentes pruebas conductuales. En este trabajo fue posible demostrar que el ARNm de las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\delta$ ,  $\gamma 2$ ,  $\pi$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\rho 2$  y  $\rho 3$  del receptor GABA-A son expresadas en el VP de ratas, mientras que las subunidades  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 3$  y  $\rho 1$  no lo hacen. Finalmente, dado que no fue posible amplificar las subunidades  $\gamma 1$  y  $\gamma 3$  por el método empleado, no podemos emitir conclusiones al respecto de cómo estos genes son expresados en esta área cerebral. Sin embargo, trabajos previos han demostrado que las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$ , y  $\gamma 2$  son expresadas en el VP, mientras que las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 3$ , y  $\gamma 3$  no son o son

débilmente expresadas en esta región cerebral [212-214]. Este trabajo corrobora y extiende estos hallazgos, al demostrar que las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\delta$ ,  $\rho 2$ ,  $\rho 3$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ , y  $\pi$  del receptor GABA-A también se expresan en el VP de ratas. Por su parte, en este trabajo no fue posible detectar la expresión de la subunidad  $\beta 3$  por RT-PCR, lo cual confirma lo encontrado por [214], aunque se contrapone a lo reportado por [213]. Dado que los estudios de expresión aquí citados emplean técnicas de inmunohistoquímica, y considerando que la técnica de RT-PCR es mucho más sensible en la detección de bajos niveles de expresión de un gen en particular, una posibilidad que explicaría la expresión de bajos niveles de la subunidad  $\beta 3$  sería la inespecificidad del anticuerpo empleado por [213], lo cual indicaría señales de detección falsa para esta subunidad en el VP de ratas.

La prueba de nado forzado redujo los niveles de expresión del ARNm de las subunidades  $\alpha 3$ , y  $\gamma 2$ , mientras que incrementó la expresión de la subunidad  $\delta$ , todo esto en al menos un periodo corto de 24 horas luego de la primera sesión de nado forzado. Por su parte, fue posible detectar cambios en la expresión de las proteínas  $\gamma 2$  y  $\delta$  por Western Blot en la misma relación de cambio de su ARNm, sin embargo, este cambio requirió de 6 días adicionales para que se llevara a cabo. Es relativamente común encontrar en los sistemas biológicos que los cambios en los niveles de expresión de la proteína ocurran a una velocidad menor que los cambios de expresión que ocurren para los transcritos correspondientes, debido posiblemente a diversos mecanismos post-transcripcionales que en la mayoría de los casos son aun desconocidos, pero que en todo caso generan un retraso en el tiempo necesario para que se inicien cambios en los niveles de expresión proteica respecto a los cambios rápidos en la expresión de los niveles de los transcritos. Por otra parte, si bien los mecanismos celulares específicos que desencadenan en cambios en los niveles de expresión de las subunidades aquí reportadas se desconocen, varios reportes han señalado que empleando cultivos celulares de neuronas corticales tratadas crónicamente con GABA o con sustancias con afinidad por receptores GABA-A por varios días consecutivos (5-7 días), pueden desencadenar cambios selectivos en la expresión de subunidades del receptor GABA-A. Estos reportes también indican que los cambios en el patrón de expresión ocurren de manera rápida para los transcritos mientras que para las proteínas ocurre de manera lenta, tal y como fue el caso nuestro [171-175, 215]. Considerando lo previamente señalado, es posible sugerir que los cambios selectivos en los niveles de expresión *in vivo* de las subunidades del receptor GABA-A sean debidos posiblemente al incremento de los niveles extracelulares de GABA en el VP luego de que las ratas fueron sometidas a la primera sesión de nado forzado. Por su parte, es también posible sugerir que los cambios en la composición del receptor GABA-A en el VP de ratas luego de que las mismas fueron sometidas a la prueba de nado forzado permita establecer un fenotipo tipo-depresión a largo plazo, lo cual es característico de este desorden mental.

La prueba de nado forzado redujo la expresión del transcrito para la subunidad  $\alpha 3$  en el VP de ratas, sin embargo, no fue posible detectar los niveles de expresión de su proteína correspondiente en ninguno de los grupos controles o experimentales empleados. Aunque las condiciones de estandarización de las condiciones de western blot para esta subunidad fueron logradas empleando para ello extracto total de cerebelo, cuando se intentó detectar la expresión de la misma en el VP esto no fue posible. La explicación más simple que justificaría por qué esta subunidad no fue detectada en esta área cerebral, es que la sensibilidad del método no fue lo suficiente como para detectar los niveles de expresión de esta proteína en el VP mientras que el RT-PCR, al ser un método analítico mucho más sensible si fue capaz de detectar los niveles de expresión de su correspondiente ARNm.

La subunidad  $\gamma 2$  es la más abundantemente expresada en receptores GABA-A sinápticos en el sistema nervioso central. De hecho se considera que esta subunidad permite establecer un receptor GABA-A con características cinéticas fásicas cuando este es activado por su ligando [37]. Por su parte, los receptores GABA-A constituidos con la subunidad  $\delta$  han mostrado estar localizados perisinápticamente y ser hasta 50 veces más sensibles a GABA que aquellos receptores que no están constituidos con la misma. Adicionalmente, a diferencia de los receptores GABA-A constituidos por  $\gamma 2$ , los receptores que contienen la subunidad  $\delta$  muestran propiedades cinéticas tónicas, lo cual implica que pueden mediar potenciales post-sinápticos inhibitorios de mayor magnitud y duración respecto a los receptores fásicos [216-219]. Finalmente, también ha sido demostrado que las subunidades  $\gamma 2$  y  $\delta$  no pueden ser expresadas en el mismo receptor de manera simultánea [220-222]. En este sentido, cuando el receptor GABA-A es altamente estimulado el sistema determina un posible cambio en las propiedades cinéticas y anatómicas del mismo, el cual es mediado por un cambio selectivo en la composición de la subunidad  $\gamma 2$  por la subunidad  $\delta$ . Futuros experimentos enfocados en la caracterización de los potenciales post-sinápticos inhibitorios de las neuronas localizadas a nivel de VP, así como localización subcelular específica de los receptores GABA-A en esta misma región cerebral deberán ser realizados, a modo tal de determinar si efectivamente la exposición de ratas a la prueba de nado forzado sufren cambios en la transmisión GABAérgica que determinan en un fenotipo tipo-depresivo en el animal.

Las subunidades  $\alpha 4$  y  $\alpha 6$  se considera son expresadas comúnmente con la subunidad  $\delta$  en el receptor GABA-A, y este co-ensamblaje ( $\alpha 4$ - $\delta$  o  $\alpha 6$ - $\delta$ ) permite establecer las propiedades farmacológicas y electrofisiológicas clásicas para receptores que contienen  $\delta$  [37]. Sin embargo, este tipo de composición canónica para el receptor GABA-A no ocurre en el VP de ratas. Por otra parte, otros reportes han indicado que aunque en menor proporción que la composición previamente señalada, también es posible encontrar en el cerebro receptores GABA-A que contienen  $\delta$  en ausencia de  $\alpha 4$  o  $\alpha 6$  [223-226]. Adicionalmente, otro reporte ha demostrado que la subunidad  $\delta$  puede ser co-expresada junto a subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta$  en interneuronas del hipocampo, y el mismo media corrientes tónicas inhibitorias en esta región cerebral

[227]. En nuestro caso, el incremento en el tono GABAérgico en el VP de ratas fue generado luego de realizada la primera sesión de la prueba de nado forzado. A su vez, este incremento en la transmisión GABAérgica pudo conducir a un incremento en la expresión de la subunidad  $\delta$  en esta región cerebral, la cual tal y como previamente ha sido mencionado, genera un receptor GABA-A más sensible a GABA mediador de corrientes inhibitorias de tipo tónicas. Esta potenciación de la transmisión GABAérgica mediada por la subunidad  $\delta$  podría posiblemente tener un rol crítico en el establecimiento y mantenimiento de un estado de memoria celular para conductas anhedónicas y de desmotivación generalizada en el animal. Finalmente, varios autores han propuesto que el VP es una estructura cerebral que funciona como interface para señales para señales motivacionales límbicas y la codificación de estas en respuestas motoras específicas, que se asocian con estados de hedonia y placer hasta estados característicos de trastornos emocionales tales como la depresión conductual [83, 211, 228-231].

## 7.2. Impacto del genotipo sobre la función del sistema DA y fenotipos tipo-esquizoides

Previamente ha sido reportado que ratones *ErbB4*<sup>-/-</sup> y PV-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup> comparten varios fenotipos tipo-esquizoides tales como hiperactividad motora y déficits sensorimotores [162, 232]. Sin embargo, únicamente los ratones *ErbB4*<sup>-/-</sup> exhiben una reducción en los niveles de ansiedad basal así como también en déficits en la adquisición de conductas de miedo contextualizadas a sonidos o experiencias previas [162]. En nuestro caso, los ratones TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup> no exhibieron ninguno de los fenotipos tipo-esquizoides previamente observados en los ratones *ErbB4*<sup>-/-</sup> y/o PV-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup>, así como tampoco conductas tipo depresivas, determinadas estas mediante la prueba de nado forzado. Adicionalmente, en nuestro laboratorio también se demostró que los ratones TH-Cre *ErbB4*<sup>floxed</sup> tampoco muestran déficits sensorimotores o en la adquisición de conductas de miedo contextualizadas a un sonido o situación en particular (comunicación personal). La prueba de campo abierto en roedores ha sido el método clásico empleado para determinar la función del circuito mesolímbico (AVT-NAc-VP), y del circuito nigro-estriatal (substancia nigra-estriado), debido a que previamente se ha reportado que estos son importantes en el control de la actividad motora [78, 202, 206, 233]. Por su parte, la prueba de “inhibición por pre-pulso” en roedores es una medida de la función inhibitoria y del procesamiento de la información tiempo-dependiente, en el cual un primer estímulo sensorial débil (el pre-pulso) inhibe la respuesta motora y estereotipada generada por un segundo estímulo sensorial de alta intensidad [234]. La importancia de esta prueba consiste en que la misma sirve como una medida del procesamiento operacional o procesamiento “sensorimotor” por parte del sistema nervioso central, en la cual un exceso de estímulos triviales son filtrados para únicamente dejar aquellos estímulos considerados como “importantes”, con lo cual el individuo puede centrar su atención en este aspecto particular [235], característica que está disminuida en la Esquizofrenia. Estudios en roedores han sugerido que el

procesamiento sensorimotor está regulado por conexiones secuenciales y paralelas de la corteza temporal, CPF, hipocampo, amígdala basolateral, estriado, NAc, el estriado ventral y el VP (*revisado en* [236]).

Varios autores han indicado, mediante técnicas inmunohistológicas y/o de hibridación *in situ*, que el receptor ErbB4 es expresado en la CPF, hipocampo, amígdala, estriado, NAc, VP, tálamo, hipotálamo, AVT, y sustancia nigra [155, 168, 237-239]. Notablemente, Neddens y Buonanno [155] han señalado que particularmente el sistema mesocorticolímbico (CPF, hipocampo, corteza cingulada, amígdala y el NAc) expresa altos niveles de ErbB4, con lo cual se cree que el sistema NRG/ErbB4 puede tener un rol importante en el control de la actividad motora, procesamiento sensorimotor, cognición, conductas motivacionales y de recompensa, las cuales también han demostrado estar afectadas en la Esquizofrenia [240-245]. En nuestro caso, si bien el comportamiento neuroquímico y neurobiológico de la supresión de la expresión de ErbB4 en ratones ErbB4<sup>-/-</sup>, PV-Cre ErbB4<sup>flxed</sup> y TH-Cre ErbB4<sup>flxed</sup> se desconoce casi completamente para estas áreas cerebrales (con la excepción del hipocampo dorsal y en menor grado la CPF), es plausible considerar que el sistema NRG1/ErbB4 debe estar afectando la homeostasis neuroquímica que regula los fenómenos conductuales alterados en estas líneas de ratones modificados genéticamente. Futuros trabajos deberán explorar de que manera al afectar la función del sistema NRG1-ErbB4 en regiones críticas para el control de la actividad motora, procesamiento sensorimotor, cognición y motivacional, tales como sustancia nigra, estriado, AVT, NAc, y VP, se afecta la función de sistemas de neurotransmisión tales como el DA y GABA, que previamente han demostrado ser moduladores de este tipo de conductas [78, 202, 204, 205, 233, 246, 247].

La amfetamina es un psico-estimulante que ha consistentemente demostrado alterar la neurotransmisión DA del sistema nervioso central, mediante el incremento en la liberación vesicular “sináptica” y “no sináptica” por parte de neuronas DA, incremento en la síntesis e inhibición la degradación; así como también mediante la inhibición y reversión del sentido del transportador de DA DAT y del transportador de norepinefrina NET [248-251]. La amfetamina clásicamente ha sido empleada como droga recreacional en la población, y en general esta genera síntomas psicóticos positivos tipo-esquizoide en pacientes normales [252]. Interesantemente, pacientes esquizofrénicos han demostrado ser hiper-sensibles a este psico-estimulante, con exacerbación de la sintomatología psicótica respecto a pacientes normales [189, 190, 253-256]. Considerando lo anterior, la prueba de sensibilidad a la amfetamina en roedores ha sido ampliamente empleada como indicador de la actividad dopaminérgica general en el sistema nervioso central, a modo tal de identificar posibles fenotipos tipo-esquizoide en modelos animales [257, 258]. En el caso de roedores, la administración sistémica de amfetamina ha demostrado incrementar la actividad motora, así como también generar un conjunto de conductas estereotipadas tales como pararse de manera repetitiva sobre las patas posteriores, rascarse, lamerse, movimientos repetitivos de la cabeza, olfacción repetitiva y rotaciones del cuerpo consecutivas [259,

260]. En nuestro caso, evaluando la actividad motora general y la rotacional (conducta estereotipada) en los ratones, nosotros encontramos que los genotipos ErbB4<sup>-/-</sup> y PV-Cre ErbB4<sup>flxed</sup> fueron sensibles a sub-dosis de anfetamina cuando estos eran comparados a sus correspondientes controles, mientras que los ratones TH-Cre ErbB4<sup>flxed</sup> no mostraron cambios motores o en la estereotipia en la sensibilidad por la droga diferentes de su correspondiente control. Por otra parte, la administración sistémica de altas dosis de anfetamina a ratones ErbB4<sup>-/-</sup> logró generar una respuesta motora y estereotipada exacerbada en comparación a sus controles, mientras que los ratones PV-Cre ErbB4<sup>flxed</sup> redujeron la magnitud de las manifestaciones motoras y conductuales evaluadas por nosotros, demostrando el clásico mecanismo dosis-respuesta de U invertida para la actividad motora y conductual previamente reportado [246, 247]. Tal y como se ha indicado previamente, la anfetamina es capaz de incrementar la actividad general del sistema DA en el sistema nervioso central. Por otra parte, la función de los sistemas mesocorticolímbico y nigro-estriatal que regulan la función de la actividad motora, cognición y emoción en general, dependen en la actividad de los sistemas DA y GABA. Diversos reportes han demostrado que el incremento en la actividad motora anfetamina-dependiente está directamente relacionada al aumento en los niveles extracelulares de DA en regiones tales como el estriado, NAc y VP [78, 261, 262], mientras que otros reportes señalan que una reducción del tono GABAérgico en el VP inducido por anfetamina puede también incrementar la actividad motora [85, 202, 204-206, 208], así como también promover conductas hedónicas y de motivación (señalado en este trabajo). Finalmente, previamente hemos señalado que el receptor ErbB4 es expresado en áreas cerebrales altamente asociadas con el control de la actividad motora, tales como sustancia nigra, estriado, AVT, NAc y VP. Yurek y colaboradores [263] demostraron que microinyecciones directas de NRG1 en la sustancia nigra de ratas promueven un incremento ipsilateral de los niveles extracelulares de DA estriatal, indicando una relación directa del sistema NRG1/ErbB4 con el control de la función del sistema DA. Desafortunadamente, este reporte no describe el impacto de las microinyecciones de NRG1 sobre la actividad motora, fenómeno que parece muy probable que ocurra en este diseño experimental. Futuros trabajos deberán verificar que el incremento en los niveles de DA dependientes de la activación del sistema NRG1/ErbB4 en regiones cerebrales directamente asociadas al control motor pueden afectar este tipo de fenómenos.

El estrés psicológico es considerado un factor importante que contribuye al desarrollo de enfermedades neuropsiquiátricas, tales como desordenes en el uso de sustancias de abuso, ansiedad, depresión y Esquizofrenia (*revisado por* [185]). Adicionalmente, muchos autores han señalado ampliamente la alta co-morbilidad entre el estrés y Esquizofrenia, siendo el hipocampo un componente neural recurrentemente afectado durante fenómenos de estrés y Esquizofrenia [185]. Varios reportes han señalado mediante el uso de varios paradigmas de estrés agudo psicológico en roedores, tales como la inmovilización del animal por periodos cortos de tiempo (30-60 minutos), aplicando shocks eléctricos de

baja intensidad en las patas, o empleando la prueba de pinchazo ligero en la cola (5-15 min), que los niveles extracelulares y totales de serotonina, norepinefrina y DA hipocampal son incrementados durante el periodo de estrés agudo [264-269], hecho que puede ser prevenido si previamente los roedores son tratados con ansiolíticos [268]. Dado el hecho que la regulación de la función del sistema DA hipocampal depende del sistema límbico, una disfunción en estructuras tales como el NAc, VP, hipotálamo, área preóptica, amígdala basolateral y AVT puede determinar en una anormal reactividad del mismo ante el estrés [266, 270-275]. De esta manera, varios trabajos han sugerido que el sistema DA en el hipocampo dorsal es hiper-reactivo en fenotipos esquizoides [185, 276, 277], y dicha hiper-reactividad podría ser la responsable de un anormal procesamiento cognitivo, alucinaciones y delirios para el caso de los humanos [276, 277]. La utilización de la prueba de pinchazo en la cola en nuestro caso sirvió para determinar si los ratones *ErbB4*<sup>-/-</sup>, *PV-Cre ErbB4<sup>flox</sup>* y/o *TH-Cre ErbB4<sup>flox</sup>* presentaban una hiper-reactividad dopaminérgica hipocampal a una experiencia de estrés psicológico, con lo cual podría inferirse fenotipos tipo-esquizoide en ratones. Nosotros encontramos que el sistema DA en el CA1 del hipocampo dorsal de ratones *ErbB4*<sup>-/-</sup> o ratones *PV-Cre ErbB4<sup>flox</sup>* fueron hiper-reactivos a la experiencia de estrés inducida por la prueba de pinchazo ligero en la cola, cuando esta reactividad fue comparada con ratones controles. Por el contrario, la reactividad del sistema DA hipocampal de ratones *TH-Cre ErbB4<sup>flox</sup>* no mostró ser diferente con respecto a ratones controles. Tomando en consideración lo anteriormente señalado, podemos sugerir que la eliminación de la expresión de *ErbB4* en el cerebro en general o en interneuronas PV positivas afecta la homeostasis normal del sistema límbico, tal y como podría ser el caso en la Esquizofrenia, hecho que no ocurre para los ratones *TH-Cre ErbB4<sup>flox</sup>*.

En este trabajo nosotros demostramos que la concentración extracelular de DA en el CA1 del hipocampo dorsal de ratones C57BL/6J controles fue de ~0.8 nM, concentración similar a la previamente reportada para el CA1 de ratas [154]; mientras que la supresión total de la expresión del receptor *ErbB4* (ratones *ErbB4*<sup>-/-</sup>) no afectó dichos niveles basales. Por otra parte, los ratones *PV-Cre ErbB4<sup>flox</sup>* y su correspondiente control tampoco mostraron diferencias significativas en los niveles extracelulares de DA (~0.8 nM). Sin embargo, aunque los niveles basales de DA en el CA1 de ratones controles para *TH-Cre ErbB4<sup>flox</sup>* también fueron similares a los otros genotipos estudiados, la supresión en la expresión de *ErbB4* en neuronas TH positivas duplicó significativamente los niveles extracelulares basales de DA (~2 nM) en esta región cerebral. La DA hipocampal procede de terminales dopaminérgicos procedentes de neuronas A10 del AVT [33, 34]. Desde una perspectiva simplista, existen dos mecanismos que podrían explicar porque la supresión de la expresión del receptor *ErbB4* en neuronas positivas para TH incrementan el tono DA basal en el CA1 del hipocampo. El primero es que la regulación del tono dopaminérgico sea debido a un mecanismo de circuito local, en la cual los terminales dopaminérgicos sean inhibidos por la expresión del receptor *ErbB4* a nivel presináptico, o por la acción indirecta de algún

otro componente celular presente en esta región cerebral que también exprese ErbB4; mientras que la segunda opción es que la regulación del tono dopaminérgico ocurra a nivel del AVT. En este sentido, actualmente no existen evidencias de que el receptor ErbB4 sea expresado en terminales DA o positivos para TH en el CA1 del hipocampo, mientras que por el contrario, varios reportes han señalado que ErbB4 es ampliamente expresado en diferentes poblaciones de interneuronas positivas para PV, GAD67, CCK, NOs o somatostatina [155, 156]. De esta manera, al menos de momento parece improbable que la regulación del tono DA en esta región cerebral sea debida a un mecanismo local. Por otra parte, varios reportes han indicado por técnicas de hibridización *in situ* que neuronas positivas para TH y negativas para la enzima dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (enzima encontrada en neuronas norepinefrinergicas, ver *Figura 4A*) expresan ARNm para el receptor ErbB4 a nivel del AVT [167-169]. En nuestro caso, al suprimir la expresión de ErbB4 en neuronas TH positivas aparentemente se desinhibe la actividad tónica dopaminérgica basal a nivel del AVT, con lo cual los niveles extracelulares de DA a nivel del CA1 del hipocampo se incrementan, tal y como nosotros encontramos ocurre en nuestro caso. Actualmente no existen reportes que específicamente estudien el efecto directo de la activación de receptores ErbB4 en el AVT sobre el control del tono DA a nivel del hipocampo dorsal, lo cual deberá ser estudiado para verificar esta hipótesis.

La administración directa y aguda de NRG1 en el CA1 del hipocampo dorsal de ratones de fenotipo salvaje fue capaz de incrementar los niveles extracelulares de DA durante el tiempo que perduró la administración de la misma, tal y como previamente ha sido reportado en ratas [154]. Sin embargo, los ratones ErbB4<sup>-/-</sup> fueron insensibles a la administración del pulso de NRG1. Interesantemente, aunque no existen evidencias de que ErbB4 sea expresado en terminales DA a nivel del CA1, ratones TH-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> también mostraron ser incapaces de incrementar los niveles extracelulares de DA cuando la NRG1 fue administrada en esta región. Por otra parte, y en contra de la hipótesis original de este trabajo, los ratones PV-Cre ErbB4<sup>floxed</sup> mostraron ser capaces de incrementar los niveles de DA en el CA1 del hipocampo dorsal. Las implicaciones de estos resultados no se pueden hacer esperar. En primer lugar, los mismos demuestran de manera clara que la activación del receptor ErbB4 por la acción de la NRG1 es esencial para lograr la activación de los mecanismos neuronales necesarios que conducen a un incremento en los niveles extracelulares de DA a nivel del CA1 del hipocampo, posiblemente por mecanismos sinápticos, dado el hecho de que la administración de un pulso despolarizante de KCl fue capaz de generar un incremento de igual magnitud que la NRG1 en los niveles extracelulares de DA. En segundo lugar, estos resultados sugieren de manera interesante e inesperada que el incremento de los niveles de DA extracelulares dependientes del sistema NRG1/ErbB4 en el hipocampo, requieren de la activación de un receptor ErbB4 putativo expresado a nivel de neuronas TH positivas en el hipocampo dorsal (en nuestro caso posiblemente solo terminales). En tercer lugar, sin bien reportes previos han señalado que

interneuronas del hipocampo que co-expresan ErbB4/PV son importantes en el control de mecanismos locales tales como las oscilaciones  $\gamma$  (gama) [155, 163-166], y que ratones defectivos para la expresión de ErbB4 en estas interneuronas reproducen algunos de los síntomas característicos de la Esquizofrenia [162]; nuestros resultados sugieren que las mismas no regulan (al menos directamente) el incremento en los niveles extracelulares de DA en esta región cerebral. Aunque todavía no podemos descartar que la ausencia de incremento de los niveles extracelulares de DA dependientes del sistema NRG1/ErbB4 en ratones TH-Cre ErbB4*flxed* pueda derivarse por un déficit funcional en alguna de las estructuras cerebrales aguas-abajo del circuito mesocorticolímbico, tales como el NAc o el AVT, esta hipótesis no parece ser probable si consideramos que los ratones PV-Cre ErbB4*flxed* al mismo tiempo si son sensibles a la aplicación local de NRG1 en el hipocampo. De todos modos, es importante considerar que nosotros no hemos evaluado el rol de otros sistemas celulares que también expresan ErbB4 tales como las interneuronas CCK, NOs y somatostatina positivas, las cuales podrían ejercer un papel regulador a nivel local y/o de circuito que aun son desconocidos para nosotros. Nuevos trabajos deberán continuar explorando el rol particular de estos otros tipos celulares sobre el control general de la función del sistema NRG1/ErbB4 sobre la liberación de DA en el CA1 del hipocampo dorsal, y de manera más amplia, sobre el control de las conductas cognitivas, motivacionales y de recompensa.

## 8. CONCLUSION

Nosotros demostramos que una experiencia ambiental desagradable y aversiva como lo es la prueba de nado forzado, conduce a un incremento en los niveles extracelulares de GABA y cambios simultáneos en la composición de su receptor GABA-A en el VP de ratas. Nosotros presumimos que los cambios en los niveles extracelulares de GABA en esta región cerebral se deben a un incremento en la actividad de la proyección GABAérgica NAc-VP, dado el hecho que previamente ha sido demostrado que este paradigma experimental es capaz de activar el NAc [66-68]. Como consecuencia del cambio en la actividad de la proyección GABAérgica NAc-VP, los receptores GABA-A a nivel del VP experimentaron cambios en su composición que posiblemente modifican sus propiedades cinéticas y farmacológicas. Los cambios en la función del sistema GABA en conjunto debidos a una experiencia ambiental aversiva parecen estar asociados a un mecanismo de memoria epigenética, que en general describen cambios en la función del sistema mesocorticolímbico y consecuentemente, en un fenotipo tipo-depresivo en un modelo animal. Por su parte, al afectar la función normal general del sistema NRG1/ErbB4 en el cerebro de ratones, o específicamente en interneuronas PV+/neuronas TH+, nosotros demostramos que la conducta “normal” resulta afectada, con la aparición de fenotipos asociados a conductas tipo-esquizoides y a la función general del sistema DA, tales como hiper-reactividad dopaminérgica hipocampal al estrés agudo e hiper-sensibilidad a sub-dosis de anfetamina (ErbB4<sup>-/-</sup> y PV-Cre ErbB4*flxed*). Adicionalmente, al

suprimir la expresión de ErbB4 en el cerebro en general o en neuronas TH+, nosotros demostramos que la NRG1 directamente administrada en el CA1 del hipocampo dorsal fue incapaz de incrementar los niveles extracelulares locales de DA, tal y como ocurrió en los ratones controles y como previamente a sido reportado para el caso de ratas [154]. Tomando en cuenta los fenotipos tipo-esquizoides encontrados en los ratones transgénicos empleados, mas la ausencia de respuesta dopaminérgica hipocampal inducida por la administración directa de NRG1, nosotros consideramos que el sistema NRG1/ErbB4 afecta la función del sistema DA en general del sistema nervioso central. Dado que la NRG1 y el receptor ErbB4 han sido asociados a la Esquizofrenia [145, 278], nuestros resultados agregan evidencias experimentales respecto al rol específico de este sistema sobre la regulación de la DA a nivel del sistema mesocorticolímbico, la cual contribuye con el desarrollo de las manifestaciones psicóticas características de este desorden mental.

## 9. REFERENCIAS

1. Papez, J.W., *A proposed mechanism of emotion*. 1937. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 1995. 7(1): p. 103-12.
2. DSM-IV-TR, *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* fourth edition ed, ed. A.P. Association 2000.
3. Agid, Y., et al., *How can drug discovery for psychiatric disorders be improved?* Nat Rev Drug Discov, 2007. 6(3): p. 189-201.
4. Murray, R., *The Essentials of Postgraduate Psychiatry*. Third edition ed 1997, United Kingdom: Cambridge University Press.
5. Olds, J. and P. Milner, *Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain*. J Comp Physiol Psychol, 1954. 47(6): p. 419-27.
6. Corbett, D. and R.A. Wise, *Intracranial self-stimulation in relation to the ascending dopaminergic systems of the midbrain: a moveable electrode mapping study*. Brain Res, 1980. 185(1): p. 1-15.
7. Wise, R.A., *Addictive drugs and brain stimulation reward*. Annu Rev Neurosci, 1996. 19: p. 319-40.
8. Wise, R.A., *Roles for nigrostriatal--not just mesocorticolimbic--dopamine in reward and addiction*. Trends Neurosci, 2009. 32(10): p. 517-24.
9. Yokel, R.A. and R.A. Wise, *Increased lever pressing for amphetamine after pimozide in rats: implications for a dopamine theory of reward*. Science, 1975. 187(4176): p. 547-9.
10. Albanese, A., M.C. Altavista, and P. Rossi, *Organization of central nervous system dopaminergic pathways*. J Neural Transm Suppl, 1986. 22: p. 3-17.
11. Le Moal, M. and H. Simon, *Mesocorticolimbic dopaminergic network: functional and regulatory roles*. Physiol Rev, 1991. 71(1): p. 155-234.
12. Oades, R.D. and G.M. Halliday, *Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity*. Brain Res, 1987. 434(2): p. 117-65.
13. Galey, D., R. Jaffard, and M. Le Moal, *Alternation behavior, spatial discrimination, and reversal after electrocoagulation of the ventral mesencephalic tegmentum in the rat*. Behav Neural Biol, 1979. 26(1): p. 81-8.
14. Gaffori, O. and M. Le Moal, *Disruption of maternal behavior and appearance of cannibalism after ventral mesencephalic tegmentum lesions*. Physiol Behav, 1979. 23(2): p. 317-23.
15. Stinus, L., et al., *Disappearance of hoarding and disorganization of eating behavior after ventral mesencephalic tegmentum lesions in rats*. J Comp Physiol Psychol, 1978. 92(2): p. 289-96.

16. Berridge, K.C., *The debate over dopamine's role in reward: the case for incentive salience*. Psychopharmacology (Berl), 2007. **191**(3): p. 391-431.
17. Ikemoto, S. and R.A. Wise, *Rewarding effects of the cholinergic agents carbachol and neostigmine in the posterior ventral tegmental area*. J Neurosci, 2002. **22**(22): p. 9895-904.
18. Weiner, D.M., A.I. Levey, and M.R. Brann, *Expression of muscarinic acetylcholine and dopamine receptor mRNAs in rat basal ganglia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): p. 7050-4.
19. Clarke, P.B. and A. Pert, *Autoradiographic evidence for nicotine receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic neurons*. Brain Res, 1985. **348**(2): p. 355-8.
20. Museo, E. and R.A. Wise, *Place preference conditioning with ventral tegmental injections of cytisine*. Life Sci, 1994. **55**(15): p. 1179-86.
21. Bozarth, M.A. and R.A. Wise, *Intracranial self-administration of morphine into the ventral tegmental area in rats*. Life Sci, 1981. **28**(5): p. 551-5.
22. Welzl, H., G. Kuhn, and J.P. Huston, *Self-administration of small amounts of morphine through glass micropipettes into the ventral tegmental area of the rat*. Neuropharmacology, 1989. **28**(10): p. 1017-23.
23. Devine, D.P. and R.A. Wise, *Self-administration of morphine, DAMGO, and DPDPE into the ventral tegmental area of rats*. J Neurosci, 1994. **14**(4): p. 1978-84.
24. Johnson, S.W. and R.A. North, *Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons*. J Neurosci, 1992. **12**(2): p. 483-8.
25. Ikemoto, S., J.M. Murphy, and W.J. McBride, *Self-infusion of GABA(A) antagonists directly into the ventral tegmental area and adjacent regions*. Behav Neurosci, 1997. **111**(2): p. 369-80.
26. Ikemoto, S., J.M. Murphy, and W.J. McBride, *Regional differences within the rat ventral tegmental area for muscimol self-infusions*. Pharmacol Biochem Behav, 1998. **61**(1): p. 87-92.
27. David, V., T.P. Durkin, and P. Cazala, *Self-administration of the GABAA antagonist bicuculline into the ventral tegmental area in mice: dependence on D2 dopaminergic mechanisms*. Psychopharmacology (Berl), 1997. **130**(2): p. 85-90.
28. Sugita, S., S.W. Johnson, and R.A. North, *Synaptic inputs to GABAA and GABAB receptors originate from discrete afferent neurons*. Neurosci Lett, 1992. **134**(2): p. 207-11.
29. Rick, C.E. and M.G. Lacey, *Rat substantia nigra pars reticulata neurones are tonically inhibited via GABAA, but not GABAB, receptors in vitro*. Brain Res, 1994. **659**(1-2): p. 133-7.
30. Carlezon, W.A., Jr. and R.A. Wise, *Rewarding actions of phencyclidine and related drugs in nucleus accumbens shell and frontal cortex*. J Neurosci, 1996. **16**(9): p. 3112-22.
31. You, Z.B., et al., *Electrical stimulation of the prefrontal cortex increases cholecystokinin, glutamate, and dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study in freely moving rats*. J Neurosci, 1998. **18**(16): p. 6492-500.
32. Swanson, L.W., *The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat*. Brain Res Bull, 1982. **9**(1-6): p. 321-53.
33. Gasbarri, A., et al., *Anterograde and retrograde tracing of projections from the ventral tegmental area to the hippocampal formation in the rat*. Brain Res Bull, 1994. **33**(4): p. 445-52.
34. Gasbarri, A., et al., *Mesolimbic dopaminergic neurons innervating the hippocampal formation in the rat: a combined retrograde tracing and immunohistochemical study*. Brain Res, 1994. **668**(1-2): p. 71-9.
35. Wise, R.A., *Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on*. Neurotox Res, 2008. **14**(2-3): p. 169-83.
36. Bowery, N.G., et al., *International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid(B) receptors: structure and function*. Pharmacol Rev, 2002. **54**(2): p. 247-64.
37. Olsen, R.W. and W. Sieghart, *International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update*. Pharmacol Rev, 2008. **60**(3): p. 243-60.

38. Roberts, E. and S. Frankel, *gamma-Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid*. J Biol Chem, 1950. **187**(1): p. 55-63.
39. Bu, D.F., et al., *Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(6): p. 2115-9.
40. Petroff, O.A., *GABA and glutamate in the human brain*. Neuroscientist, 2002. **8**(6): p. 562-73.
41. Johnston, G.A., *GABA<sub>A</sub> receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels?* Trends Pharmacol Sci, 1996. **17**(9): p. 319-23.
42. Jones, K.A., et al., *GABA(B) receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA(B)R1 and GABA(B)R2*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 674-9.
43. Kaupmann, K., et al., *GABA(B)-receptor subtypes assemble into functional heteromeric complexes*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 683-7.
44. White, J.H., et al., *Heterodimerization is required for the formation of a functional GABA(B) receptor*. Nature, 1998. **396**(6712): p. 679-82.
45. Kuner, R., et al., *Role of heteromer formation in GABA<sub>B</sub> receptor function*. Science, 1999. **283**(5398): p. 74-7.
46. Martin, S.C., S.J. Russek, and D.H. Farb, *Molecular identification of the human GABABR2: cell surface expression and coupling to adenylyl cyclase in the absence of GABABR1*. Mol Cell Neurosci, 1999. **13**(3): p. 180-91.
47. Margeta-Mitrovic, M., Y.N. Jan, and L.Y. Jan, *A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization*. Neuron, 2000. **27**(1): p. 97-106.
48. Calver, A.R., et al., *The C-terminal domains of the GABA(b) receptor subunits mediate intracellular trafficking but are not required for receptor signaling*. J Neurosci, 2001. **21**(4): p. 1203-10.
49. Galvez, T., et al., *Allosteric interactions between GB1 and GB2 subunits are required for optimal GABA(B) receptor function*. EMBO J, 2001. **20**(9): p. 2152-9.
50. Pagano, A., et al., *C-terminal interaction is essential for surface trafficking but not for heteromeric assembly of GABA(b) receptors*. J Neurosci, 2001. **21**(4): p. 1189-202.
51. Kaupmann, K., et al., *Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors*. Nature, 1997. **386**(6622): p. 239-46.
52. Isomoto, S., et al., *Cloning and tissue distribution of novel splice variants of the rat GABA<sub>B</sub> receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **253**(1): p. 10-5.
53. Pfaff, T., et al., *Alternative splicing generates a novel isoform of the rat metabotropic GABA(B)R1 receptor*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(8): p. 2874-82.
54. Calver, A.R., et al., *The expression of GABA(B1) and GABA(B2) receptor subunits in the cNS differs from that in peripheral tissues*. Neuroscience, 2000. **100**(1): p. 155-70.
55. Schwarz, D.A., et al., *Characterization of gamma-aminobutyric acid receptor GABAB(1e), a GABAB(1) splice variant encoding a truncated receptor*. J Biol Chem, 2000. **275**(41): p. 32174-81.
56. Wei, K., et al., *Cloning and tissue distribution of a novel isoform of the rat GABA(B)R1 receptor subunit*. Neuroreport, 2001. **12**(4): p. 833-7.
57. Wei, K., et al., *Cloning and characterization of a novel variant of rat GABA(B)R1 with a truncated C-terminus*. Brain Res Mol Brain Res, 2001. **89**(1-2): p. 103-10.
58. Odagaki, Y., N. Nishi, and T. Koyama, *Functional coupling of GABA(B) receptors with G proteins that are sensitive to N-ethylmaleimide treatment, suramin, and benzalkonium chloride in rat cerebral cortical membranes*. J Neural Transm, 2000. **107**(10): p. 1101-16.
59. Odagaki, Y. and T. Koyama, *Identification of galpha subtype(s) involved in gamma-aminobutyric acid(B) receptor-mediated high-affinity guanosine triphosphatase activity in rat cerebral cortical membranes*. Neurosci Lett, 2001. **297**(2): p. 137-41.
60. Moussavi, S., et al., *Depression, chronic diseases, and decrements in health: results from the World Health Surveys*. Lancet, 2007. **370**(9590): p. 851-8.

61. Cao, J.L., et al., *Mesolimbic dopamine neurons in the brain reward circuit mediate susceptibility to social defeat and antidepressant action*. J Neurosci, 2010. **30**(49): p. 16453-8.
62. Covington, H.E., 3rd, et al., *Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex*. J Neurosci, 2010. **30**(48): p. 16082-90.
63. Archer, T., et al., *Role of olfactory bulbectomy and DSP4 treatment in avoidance learning in the rat*. Behav Neurosci, 1984. **98**(3): p. 496-505.
64. Farrar, A.M., et al., *Forebrain circuitry involved in effort-related choice: Injections of the GABAA agonist muscimol into ventral pallidum alter response allocation in food-seeking behavior*. Neuroscience, 2008. **152**(2): p. 321-30.
65. Cotman, C.W. and D.T. Monaghan, *Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their properties*. Adv Exp Med Biol, 1986. **203**: p. 237-52.
66. Pliakas, A.M., et al., *Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens*. J Neurosci, 2001. **21**(18): p. 7397-403.
67. Carlezon, W.A., Jr., R.S. Duman, and E.J. Nestler, *The many faces of CREB*. Trends Neurosci, 2005. **28**(8): p. 436-45.
68. Chau, D.T., et al., *Fluoxetine alleviates behavioral depression while decreasing acetylcholine release in the nucleus accumbens shell*. Neuropsychopharmacology, 2011. **36**(8): p. 1729-37.
69. Chau, D.T., et al., *Nucleus accumbens muscarinic receptors in the control of behavioral depression: antidepressant-like effects of local M1 antagonist in the Porsolt swim test*. Neuroscience, 2001. **104**(3): p. 791-8.
70. Rada, P., et al., *Glutamate release in the nucleus accumbens is involved in behavioral depression during the PORSOLT swim test*. Neuroscience, 2003. **119**(2): p. 557-65.
71. Rada, P., et al., *Behavioral depression in the swim test causes a biphasic, long-lasting change in accumbens acetylcholine release, with partial compensation by acetylcholinesterase and muscarinic-1 receptors*. Neuroscience, 2006. **141**(1): p. 67-76.
72. Mingote, S., et al., *Nucleus accumbens adenosine A2A receptors regulate exertion of effort by acting on the ventral striatopallidal pathway*. J Neurosci, 2008. **28**(36): p. 9037-46.
73. Walaas, I. and F. Fonnum, *The distribution and origin of glutamate decarboxylase and choline acetyltransferase in ventral pallidum and other basal forebrain regions*. Brain Res, 1979. **177**(2): p. 325-36.
74. Groenewegen, H.J. and F.T. Russchen, *Organization of the efferent projections of the nucleus accumbens to pallidal, hypothalamic, and mesencephalic structures: a tracing and immunohistochemical study in the cat*. J Comp Neurol, 1984. **223**(3): p. 347-67.
75. O'Donnell, P., et al., *Interconnected parallel circuits between rat nucleus accumbens and thalamus revealed by retrograde transsynaptic transport of pseudorabies virus*. J Neurosci, 1997. **17**(6): p. 2143-67.
76. Bourdelais, A. and P.W. Kalivas, *Amphetamine lowers extracellular GABA concentration in the ventral pallidum*. Brain Res, 1990. **516**(1): p. 132-6.
77. Hooks, M.S. and P.W. Kalivas, *The role of mesoaccumbens--pallidal circuitry in novelty-induced behavioral activation*. Neuroscience, 1995. **64**(3): p. 587-97.
78. Fletcher, P.J., et al., *Injections of D-amphetamine into the ventral pallidum increase locomotor activity and responding for conditioned reward: a comparison with injections into the nucleus accumbens*. Brain Res, 1998. **805**(1-2): p. 29-40.
79. Wisniecki, A., et al., *Motor effects of GABA(A) antagonism in globus pallidus: studies of locomotion and tremulous jaw movements in rats*. Psychopharmacology (Berl), 2003. **170**(2): p. 140-9.
80. Stratford, T.R., A.E. Kelley, and K.J. Simansky, *Blockade of GABAA receptors in the medial ventral pallidum elicits feeding in satiated rats*. Brain Res, 1999. **825**(1-2): p. 199-203.
81. Perez, J., et al., *Effects of feeding on extracellular levels of glutamate in the medial and lateral portion of the globus pallidus of freely moving rats*. Brain Res, 2000. **877**(1): p. 91-4.

82. Smith, K.S. and K.C. Berridge, *The ventral pallidum and hedonic reward: neurochemical maps of sucrose "liking" and food intake*. J Neurosci, 2005. **25**(38): p. 8637-49.
83. Shimura, T., H. Imaoka, and T. Yamamoto, *Neurochemical modulation of ingestive behavior in the ventral pallidum*. Eur J Neurosci, 2006. **23**(6): p. 1596-604.
84. Inui, T., T. Shimura, and T. Yamamoto, *The role of the ventral pallidum GABAergic system in conditioned taste aversion: effects of microinjections of a GABAA receptor antagonist on taste palatability of a conditioned stimulus*. Brain Res, 2007. **1164**: p. 117-24.
85. Bourdelais, A. and P.W. Kalivas, *Apomorphine decreases extracellular GABA in the ventral pallidum of rats with 6-OHDA lesions in the nucleus accumbens*. Brain Res, 1992. **577**(2): p. 306-11.
86. Inui, T., T. Yamamoto, and T. Shimura, *GABAergic transmission in the rat ventral pallidum mediates a saccharin palatability shift in conditioned taste aversion*. Eur J Neurosci, 2009. **30**(1): p. 110-5.
87. Torregrossa, M.M. and P.W. Kalivas, *Neurotensin in the ventral pallidum increases extracellular gamma-aminobutyric acid and differentially affects cue- and cocaine-primed reinstatement*. J Pharmacol Exp Ther, 2008. **325**(2): p. 556-66.
88. Carlsson, A., M. Lindqvist, and T. Magnusson, *3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists*. Nature, 1957. **180**(4596): p. 1200.
89. Beaulieu, J.M. and R.R. Gainetdinov, *The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors*. Pharmacol Rev, 2011. **63**(1): p. 182-217.
90. Molinoff, P.B. and J. Axelrod, *Biochemistry of catecholamines*. Annu Rev Biochem, 1971. **40**: p. 465-500.
91. Daubner, S.C., T. Le, and S. Wang, *Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis*. Arch Biochem Biophys, 2011. **508**(1): p. 1-12.
92. Keibarian, J.W. and D.B. Calne, *Multiple receptors for dopamine*. Nature, 1979. **277**(5692): p. 93-6.
93. Falls, D.L., *Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 14-30.
94. Holmes, W.E., et al., *Identification of heregulin, a specific activator of p185erbB2*. Science, 1992. **256**(5060): p. 1205-10.
95. Peles, E., et al., *Isolation of the neu/HER-2 stimulatory ligand: a 44 kd glycoprotein that induces differentiation of mammary tumor cells*. Cell, 1992. **69**(1): p. 205-16.
96. Wen, D., et al., *Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit*. Cell, 1992. **69**(3): p. 559-72.
97. Goodearl, A.D., et al., *Purification of multiple forms of glial growth factor*. J Biol Chem, 1993. **268**(24): p. 18095-102.
98. Marchionni, M.A., et al., *Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system*. Nature, 1993. **362**(6418): p. 312-8.
99. Falls, D.L., et al., *ARL1, a protein that stimulates acetylcholine receptor synthesis, is a member of the neu ligand family*. Cell, 1993. **72**(5): p. 801-15.
100. Gassmann, M., et al., *Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor*. Nature, 1995. **378**(6555): p. 390-4.
101. Talmage, D.A., *Mechanisms of neuregulin action*. Novartis Found Symp, 2008. **289**: p. 74-84; discussion 84-93.
102. Carpenter, G., *ErbB-4: mechanism of action and biology*. Exp Cell Res, 2003. **284**(1): p. 66-77.
103. Earp, H.S., et al., *Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research*. Breast Cancer Res Treat, 1995. **35**(1): p. 115-32.
104. Hynes, N.E. and D.F. Stern, *The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1198**(2-3): p. 165-84.

105. Kirschbaum, M.H. and Y. Yarden, *The ErbB/HER family of receptor tyrosine kinases: A potential target for chemoprevention of epithelial neoplasms*. J Cell Biochem Suppl, 2000. 34: p. 52-60.
106. Olayioye, M.A., et al., *The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer*. EMBO J, 2000. 19(13): p. 3159-67.
107. Kay, S.R., A. Fiszbein, and L.A. Opler, *The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia*. Schizophr Bull, 1987. 13(2): p. 261-76.
108. Heinrichs, R.W. and K.K. Zakzanis, *Neurocognitive deficit in schizophrenia: a quantitative review of the evidence*. Neuropsychology, 1998. 12(3): p. 426-45.
109. Grace, A.A., *Dopamine system dysregulation by the hippocampus: implications for the pathophysiology and treatment of schizophrenia*. Neuropharmacology, 2012. 62(3): p. 1342-8.
110. Janowsky, D.S., et al., *Provocation of schizophrenic symptoms by intravenous administration of methylphenidate*. Arch Gen Psychiatry, 1973. 28(2): p. 185-91.
111. Angrist, B., et al., *Amphetamine psychosis: behavioral and biochemical aspects*. J Psychiatr Res, 1974. 11: p. 13-23.
112. Kapur, S. and G. Remington, *Dopamine D(2) receptors and their role in atypical antipsychotic action: still necessary and may even be sufficient*. Biol Psychiatry, 2001. 50(11): p. 873-83.
113. Kapur, S., et al., *Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia*. Am J Psychiatry, 2000. 157(4): p. 514-20.
114. Abi-Dargham, A., et al., *Baseline and amphetamine-stimulated dopamine activity are related in drug-naïve schizophrenic subjects*. Biol Psychiatry, 2009. 65(12): p. 1091-3.
115. Abi-Dargham, A., et al., *Striatal amphetamine-induced dopamine release in patients with schizotypal personality disorder studied with single photon emission computed tomography and [123I]iodobenzamide*. Biol Psychiatry, 2004. 55(10): p. 1001-6.
116. Silbersweig, D.A., et al., *A functional neuroanatomy of hallucinations in schizophrenia*. Nature, 1995. 378(6553): p. 176-9.
117. Weinberger, D.R., *Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia*. Arch Gen Psychiatry, 1987. 44(7): p. 660-9.
118. Davis, K.L., et al., *Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization*. Am J Psychiatry, 1991. 148(11): p. 1474-86.
119. Baddeley, A., *The episodic buffer: a new component of working memory?* Trends Cogn Sci, 2000. 4(11): p. 417-423.
120. Bassett, D.S., et al., *Cognitive fitness of cost-efficient brain functional networks*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. 106(28): p. 11747-52.
121. Goldman-Rakic, P.S., *The prefrontal landscape: implications of functional architecture for understanding human mentation and the central executive*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1996. 351(1346): p. 1445-53.
122. Shimodera, S., et al., *Mapping hypofrontality during letter fluency task in schizophrenia: a multi-channel near-infrared spectroscopy study*. Schizophr Res, 2012. 136(1-3): p. 63-9.
123. Ehlis, A.C., et al., *Hypofrontality in schizophrenic patients and its relevance for the choice of antipsychotic medication: an event-related potential study*. World J Biol Psychiatry, 2012. 13(3): p. 188-99.
124. Peuskens, J., C. Demily, and F. Thibaut, *Treatment of cognitive dysfunction in schizophrenia*. Clin Ther, 2005. 27 Suppl A: p. S25-37.
125. Whittington, M.A., R.D. Traub, and J.G. Jefferys, *Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation*. Nature, 1995. 373(6515): p. 612-5.
126. Fisahn, A., et al., *Cholinergic induction of network oscillations at 40 Hz in the hippocampus in vitro*. Nature, 1998. 394(6689): p. 186-9.
127. Hajos, N., et al., *Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscillations*. Eur J Neurosci, 2000. 12(9): p. 3239-49.

128. Fuchs, E.C., et al., *Recruitment of parvalbumin-positive interneurons determines hippocampal function and associated behavior*. *Neuron*, 2007. **53**(4): p. 591-604.
129. Korotkova, T., et al., *NMDA receptor ablation on parvalbumin-positive interneurons impairs hippocampal synchrony, spatial representations, and working memory*. *Neuron*, 2010. **68**(3): p. 557-69.
130. Colgin, L.L. and E.I. Moser, *Gamma oscillations in the hippocampus*. *Physiology (Bethesda)*, 2010. **25**(5): p. 319-29.
131. Fries, P., *Neuronal gamma-band synchronization as a fundamental process in cortical computation*. *Annu Rev Neurosci*, 2009. **32**: p. 209-24.
132. Haenschel, C. and D. Linden, *Exploring intermediate phenotypes with EEG: working memory dysfunction in schizophrenia*. *Behav Brain Res*, 2011. **216**(2): p. 481-95.
133. Andersson, R.H., et al., *Neuregulin and dopamine modulation of hippocampal gamma oscillations is dependent on dopamine D4 receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(32): p. 13118-23.
134. Mortensen, P.B., et al., *Effects of family history and place and season of birth on the risk of schizophrenia*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(8): p. 603-8.
135. Marcelis, M., et al., *Urbanization and psychosis: a study of 1942-1978 birth cohorts in The Netherlands*. *Psychol Med*, 1998. **28**(4): p. 871-9.
136. Buka, S.L., et al., *Maternal infections and subsequent psychosis among offspring*. *Arch Gen Psychiatry*, 2001. **58**(11): p. 1032-7.
137. Brown, A.S., et al., *Nonaffective psychosis after prenatal exposure to rubella*. *Am J Psychiatry*, 2000. **157**(3): p. 438-43.
138. Mednick, S.A., et al., *Adult schizophrenia following prenatal exposure to an influenza epidemic*. *Arch Gen Psychiatry*, 1988. **45**(2): p. 189-92.
139. Cannon, T.D., et al., *A prospective cohort study of genetic and perinatal influences in the etiology of schizophrenia*. *Schizophr Bull*, 2000. **26**(2): p. 351-66.
140. Rosso, I.M., et al., *Obstetric risk factors for early-onset schizophrenia in a Finnish birth cohort*. *Am J Psychiatry*, 2000. **157**(5): p. 801-7.
141. Rapoport, J.L., et al., *The neurodevelopmental model of schizophrenia: update 2005*. *Mol Psychiatry*, 2005. **10**(5): p. 434-49.
142. Li, D., D.A. Collier, and L. He, *Meta-analysis shows strong positive association of the neuregulin 1 (NRG1) gene with schizophrenia*. *Hum Mol Genet*, 2006. **15**(12): p. 1995-2002.
143. Munafo, M.R., A.S. Attwood, and J. Flint, *Neuregulin 1 genotype and schizophrenia*. *Schizophr Bull*, 2008. **34**(1): p. 9-12.
144. Munafo, M.R., et al., *Association of the NRG1 gene and schizophrenia: a meta-analysis*. *Mol Psychiatry*, 2006. **11**(6): p. 539-46.
145. Stefansson, H., et al., *Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia*. *Am J Hum Genet*, 2002. **71**(4): p. 877-92.
146. Li, T., et al., *Identification of a novel neuregulin 1 at-risk haplotype in Han schizophrenia Chinese patients, but no association with the Icelandic/Scottish risk haplotype*. *Mol Psychiatry*, 2004. **9**(7): p. 698-704.
147. Millar, J.K., et al., *Disruption of two novel genes by a translocation co-segregating with schizophrenia*. *Hum Mol Genet*, 2000. **9**(9): p. 1415-23.
148. Nicodemus, K.K., et al., *Further evidence for association between ErbB4 and schizophrenia and influence on cognitive intermediate phenotypes in healthy controls*. *Mol Psychiatry*, 2006. **11**(12): p. 1062-5.
149. Norton, N., et al., *Evidence that interaction between neuregulin 1 and its receptor erbB4 increases susceptibility to schizophrenia*. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 2006. **141B**(1): p. 96-101.
150. Petryshen, T.L., et al., *Support for involvement of neuregulin 1 in schizophrenia pathophysiology*. *Mol Psychiatry*, 2005. **10**(4): p. 366-74, 328.

151. Silberberg, G., et al., *The involvement of ErbB4 with schizophrenia: association and expression studies*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2006. **141B**(2): p. 142-8.
152. Walsh, T., et al., *Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia*. Science, 2008. **320**(5875): p. 539-43.
153. Walss-Bass, C., et al., *A novel missense mutation in the transmembrane domain of neuregulin 1 is associated with schizophrenia*. Biol Psychiatry, 2006. **60**(6): p. 548-53.
154. Kwon, O.B., et al., *Neuregulin-1 regulates LTP at CA1 hippocampal synapses through activation of dopamine D4 receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(40): p. 15587-92.
155. Neddens, J. and A. Buonanno, *Selective populations of hippocampal interneurons express ErbB4 and their number and distribution is altered in ErbB4 knockout mice*. Hippocampus, 2010. **20**(6): p. 724-44.
156. Vullhorst, D., et al., *Selective expression of ErbB4 in interneurons, but not pyramidal cells, of the rodent hippocampus*. J Neurosci, 2009. **29**(39): p. 12255-64.
157. Meyer, D. and C. Birchmeier, *Multiple essential functions of neuregulin in development*. Nature, 1995. **378**(6555): p. 386-90.
158. Tidcombe, H., et al., *Neural and mammary gland defects in ErbB4 knockout mice genetically rescued from embryonic lethality*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8281-6.
159. Nagy, A., *Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring*. Genesis, 2000. **26**(2): p. 99-109.
160. Hippenmeyer, S., et al., *A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling*. PLoS Biol, 2005. **3**(5): p. e159.
161. Gong, S., et al., *Targeting Cre recombinase to specific neuron populations with bacterial artificial chromosome constructs*. J Neurosci, 2007. **27**(37): p. 9817-23.
162. Shamir, A., et al., *The importance of the NRG-1/ErbB4 pathway for synaptic plasticity and behaviors associated with psychiatric disorders*. J Neurosci, 2012. **32**(9): p. 2988-97.
163. Fazzari, P., et al., *Control of cortical GABA circuitry development by Nrg1 and ErbB4 signalling*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1376-80.
164. Fisahn, A., et al., *Neuregulin-1 modulates hippocampal gamma oscillations: implications for schizophrenia*. Cereb Cortex, 2009. **19**(3): p. 612-8.
165. Kwon, J.S., et al., *Gamma frequency-range abnormalities to auditory stimulation in schizophrenia*. Arch Gen Psychiatry, 1999. **56**(11): p. 1001-5.
166. Wilson, T.W., et al., *Cortical gamma generators suggest abnormal auditory circuitry in early-onset psychosis*. Cereb Cortex, 2008. **18**(2): p. 371-8.
167. Abe, Y., et al., *In situ hybridization reveals developmental regulation of ErbB1-4 mRNA expression in mouse midbrain: implication of ErbB receptors for dopaminergic neurons*. Neuroscience, 2009. **161**(1): p. 95-110.
168. Steiner, H., et al., *Differential expression of ErbB3 and ErbB4 neuregulin receptors in dopamine neurons and forebrain areas of the adult rat*. Exp Neurol, 1999. **159**(2): p. 494-503.
169. Thuret, S., et al., *The neuregulin receptor, ErbB4, is not required for normal development and adult maintenance of the substantia nigra pars compacta*. J Neurochem, 2004. **91**(6): p. 1302-11.
170. Calkin, P.A. and E.M. Barnes, Jr., *gamma-Aminobutyric acid-A (GABAA) agonists down-regulate GABAA/benzodiazepine receptor polypeptides from the surface of chick cortical neurons*. J Biol Chem, 1994. **269**(2): p. 1548-53.
171. Mhatre, M.C. and M.K. Ticku, *Chronic GABA treatment downregulates the GABAA receptor alpha 2 and alpha 3 subunit mRNAs as well as polypeptide expression in primary cultured cerebral cortical neurons*. Brain Res Mol Brain Res, 1994. **24**(1-4): p. 159-65.
172. Platt, K.P., R.E. Zwartjes, and D.R. Bristow, *The effect of GABA stimulation on GABAA receptor subunit protein and mRNA expression in rat cultured cerebellar granule cells*. Br J Pharmacol, 1996. **119**(7): p. 1393-400.

173. Yu, R., P. Follesa, and M.K. Ticku, *Down-regulation of the GABA receptor subunits mRNA levels in mammalian cultured cortical neurons following chronic neurosteroid treatment*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. 41(1-2): p. 163-8.
174. Zheng, T.M., et al., *Chronic flumazenil alters GABA(A) receptor subunit mRNA expression, translation product assembly and channel function in neuronal cultures*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. 277(1): p. 525-33.
175. Gravielle, M.C., et al., *GABA induces activity dependent delayed-onset uncoupling of GABA/benzodiazepine site interactions in neocortical neurons*. J Biol Chem, 2005. 280(22): p. 20954-60.
176. Golub, M.S., S.L. Germann, and K.C. Lloyd, *Behavioral characteristics of a nervous system-specific erbB4 knock-out mouse*. Behav Brain Res, 2004. 153(1): p. 159-70.
177. Buonanno, A. and G.D. Fischbach, *Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system*. Curr Opin Neurobiol, 2001. 11(3): p. 287-96.
178. Paxinos, G. and C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates* 2005, San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
179. Paxinos, G. and K. Franklin, *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. 2 ed 2001, San Diego, CA: Elsevier Academic Press.
180. Hernandez, L., B.G. Stanley, and B.G. Hoebel, *A small, removable microdialysis probe*. Life Sci, 1986. 39(26): p. 2629-37.
181. Hernandez, L., et al., *Improvement of the temporal resolution in brain microdialysis: sampling in seconds* 2007, San Diego, CA: Academic Press.
182. Porsolt, R.D., et al., *Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments*. Eur J Pharmacol, 1978. 47(4): p. 379-91.
183. Nestler, E.J. and S.E. Hyman, *Animal models of neuropsychiatric disorders*. Nat Neurosci, 2010. 13(10): p. 1161-9.
184. Can, A., et al., *The mouse forced swim test*. J Vis Exp, 2012(59): p. e3638.
185. Lodge, D.J. and A.A. Grace, *Developmental pathology, dopamine, stress and schizophrenia*. Int J Dev Neurosci, 2011. 29(3): p. 207-13.
186. Wang, S.H., et al., *Diabetes impairs hippocampal function via advanced glycation end product mediated new neuron generation in animals with diabetes-related depression*. Toxicol Sci, 2009. 111(1): p. 72-9.
187. Samuels, B. and R. Hen, *Novelty-Suppressed Feeding in the Mouse*, in *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*, T. Gould, Editor 2011, Springer Protocols. p. 107-121.
188. Berlyne, D.E., I.D. Koenig, and T. Hirota, *Novelty, arousal, and the reinforcement of diversive exploration in the rat*. J Comp Physiol Psychol, 1966. 62(2): p. 222-6.
189. Laruelle, M. and A. Abi-Dargham, *Dopamine as the wind of the psychotic fire: new evidence from brain imaging studies*. J Psychopharmacol, 1999. 13(4): p. 358-71.
190. Laruelle, M., et al., *Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases*. Biol Psychiatry, 1999. 46(1): p. 56-72.
191. Rada, P., et al., *Monitoring gamma-aminobutyric acid in human brain and plasma microdialysates using micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence detection*. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999. 735(1): p. 1-10.
192. Benson, D.A., et al., *GenBank*. Nucleic Acids Res, 2013. 41(Database issue): p. D36-42.
193. Fort, P., et al., *Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family*. Nucleic Acids Res, 1985. 13(5): p. 1431-42.
194. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54.
195. Torregrossa, M.M., X.C. Tang, and P.W. Kalivas, *The glutamatergic projection from the prefrontal cortex to the nucleus accumbens core is required for cocaine-induced decreases in ventral pallidal GABA*. Neurosci Lett, 2008. 438(2): p. 142-5.

196. Sayin, U., W. Timmerman, and B.H. Westerink, *The significance of extracellular GABA in the substantia nigra of the rat during seizures and anticonvulsant treatments*. Brain Res, 1995. **669**(1): p. 67-72.
197. Smolders, I., et al., *Effectiveness of vigabatrin against focally evoked pilocarpine-induced seizures and concomitant changes in extracellular hippocampal and cerebellar glutamate, gamma-aminobutyric acid and dopamine levels, a microdialysis-electrocorticography study in freely moving rats*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **283**(3): p. 1239-48.
198. Benturquia, N., et al., *Simultaneous determination of vigabatrin and amino acid neurotransmitters in brain microdialysates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection*. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2004. **806**(2): p. 237-44.
199. Richens, A., *New drugs for epilepsy: a rapidly changing scene*. Acta Neurol Scand Suppl, 1992. **140**: p. 65-70.
200. Leach, J.P. and M.J. Brodie, *Tiagabine*. Lancet, 1998. **351**(9097): p. 203-7.
201. Ashton, H. and A.H. Young, *GABA-ergic drugs: exit stage left, enter stage right*. J Psychopharmacol, 2003. **17**(2): p. 174-8.
202. Mogenson, G.J. and M.A. Nielsen, *Evidence that an accumbens to subpallidal GABAergic projection contributes to locomotor activity*. Brain Res Bull, 1983. **11**(3): p. 309-14.
203. Patel, S. and P. Slater, *Effects of GABA compounds injected into the subpallidal regions of rat brain on nucleus accumbens evoked hyperactivity*. Behav Neurosci, 1988. **102**(4): p. 596-600.
204. Austin, M.C. and P.W. Kalivas, *Blockade of enkephalinergic and GABAergic mediated locomotion in the nucleus accumbens by muscimol in the ventral pallidum*. Jpn J Pharmacol, 1989. **50**(4): p. 487-90.
205. Austin, M.C. and P.W. Kalivas, *Enkephalinergic and GABAergic modulation of motor activity in the ventral pallidum*. J Pharmacol Exp Ther, 1990. **252**(3): p. 1370-7.
206. van den Bos, R. and A.R. Cools, *Motor activity and the GABA<sub>A</sub>-receptor in the ventral pallidum/substantia innominata complex*. Neurosci Lett, 1991. **124**(2): p. 246-50.
207. van den Bos, R. and A.R. Cools, *Switching to cue-directed behavior: specific for ventral striatal dopamine but not ventral pallidum/substantia innominata gaba as revealed by a swimming-test procedure in rats*. Neuroscience, 2003. **118**(4): p. 1141-9.
208. Gong, W., D. Neill, and J.B. Justice, Jr., *6-Hydroxydopamine lesion of ventral pallidum blocks acquisition of place preference conditioning to cocaine*. Brain Res, 1997. **754**(1-2): p. 103-12.
209. Bourdelais, A.J. and P.W. Kalivas, *Modulation of extracellular gamma-aminobutyric acid in the ventral pallidum using in vivo microdialysis*. J Neurochem, 1992. **58**(6): p. 2311-20.
210. Charles, K.J., et al., *Comparative immunohistochemical localisation of GABA(B1a), GABA(B1b) and GABA(B2) subunits in rat brain, spinal cord and dorsal root ganglion*. Neuroscience, 2001. **106**(3): p. 447-67.
211. Smith, K.S., et al., *Ventral pallidum roles in reward and motivation*. Behav Brain Res, 2009. **196**(2): p. 155-67.
212. Wisden, W., et al., *The distribution of 13 GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon*. J Neurosci, 1992. **12**(3): p. 1040-62.
213. Pirker, S., et al., *GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain*. Neuroscience, 2000. **101**(4): p. 815-50.
214. Schwarzer, C., et al., *Distribution of the major gamma-aminobutyric acid(A) receptor subunits in the basal ganglia and associated limbic brain areas of the adult rat*. J Comp Neurol, 2001. **433**(4): p. 526-49.
215. Calkin, P.A., B.J. Baumgartner, and E.M. Barnes, Jr., *Agonist administration in ovo down-regulates cerebellar GABA<sub>A</sub> receptors in the chick embryo*. Brain Res Mol Brain Res, 1994. **26**(1-2): p. 18-25.
216. Saxena, N.C. and R.L. Macdonald, *Assembly of GABA<sub>A</sub> receptor subunits: role of the delta subunit*. J Neurosci, 1994. **14**(11 Pt 2): p. 7077-86.

217. Saxena, N.C. and R.L. Macdonald, *Properties of putative cerebellar gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms*. Mol Pharmacol, 1996. 49(3): p. 567-79.
218. Nusser, Z., W. Sieghart, and P. Somogyi, *Segregation of different GABAA receptors to synaptic and extrasynaptic membranes of cerebellar granule cells*. J Neurosci, 1998. 18(5): p. 1693-703.
219. Mtchedlishvili, Z. and J. Kapur, *High-affinity, slowly desensitizing GABAA receptors mediate tonic inhibition in hippocampal dentate granule cells*. Mol Pharmacol, 2006. 69(2): p. 564-75.
220. Tretter, V., et al., *Targeted disruption of the GABA(A) receptor delta subunit gene leads to an up-regulation of gamma 2 subunit-containing receptors in cerebellar granule cells*. J Biol Chem, 2001. 276(13): p. 10532-8.
221. Peng, Z., et al., *GABA(A) receptor changes in delta subunit-deficient mice: altered expression of alpha4 and gamma2 subunits in the forebrain*. J Comp Neurol, 2002. 446(2): p. 179-97.
222. Peng, Z., et al., *Altered expression of the delta subunit of the GABAA receptor in a mouse model of temporal lobe epilepsy*. J Neurosci, 2004. 24(39): p. 8629-39.
223. Bianchi, M.T., K.F. Haas, and R.L. Macdonald, *Alpha1 and alpha6 subunits specify distinct desensitization, deactivation and neurosteroid modulation of GABA(A) receptors containing the delta subunit*. Neuropharmacology, 2002. 43(4): p. 492-502.
224. Feng, H.J. and R.L. Macdonald, *Multiple actions of propofol on alphabeta gamma and alphabeta delta GABAA receptors*. Mol Pharmacol, 2004. 66(6): p. 1517-24.
225. Feng, H.J., M.T. Bianchi, and R.L. Macdonald, *Pentobarbital differentially modulates alpha1beta3delta and alpha1beta3gamma2L GABAA receptor currents*. Mol Pharmacol, 2004. 66(4): p. 988-1003.
226. Feng, H.J. and R.L. Macdonald, *Proton modulation of alpha 1 beta 3 delta GABAA receptor channel gating and desensitization*. J Neurophysiol, 2004. 92(3): p. 1577-85.
227. Glykys, J., et al., *A new naturally occurring GABA(A) receptor subunit partnership with high sensitivity to ethanol*. Nat Neurosci, 2007. 10(1): p. 40-8.
228. Mogenson, G.J., D.L. Jones, and C.Y. Yim, *From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system*. Prog Neurobiol, 1980. 14(2-3): p. 69-97.
229. Mogenson, G.J. and C.R. Yang, *The contribution of basal forebrain to limbic-motor integration and the mediation of motivation to action*. Adv Exp Med Biol, 1991. 295: p. 267-90.
230. Cromwell, H.C. and K.C. Berridge, *Where does damage lead to enhanced food aversion: the ventral pallidum/substantia innominata or lateral hypothalamus?* Brain Res, 1993. 624(1-2): p. 1-10.
231. Berridge, K.C., *Food reward: brain substrates of wanting and liking*. Neurosci Biobehav Rev, 1996. 20(1): p. 1-25.
232. Wen, L., et al., *Neuregulin 1 regulates pyramidal neuron activity via ErbB4 in parvalbumin-positive interneurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(3): p. 1211-6.
233. Pijnenburg, A.J., et al., *Effects of chemical stimulation of the mesolimbic dopamine system upon locomotor activity*. Eur J Pharmacol, 1976. 35(1): p. 45-58.
234. Braff, D.L., M.A. Geyer, and N.R. Swerdlow, *Human studies of prepulse inhibition of startle: normal subjects, patient groups, and pharmacological studies*. Psychopharmacology (Berl), 2001. 156(2-3): p. 234-58.
235. Braff, D.L. and M.A. Geyer, *Sensorimotor gating and schizophrenia. Human and animal model studies*. Arch Gen Psychiatry, 1990. 47(2): p. 181-8.
236. Swerdlow, N.R., M.A. Geyer, and D.L. Braff, *Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges*. Psychopharmacology (Berl), 2001. 156(2-3): p. 194-215.
237. Gerecke, K.M., et al., *ErbB transmembrane tyrosine kinase receptors are differentially expressed throughout the adult rat central nervous system*. J Comp Neurol, 2001. 433(1): p. 86-100.
238. Hou, J., et al., *Functional integrity of ErbB-4/-2 tyrosine kinase receptor complex in the hypothalamus is required for maintaining normal reproduction in young adult female rats*. Endocrinology, 2002. 143(5): p. 1901-12.

239. Chen, Y.J., et al., *Type III neuregulin-1 is required for normal sensorimotor gating, memory-related behaviors, and corticostriatal circuit components*. J Neurosci, 2008. **28**(27): p. 6872-83.
240. Knight, R.T. and T. Nakada, *Cortico-limbic circuits and novelty: a review of EEG and blood flow data*. Rev Neurosci, 1998. **9**(1): p. 57-70.
241. Ganzel, B.L., P.A. Morris, and E. Wethington, *Allotaxis and the human brain: Integrating models of stress from the social and life sciences*. Psychol Rev, 2010. **117**(1): p. 134-74.
242. Elman, I., D. Borsook, and S.E. Lukas, *Food intake and reward mechanisms in patients with schizophrenia: implications for metabolic disturbances and treatment with second-generation antipsychotic agents*. Neuropsychopharmacology, 2006. **31**(10): p. 2091-120.
243. Benes, F.M., *Amygdalocortical circuitry in schizophrenia: from circuits to molecules*. Neuropsychopharmacology, 2010. **35**(1): p. 239-57.
244. Coyle, J.T., et al., *Beyond the dopamine receptor: novel therapeutic targets for treating schizophrenia*. Dialogues Clin Neurosci, 2010. **12**(3): p. 359-82.
245. Swerdlow, N.R., *Integrative circuit models and their implications for the pathophysiology and treatments of the schizophrenias*. Curr Top Behav Neurosci, 2010. **4**: p. 555-83.
246. Clausing, P., et al., *Individual differences in dopamine release but not rotational behavior correlate with extracellular amphetamine levels in caudate putamen in unlesioned rats*. Psychopharmacology (Berl), 1996. **127**(3): p. 187-94.
247. Yates, J.W., et al., *Bimodal effect of amphetamine on motor behaviors in C57BL/6 mice*. Neurosci Lett, 2007. **427**(1): p. 66-70.
248. Daberkow, D.P., et al., *Amphetamine paradoxically augments exocytotic dopamine release and phasic dopamine signals*. J Neurosci, 2013. **33**(2): p. 452-63.
249. Jones, S.R., et al., *Dopamine neuronal transport kinetics and effects of amphetamine*. J Neurochem, 1999. **73**(6): p. 2406-14.
250. Schmitz, Y., et al., *Amphetamine distorts stimulation-dependent dopamine overflow: effects on D2 autoreceptors, transporters, and synaptic vesicle stores*. J Neurosci, 2001. **21**(16): p. 5916-24.
251. Richfield, E.K., J.B. Penney, and A.B. Young, *Anatomical and affinity state comparisons between dopamine D1 and D2 receptors in the rat central nervous system*. Neuroscience, 1989. **30**(3): p. 767-77.
252. Angrist, B.M. and S. Gershon, *The phenomenology of experimentally induced amphetamine psychosis--preliminary observations*. Biol Psychiatry, 1970. **2**(2): p. 95-107.
253. Bramness, J.G., et al., *Amphetamine-induced psychosis--a separate diagnostic entity or primary psychosis triggered in the vulnerable? BMC Psychiatry*, 2012. **12**: p. 221.
254. Breier, A., et al., *Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(6): p. 2569-74.
255. Laruelle, M., et al., *Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9235-40.
256. Abi-Dargham, A., et al., *Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort*. Am J Psychiatry, 1998. **155**(6): p. 761-7.
257. Flagstad, P., et al., *Disruption of neurogenesis on gestational day 17 in the rat causes behavioral changes relevant to positive and negative schizophrenia symptoms and alters amphetamine-induced dopamine release in nucleus accumbens*. Neuropsychopharmacology, 2004. **29**(11): p. 2052-64.
258. Lipska, B.K., G.E. Jaskiw, and D.R. Weinberger, *Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia*. Neuropsychopharmacology, 1993. **9**(1): p. 67-75.
259. Antoniou, K., et al., *D-amphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats*. Neurosci Biobehav Rev, 1998. **23**(2): p. 189-96.

260. White, I.M., C. Whitaker, and W. White, *Amphetamine-induced hyperlocomotion in rats: Hippocampal modulation of the nucleus accumbens*. *Hippocampus*, 2006. **16**(7): p. 596-603.
261. Kuczenski, R. and D.S. Segal, *Sensitization of amphetamine-induced stereotyped behaviors during the acute response*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **288**(2): p. 699-709.
262. Bedingfield, J.B., et al., *The role of the striatum in the mouse in behavioral sensitization to amphetamine*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1997. **56**(2): p. 305-10.
263. Yurek, D.M., et al., *Supranigral injection of neuregulin1-beta induces striatal dopamine overflow*. *Brain Res*, 2004. **1028**(1): p. 116-9.
264. Vahabzadeh, A. and M. Fillenz, *Comparison of stress-induced changes in noradrenergic and serotonergic neurons in the rat hippocampus using microdialysis*. *Eur J Neurosci*, 1994. **6**(7): p. 1205-12.
265. Inoue, T., [*Effects of conditioned fear stress on monoaminergic systems in the rat brain*]. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 1993. **68**(3): p. 377-90.
266. Piekarczywska, A.B., S.J. Rosochacki, and G. Sender, *The effect of acute restraint stress on regional brain neurotransmitter levels in stress-susceptible Pietrain pigs*. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 2000. **47**(5): p. 257-69.
267. Shanks, N., et al., *Alterations of central norepinephrine, dopamine and serotonin in several strains of mice following acute stressor exposure*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1991. **38**(1): p. 69-75.
268. Zhang, X., et al., *Effects of immobilization stress on hippocampal monoamine release: modification by mivazerol, a new alpha 2-adrenoceptor agonist*. *Neuropharmacology*, 1995. **34**(12): p. 1661-72.
269. Duchesne, A., M.M. Dufresne, and R.M. Sullivan, *Sex differences in corticolimbic dopamine and serotonin systems in the rat and the effect of postnatal handling*. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009. **33**(2): p. 251-61.
270. Kim, J.J., et al., *Amygdala is critical for stress-induced modulation of hippocampal long-term potentiation and learning*. *J Neurosci*, 2001. **21**(14): p. 5222-8.
271. Kramarcy, N.R., R.L. Delanoy, and A.J. Dunn, *Footshock treatment activates catecholamine synthesis in slices of mouse brain regions*. *Brain Res*, 1984. **290**(2): p. 311-9.
272. Dunn, A.J., *Changes in plasma and brain tryptophan and brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid after footshock stress*. *Life Sci*, 1988. **42**(19): p. 1847-53.
273. Adell, A., et al., *Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress*. *J Neurochem*, 1988. **50**(6): p. 1678-81.
274. Inoue, T., K. Tsuchiya, and T. Koyama, *Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1994. **49**(4): p. 911-20.
275. Inoue, T., K. Tsuchiya, and T. Koyama, *Serotonergic activation reduces defensive freezing in the conditioned fear paradigm*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996. **53**(4): p. 825-31.
276. Krieckhaus, E.E., J.W. Donahoe, and M.A. Morgan, *Paranoid schizophrenia may be caused by dopamine hyperactivity of CA1 hippocampus*. *Biol Psychiatry*, 1992. **31**(6): p. 560-70.
277. Venables, P.H., *Hippocampal function and schizophrenia. Experimental psychological evidence*. *Ann N Y Acad Sci*, 1992. **658**: p. 111-27.
278. Stefansson, H., et al., *Neuregulin 1 in schizophrenia: out of Iceland*. *Mol Psychiatry*, 2003. **8**(7): p. 639-40.