

Alma D. Genis-Mendoza^{1,2}
R. Ileana Gallegos-Silva¹
Mavil López-Casamichana¹
Carolina López-Rubalcava³
Humberto Nicolini^{1,2}

Perfiles de expresión génica de núcleo accumbens, corteza prefrontal e hipocampo en un modelo animal de Esquizofrenia: una propuesta de genes candidatos

¹Universidad Autónoma de la Ciudad de México
D.F. México

²Instituto Nacional de Medicina Genómica
Servicios de atención psiquiátrica, Secretaría de Salud
D.F. México

³Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN
(CINVESTAV-Sede Sur) Departamento de Fármaco-biología
D.F. México.

Introducción: Se ha sugerido que la Esquizofrenia puede ser inducida por "accidentes" o lesiones durante el desarrollo temprano del cerebro del individuo, que conllevan a una reducción en las conexiones neuronales de diferentes regiones. En este trabajo, hemos evaluado las diferencias en la expresión de genes cerebrales, usando un reconocido prototipo experimental para Esquizofrenia: el modelo animal de lesión en hipocampo ventral en ratas neonatas (LHVN), respecto a animales control.

Metodología: Mediante la técnica de chips de ADN, se obtuvieron los perfiles de expresión génica de tres áreas cerebrales (núcleo accumbens, corteza prefrontal e hipocampo) de ratas macho Wistar juveniles (45 días) y adultas (90 días) sometidas o no a LHVN.

Resultados: Con base a tres criterios: 1) expresión en más de un área cerebral, 2) participación en rutas celulares relevantes para el sistema nervioso central (SNC), 3) valores de Z-score >2 (sobre-expresión) y <-2 (sub-expresión); se encontraron sobre-expresados los genes: *ppp3cb*, *dctn1*, *jag1*, *ide*, *limk2* y *cpz*, y sub-expresados: *chrna4* y *sod1*.

Conclusiones: Dos de los genes propuestos en este trabajo: *limk2* y *cpz*, no han sido relacionados previamente con Esquizofrenia, por lo que se hará necesario realizar estudios futuros para dilucidar sus respectivas contribuciones en la etiopatogenia de esta enfermedad.

Palabras clave: Esquizofrenia, Modelo animal, Microarreglos, Expresión, Genes candidatos

Actas Esp Psiquiatr 2013;41(3):154-63

Correspondencia:

Humberto Nicolini, M.D., PhD.
Carracci Medical Group, Carracci 107
Insurgentes Extremadura
México D.F., 13740, México.
Tel.: (5255)5611-3028
Fax: (5255)5611-3028,
Correo electrónico: nicolini_humberto@yahoo.com

Gene expression profiles of nucleus accumbens, prefrontal cortex and hippocampus in an animal model of schizophrenia: proposed candidate genes

Introduction: It has been suggested that schizophrenia may be induced by "accidents" or injuries that occur during early brain development and result in a reduction of the neural connections in different regions. In this study, we evaluated differences in the expression of brain genes using a recognized experimental prototype of schizophrenia: the animal model of ventral hippocampal lesion in neonate rats (VHLN) compared to control animals.

Methods: Using microarray technology, we obtained gene expression profiles of three brain areas (nucleus accumbens, prefrontal cortex and hippocampus) of juvenile (45 days) and adult (90 days) Wistar male rats that underwent either VHLN or sham VHLN.

Results: Based on three criteria: 1) expression in more than one brain area, 2) participation in cellular pathways relevant to the central nervous system (CNS), and 3) Z-score values >2 (overexpression) and <-2 (underexpression), we found overexpression of the *ppp3cb*, *dctn1*, *jag1*, *ide*, *limk2* and *cpz* genes and underexpression of *chrna4* and *sod1*.

Conclusions: Two of the genes proposed in this paper, *limk2* and *cpz*, have not been previously associated with schizophrenia, so future studies will be necessary to understand their possible role in the pathogenesis of this disease.

Keywords: Schizophrenia, Animal model, Microarrays, Expression, Candidate genes

INTRODUCCIÓN

La Esquizofrenia es un grave trastorno mental que afecta 1 de cada 100 personas en el mundo y se caracteriza por distorsión de los pensamientos y percepciones, probablemente, debido a alteraciones en los diferentes sistemas de neurotransmisión^{1,2}. Varias hipótesis han tratado de explicar la etiopatogenia de esta enfermedad, siendo la más importante el componente genético³. Sin embargo, debido a la no disponibilidad de tejidos cerebrales de pacientes y controles sanos para este tipo de estudios, se ha recurrido al uso de modelos experimentales animales^{4,5}.

La implementación y empleo de modelos animales en psiquiatría tiene claras limitaciones, ya que se trata de reproducir en un animal sano, conductas humanas complejas⁴⁻⁶. No obstante, los modelos animales de trastornos psiquiátricos han permitido explorar el potencial terapéutico de medicamentos específicos en el tratamiento de estos padecimientos, así como obtener datos relevantes de los mecanismos de acción de dichos fármacos, siendo también herramientas valiosas para la determinación de los sustratos neurobiológicos en los trastornos psiquiátricos⁷. Para el estudio de la esquizofrenia se han propuesto varios modelos animales, los modelos farmacológicos (donde se utilizan fenilciclidinas (PCP) o la ketamina)⁸⁻¹⁰, los modelos genéticos (inducidos por mutaciones o deleciones genéticas)¹¹⁻¹³ y los modelos de neurodesarrollo (inducidos por una lesión física o neurotóxica y por factores ambientales durante el neurodesarrollo)¹⁴⁻¹⁶.

Se ha sugerido que la Esquizofrenia puede deberse a "lesiones" que ocurren durante el desarrollo cerebral temprano del individuo, que traen como consecuencia una reducción en las conexiones neuronales en diferentes regiones límbicas y corteza pre-frontal¹⁴.

El modelo LHVN ha sido ampliamente ensayado, en éste se produce una pequeña lesión excito-tóxica en el hipocampo del cerebro inmaduro de ratas neonatas, dando oportunidad a su posterior maduración. Se ha visto que en la etapa adulta, los animales lesionados presentan conductas relacionadas con los síntomas positivos y negativos de la enfermedad, como hiper-locomoción, reducción en la inhibición por pre-pulso, déficit de memoria y decremento en la interacción social entre otras^{15,16}.

Los microarreglos de ADN son una valiosa herramienta genómica que permite el abordaje de enfermedades complejas y facilita la evaluación global de la expresión de un gran número de genes en diferentes tejidos y/o condiciones fisiológicas¹⁷. Usando esta metodología, nosotros obtuvimos los perfiles de expresión génica para tres diferentes áreas cerebrales (hipocampo, corteza pre-frontal y núcleo accumbens) de ratas macho Wistar, con lesión neonatal en hipocampo ventral (LHVN) a los 45 y 90 días. Dichos perfiles fueron comparados con los de animales falsamente lesionados,

considerados controles negativos de la enfermedad (*sham*), con el fin de detectar cambios significativos en la expresión de genes que pudieran estar relacionados con el fenotipo de la Esquizofrenia, tanto en las ratas juveniles como en las adultas.

METODOLOGÍA

Material biológico

El estudio partió de veinte ratas macho de la cepa Wistar, provenientes de camadas de ratas preñadas en el laboratorio en aislamiento individual que fueron sometidas a ciclo invertido luz-oscuridad de 12h. La muestra total fue dividida en cuatro grupos: a) 5 ratas LHVN-juveniles, b) 5 ratas falsamente lesionadas (*sham*) juveniles, c) 5 ratas LHVN-adulto, d) 5 ratas falsamente lesionadas (*sham*) adultas. Todos los experimentos se realizaron siguiendo las regulaciones establecidas en la norma oficial mexicana para el uso y el cuidado de los animales de laboratorio "NOM-062-ZOO-1999", así como las regulaciones del comité de ética de la asociación internacional para el estudio del dolor¹⁸.

Los neonatos (10-13 g de peso) fueron lesionados entre los días 5 y 7; las crías fueron asignadas aleatoriamente tanto para la realización de la lesión con ácido iboténico, como para la lesión con PBS (*sham*). Los animales fueron anestesiados por hipotermia, colocándolos en hielo durante 10-15 minutos. Para la realización de las lesiones bilaterales, los animales fueron sujetos a la plataforma fija del este-reotáxico de Kopf, se realizó una incisión en la piel del cráneo y se administró, ácido iboténico (0.15 µl/min por 2 min) (Sigma) o PBS para *sham* a través de una aguja, de acuerdo a las siguientes coordenadas: (AP) -2.5 anteroposterior, ±2.5 medio-lateral y dorso-ventral (DV) -3.3, respecto a Bregma¹⁹.

Los animales fueron sacrificadas por decapitación a los 45 días (grupo juveniles: LHVN y *sham*) y a los 90 días (grupo adultos: LHVN y *sham*). El hipocampo, la corteza prefrontal y el núcleo accumbens fueron disectados de acuerdo a un procedimiento previamente estandarizado²⁰ y congelados a -80°C hasta la extracción del ARN.

Extracción de ARN

El ARN fue extraído a partir de las 3 áreas de cerebro previamente disectadas, usando TRIZOL (*Life Technologies*) y según las instrucciones del fabricante.

Diseño, lectura y normalización del microarreglo

Se utilizaron cinco mil oligos de *Rattus norvegicus* de la biblioteca Operon Oligosets (http://www.operon.com/arrays/oligosets_overview.php). El diseño y manufactura del

Tabla 1 En la primera parte se muestra el número de genes que no cambiaron su expresión. En la parte de abajo se muestra el número de genes que cambiaron significativamente su expresión después de la normalización. (Alma D. Genis-Mendoza)

| | Juveniles | | Adultos | |
|--|------------------|-------|------------------|-------|
| | Genes sin cambio | % | Genes sin cambio | % |
| | 4348 | 86.95 | 4331 | 86.61 |

| | JUVENILES | | | | | ADULTOS | | | | |
|---------------|-----------|------|-----|------|-----------|---------|------|-----|------|-----------|
| | Down | % | Up | % | Total (%) | Down | % | Up | % | Total (%) |
| N. ACCUMBENS | 326 | 6.52 | 317 | 6.34 | 12.86 | 351 | 7.02 | 291 | 5.82 | 12.83 |
| C. PREFRONTAL | 362 | 7.24 | 302 | 6.04 | 13.28 | 372 | 7.44 | 310 | 6.20 | 13.64 |
| HIPOCAMPO | 321 | 6.42 | 329 | 6.58 | 13.00 | 351 | 7.02 | 333 | 6.66 | 13.68 |

microarreglo fue realizado en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM²¹.

Para la hibridación de los microarreglos se partió de 10 µg de ARN total, a partir del cual se generó ADNc marcado con dUTP-Cy3 o dUTP-Cy5 mediante el kit CyScribe First-Strand cDNA (Amersham). La incorporación del fluoróforo se corroboró por la lectura de las absorbancias a 555 nm para Cy3 y a 655 nm para Cy5²¹.

La adquisición y cuantificación de las señales e imágenes se realizó con el equipo ScanArray 4000, con el auxilio del software ScanArray 4000 (Packard BioChips). Todas las imágenes fueron capturadas utilizando el 65% de ganancia PMT, 70 a 75% de potencia láser y resolución de 10 µm en velocidad de barrido del 50%. Para cada punto marcado con Cy3 o Cy5, se calcularon la densidad promedio y el valor medio de fondo, con el software *Array Pro-Analyzer* (Cibernetics)²¹. El análisis de la expresión de genes fue realizado con el programa estadístico genArise, desarrollado en la Unidad de Informática del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (<http://www.ifc.unam.mx/genarise/>) para evaluar el grado de variación en la expresión génica (z-score). Con ese criterio, los genes con un valor de z-score mayor o menor a dos desviaciones estándar, fueron los que se consideraron expresados diferencialmente²¹.

RESULTADOS

Posterior a la normalización, nuestro análisis identificó 652 genes que cambiaron significativamente su expresión, de los cuales 316 se encontraron sobre-expresados (OE) y 336 sub-expresados (UE). Se pudo observar que el porcentaje de genes OE y UE para ratas jóvenes fue casi el mismo (alrededor de 6.5%), mientras que para las ratas adultas el porcentaje de genes UE (7%) fue ligeramente mayor al porcentaje de genes OE (6%). Sin embargo, globalmente el porcentaje de genes que modularon su expresión para cada tejido se mantuvo en 13%±0.38 (Tabla 1). Los genes se ordenaron en 3 grupos de acuerdo a los valores z-score (>1

y <-1, >2 y <-2, >3 y <-3). Posteriormente, para saber en qué rutas metabólicas y de señalización participa cada una de las proteínas codificadas por estos genes, se accedió a la base de datos de rutas metabólicas KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/kegg2.html>), que constituye una herramienta de mapeo genómico.

Grupo de genes con valor de z-score >1 y <-1

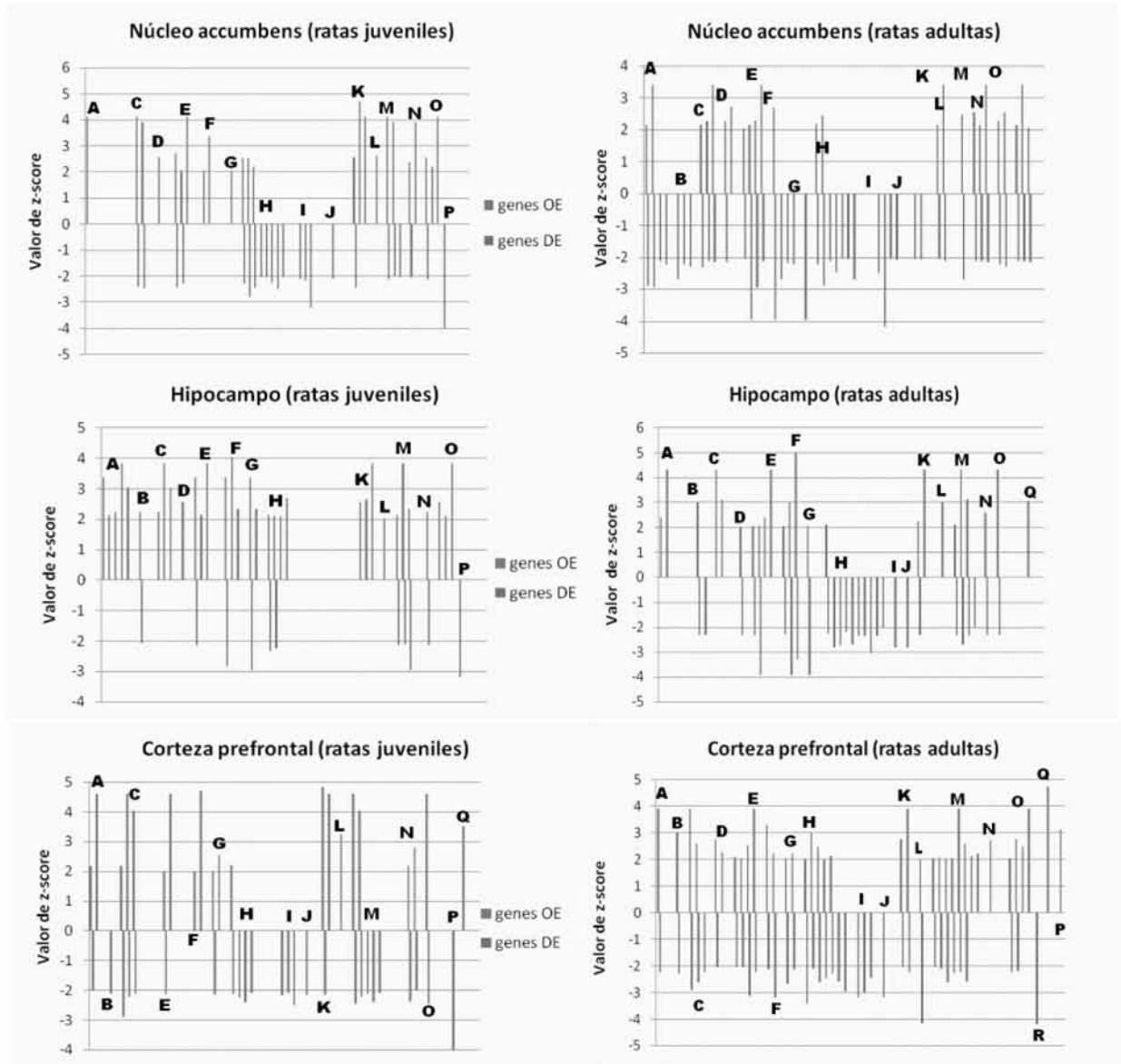
En esta etapa se obtuvo información general, tanto para los genes sobre-expresados y sub-expresados se elaboró un listado con todas las rutas metabólicas para cada área cerebral y el número de genes involucrados. Posteriormente, se seleccionaron y graficaron las rutas en las se modularon un mayor número de genes (más de 5 genes). Entre las rutas más comprometidas se encontraron: interacción neuroactiva ligando-receptor (>10 genes), señalización de calcio (>7 genes) y cáncer (>7 genes). Cabe mencionar que hubo genes cuya modulación fue significativa para 2 o más vías.

Grupo de genes con valor de z-score >2 y <-2

Para un análisis más robusto se trabajó con los genes cuyos valores de z-score fueran mayores a 2 y menores a -2, para cada tejido. Asimismo, se seleccionaron 18 vías asociadas a trastornos mentales. Para cada tejido se graficaron las rutas metabólicas de interés y los genes participantes de acuerdo a su valor z-score (Figura 1).

Debido a que un mismo gen puede estar expresándose en dos o más de las áreas cerebrales evaluadas (núcleo accumbens, corteza prefrontal e hipocampo) y con el objeto de acotar nuestro análisis, buscamos aquellos genes que se expresaron en más de una de las áreas de interés. Como se puede observar en la Figura 2, tanto en el grupo juvenil como en el grupo de adultos, se regula coincidentemente la expresión de ciertos genes en más de un tejido. Encontramos un mayor número de genes sub-expresados, en comparación con los

z-score > 2 y < -2

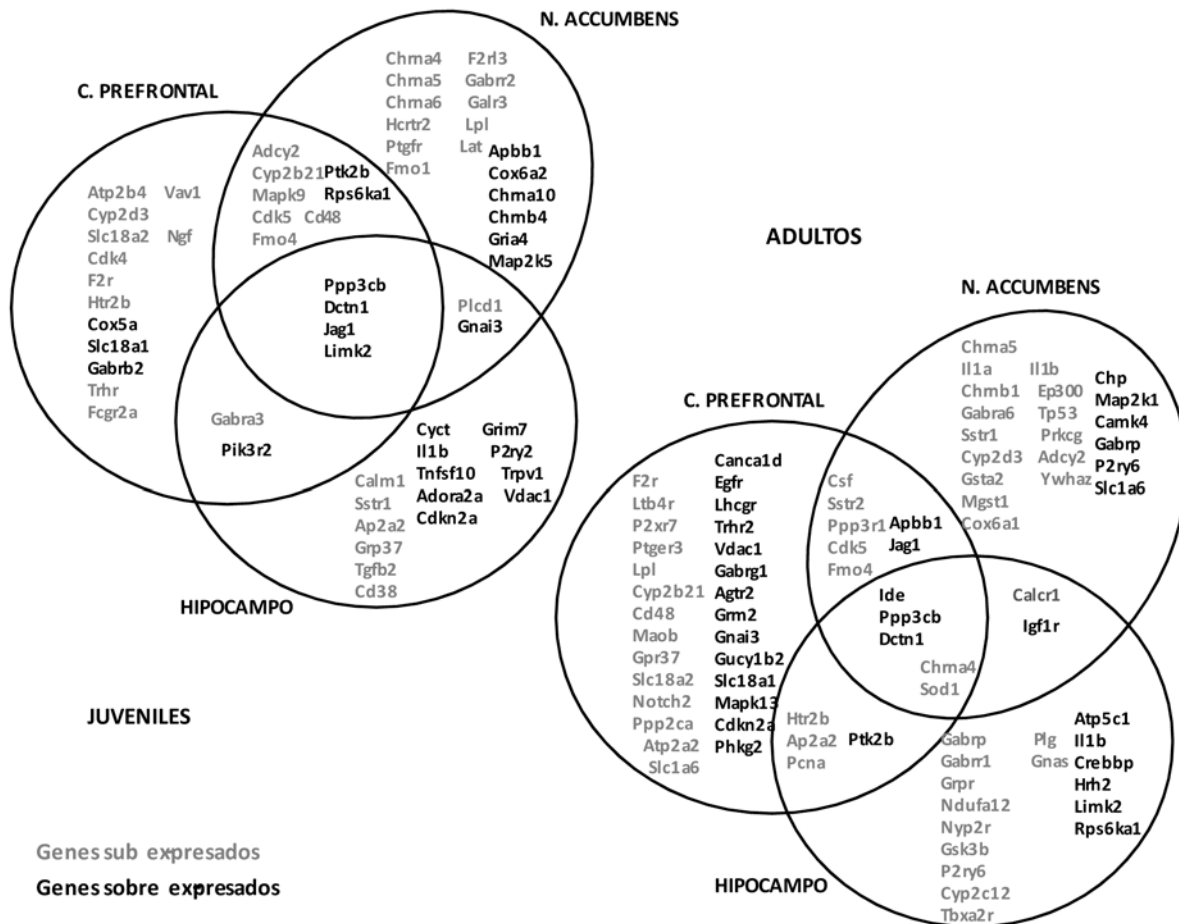


- A) Apoptosis
- B) Ciclo celular
- C) Citotoxicidad mediada por NK
- D) Depresión a largo plazo
- E) Alzheimer
- F) Huntington
- G) Parkinson
- H) Interacción neuroactiva ligando- receptor
- I) Metabolismo de drogas Cyt-P450
- J) Metabolismo de Xenobióticos Cyt-P450

- K) Orientación del axón
- L) Vía de señalización Notch
- M) Vía de señalización de calcio
- N) Vía de señalización de neurotrofina
- O) Sinapsis glutamatèrgica
- P) Diferenciación y función neuronal
- Q) Respuesta neuroendócrina y comportamiento
- R) Plasticidad neuronal

Figura 1

Las gráficas muestran el número de genes sobre-expresados y sub-expresados que participan en las rutas de interés, en el grupo de ratas juveniles y adultas. Cada gen esta graficado con respecto a su valor de Z-score



N: núcleo acúmbens, P: corteza prefrontal, H: hipocampo

Figura 2

Se muestran los genes candidatos que se obtuvieron a partir de los siguientes tres criterios: 1) valores de Z-score >2 ; <-2 expresión en más de un área cerebral, y 3) participación en rutas metabólicas relevantes de sistema nervioso central

genes sobre-expresados, siendo el grupo de ratas adultas el que presentó mayor número de genes sub-expresados. Distintivamente, entre los genes sobre-expresados, *ppp3cb* y *dctn1* modularon su expresión en las tres áreas cerebrales y en ambas etapas (juvenil y adulta).

Grupo de genes con valor de z-score >3 y <-3

Por último, se realizó el análisis para los genes que presentaron mayores cambios de expresión respecto a su grupo control. Igualmente, se detectaron genes que modularon su expresión en más de un tejido. De todos ellos, *ppp3cb* siguió variando su expresión en las tres áreas cerebrales y en ambos grupos. En ésta categoría encontramos un gen más, el *cpz* con un z-score alto (4.37).

Finalmente, tomando en cuenta estos valores de z-score, la expresión en más de una área y la participación en las

rutas metabólicas de interés, se proponen 8 genes candidatos para el estudio de la Esquizofrenia. En la tabla 2 se muestran los resultados de los valores de z-score para los genes propuestos, como se puede observar: *ppp3cb* y *dctn1* tienen los valores de z-score más altos en las tres áreas evaluadas.

DISCUSIÓN

Mediante la técnica de microarreglos, se evaluó la expresión de genes en distintas regiones del cerebro usando el modelo animal de LNHV para Esquizofrenia. Se trabajaron 4 grupos experimentales de ratas machos de la cepa Wistar: ratas juveniles lesionadas, ratas juveniles falsamente lesionadas (*sham*), ratas adultas lesionadas y ratas adultas falsamente lesionadas (*sham*). El análisis se dividió en 3 grupos, según el valor de z-score (>1 y <-1 , >2 y <-2 , >3 y <-3). No todas las rutas observadas se asociaron directamente a trastornos mentales, por lo que, distinguimos 18 vías relevantes

Tabla 2

Genes propuestos como candidatos seleccionados a partir de los siguientes 3 criterios: I) valores de score >2 y <-2 , II) expresión en más de un área cerebral, III) participación en rutas de interés. Se muestra el símbolo del gen, el nombre, la descripción biológica y los valores de z-score en adultos de cada tejido. Núcleo accumbens (N), corteza prefrontal (P), hipocampo (H)

| Símbolo | Nombre | Descripción | Score A | Score P | Score H |
|---------------|---|--|---------|---------|---------|
| Limk2 | Cinasa 2 con dominio LIM | Las proteínas con dominios LIM están involucradas en diversos procesos de señalización celular como; la organización del citoesqueleto, la organogénesis, el ciclo celular | 4.710 | 4.834 | 2.659 |
| Ppp3cb | Proteína fosfatasa 3, subunidad catalítica, isoforma beta | Proteína fosfatasa dependiente de calmodulina; desfosforila factores nucleares de células T activadas, puede jugar un papel durante la atrofia del músculo esquelético | 4.130 | 4.600 | 3.846 |
| Dctn1 | Dinactina 1 | Componente de los microtúbulos de dineína activada por ATPasa, que actúa como un motor de microtúbulos | 3.378 | 4.717 | 4.042 |
| Jag1 | Jagged 1 | Ligando responsable de la activación del receptor Notch1. La señalización por medio de <i>notch</i> está involucrada en el desarrollo de la mayoría de los tejidos | 2.625 | 3.254 | 2.036 |
| Ide | Enzima degradadora de insulina | Enzima involucrada en la degradación de péptidos bioactivos incluyendo insulina, beta-endorfina, péptido natriurético auricular y beta-amiloide | 2.292 | 2.531 | 2.052 |
| Sod1 | Superóxido dismutasa 1, soluble | Cataliza la conversión de superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular, implicados en la respuesta al estrés oxidativo | -2.193 | -3.187 | -3.301 |
| Chrna4 | Receptor colinérgico, nicotínico alfa-4 | Pertenece a la superfamilia de canales iónicos activados por ligando que juegan un papel en la transmisión rápida de las señales en las sinapsis | -2.909 | -3.420 | -2.814 |

para el SNC (genes con z-score >2 y <-2). Por último, se contemplaron los genes con valores de z-score >3 y <-3 para revelar los candidatos de interés con mayores variaciones en su expresión.

Grupo de genes con z-score >1 y <-1

En este grupo encontramos un gran número de rutas metabólicas y de señalización que se encontraron diferencialmente alteradas en las tres áreas cerebrales. Las vías con mayor número de genes modulados fueron: cáncer, interacción neuroactiva ligando-receptor y señalización de calcio; estas dos últimas resultaron de nuestro interés.

Grupo de genes con z-score >2 y <-2

En este corte se detectaron 7 genes de interés que modificaron su expresión en las tres áreas cerebrales y cuyas ontologías estaban relacionadas con las vías de interés. Las rutas de señalización de calcio e interacción neuroactiva ligando-receptor siguieron contribuyendo con una gran cantidad de genes diferencialmente expresados, mientras

que las vías: diferenciación y función neuronal, respuesta neuroendocrina y comportamiento, tuvieron un menor participación. Cabe señalar que en la mayoría de las rutas hubo genes sobre-expresados y sub-expresados, excepto en la ruta de metabolismo de drogas y xenobióticos por Cyt-P450, donde sólo encontramos genes sub-expresados (Figura 1).

Grupo de genes con z-score >3 y <-3

Finalmente, este análisis nos permite proponer 8 genes como candidatos potenciales para el abordaje genético de la Esquizofrenia. Seis de ellos (*ppp3cb*, *dctn1*, *ide*, *limk2*, *jag1* y *cpz*) se hallaron sobre-expresados, mientras que los dos restantes (*sod1* y *chrna4*) se encontraron sub-expresados (Tabla 2).

Dentro de los genes con valores de z-score más altos sobresalió *ppp3cb* (Tabla 2), que se sobre-expresó en el grupo de ratas juveniles y adultas. Este codifica la subunidad catalítica de la isoforma β de la proteína fosfatasa 3. Dicha enzima interactúa de forma selectiva y no covalente con la calmodulina, en respuesta al incremento en los niveles de calcio intracelular²². Recientemente, un estudio genómico en

familias taiwanesas con Esquizofrenia sugirió la vinculación del *locus10q22.3*, donde están ubicados los genes *anxa7*, *dnajc9*, *zmynd17* y *pppp3cb*, mismos que los asocian con la Esquizofrenia y problemas de déficit cognitivo y de atención²³. De la misma forma, se realizó un meta-análisis que evaluó todo el genoma de individuos afectados con Esquizofrenia en diversas poblaciones. Entre los genes propuestos como candidatos se encuentra, *ppp3cc* que codifica para la isoforma gamma de la enzima calcineurina. Así como otros genes también asociados fueron: *nos1ap*, *rgs4*, *uhmk1*, *nrg1* y *znf804a* entre otros²⁴.

Por otra parte, el gen *dctn1* humano codifica la subunidad mayor p150 de la dinactina, un complejo macromolecular que consta de 10 polipéptidos, necesario para el transporte axonal retrógrado de vesículas y organelos celulares por el sistema microtubular. Numerosos estudios han mostrado el papel de p150 en desórdenes psicóticos asociados a delirios y alucinaciones²⁵ y neurodegenerativos, como la enfermedad de Huntington²⁶ y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA)²⁷.

La regulación diferencial en los niveles de los transcritos de *ppp3cb* y *dctn1* se hizo notoria tanto en el grupo de ratas juveniles como adultas (valores de z-score >3), lo cual apunta a que posiblemente ambos contribuyan desde la aparición de los primeros síntomas psicóticos.

Otro de los genes que se sobre-expresó con un z-score alto en las tres áreas de cerebro estudiadas, fue *ide* que codifica la enzima degradadora de insulina (Ide) (Tabla 2). Este gen se ubica en el *locus10q23-q25*, previamente asociado con Esquizofrenia²⁸ y codifica una metalopeptidasa dependiente de zinc que degrada insulina, glucagón, β -amiloide, β -endorfina e IGF-I y II. El déficit en la expresión de esta enzima ha sido asociado con la enfermedad de Alzheimer y con Diabetes Mellitus tipo 2^{29,30}. Asimismo se ha sugerido que el haloperidol podría ejercer algún efecto sobre la actividad de Ide, a través de cambios en los niveles de expresión de sus sustratos²⁸. Sin embargo, debido a que nuestros datos revelan un incremento significativo de *ide*, es posible que la regulación tanto de los niveles como de la actividad de esta enzima se esté dando post-transcripcionalmente, tal y como se ha descrito en otros miembros de la familia de las metalopeptidasas³¹.

Otro de los transcritos abundantemente expresados en este estudio fue *jag1*. La proteína resultante es el ligando de Notch 1, un receptor transmembranal que se activa antes de nacer e induce la diferenciación glía-radial³², y después del nacimiento promueve la diferenciación de células progenitoras a células de sostén de tipo astrogliá³³. En pacientes con Esquizofrenia recientemente se evidenció que la expresión de *jag1* fue significativamente mayor, exhibiéndose una correlación positiva con los mediadores canónicos de la vía Notch, la cual tiene influencia sobre la proliferación y el ciclo celular, además de participar en la síntesis de oligodendrocitos^{34,35}. Nosotros observamos la sobre-expresión de *jag1* sólo

en el grupo de ratas juveniles. A este respecto podríamos especular, que esta sobre-expresión podría ser reflejo de la activación de esta vía con vistas a promover la neurogénesis en respuesta al daño causado por la lesión neonatal, reactivándose así el desarrollo neuronal de los animales.

El gen *chrna4* que codifica para un receptor nicotínico de acetilcolina perteneciente a la superfamilia de canales iónicos, se encontró sub-expresado en los animales adultos. Como es bien sabido, esta clase de receptores juega un papel trascendental en la transmisión de las señales nerviosas en las sinapsis neuronales. Se ha sugerido que la disfunción colinérgica-nicotínica puede contribuir al deterioro cognitivo en la Esquizofrenia, mediando la liberación de dopamina. Además, se ha visto que los déficits neurocognitivos en la Esquizofrenia pueden ser remediados temporalmente por la administración de nicotina^{36,37}, por lo que desde entonces varios subtipos de receptores nicotínicos han sido considerados como candidatos asociados con esta enfermedad^{37,38}.

Otro candidato potencial para su estudio en la Esquizofrenia es *sod1*, que encontramos sub-expresado significativamente en ratas adultas. La proteína superóxido dismutasa 1 codificada por este gen, es una de dos isoenzimas humanas responsables de la destrucción de los radicales libres superóxido en las células. Las mutaciones en este gen han sido asociadas con ELA familiar²⁷. Una disminución en la expresión de la enzima superóxido dismutasa 1 puede potenciar el estrés oxidativo debido a una mayor vulnerabilidad de las células neuronales a los radicales libres, lo cual es congruente con el daño cerebral reportado en los pacientes con Esquizofrenia³⁹.

Distintivamente, los dos genes sub-expresados: *sod1* y *chrna4*, sólo disminuyeron sus niveles en el grupo de ratas adultas, lo cual indica que estos cambios pudieran estar asociados con los síntomas positivos y negativos de la Esquizofrenia.

Por otro lado, nuestros hallazgos arrojaron que *limk2* se sobre-expresó en las ratas del grupo juvenil. Los genes LIM codifican un grupo de proteínas cinasas involucradas en diversas funciones biológicas. A pesar de que *limk2* no se ha asociado con Esquizofrenia, se le ha relacionado con apoptosis, como proteína de protección a isquemia en un modelo de diabetes en rata^{40,29} y, en un modelo animal para Alzheimer, se observó degeneración de las estructuras sinápticas con aumento en la expresión de *limk2*⁴¹. Se sabe que LIMK2 es fosforilada y activada por cinasas ROCK, y de esta manera fosforila a la cofilina, proteína que evita la polimerización de actina y favorece la despolimerización, necesarias para la motilidad celular⁴². Un aumento en la expresión de *limk2* podría estar perturbando la dinámica del citoesqueleto debido a fallas en la regulación de la actina, lo cual tendría implicaciones negativas en la migración neuronal temprana de las ratas juveniles lesionadas, en concordancia con nuestro modelo de Esquizofrenia.

Finalmente, en el grupo de ratas jóvenes y adultas encontramos sobre-expresado al gen de carboxipeptidasa Z (*cpz*). La proteína posee un dominio N-terminal con un 30% de identidad aminoacídica con el dominio "frizzled" (Fzd), presente en las proteínas que interactúan con Wnt^{43,44}. La carboxipeptidasa Z, abunda en la matriz extracelular de la placenta y se encuentra en menores cantidades en cerebro, pulmón, timo y riñón³⁸. Esta proteína nunca antes había sido asociada a la Esquizofrenia; por el contrario, otra enzima de esta familia, la glutamato carboxipeptidasa II (GCP II) ha sido relacionada con trastornos mentales, entre los que figura la Esquizofrenia⁴⁵.

Aun cuando la función exacta de CPZ se desconoce, es probable que juegue un papel en la regulación del desarrollo embrionario a través de su interacción con proteínas Wnt. Además, se ha descrito que la expresión de CPZ en los tejidos adultos es mucho menor que en los órganos embrionarios⁴⁶. A su vez, en cultivos de neuronas de hipocampo, se ha visto que la señalización mediada por Wnt es transcendental para el desarrollo y la orientación axonal⁴⁶, regula la dinámica del citoesqueleto en el crecimiento del cono axonal y en la ramificación⁴⁷ y conduce a un incremento en la formación y organización de nuevas terminales presinápticas^{48,49}.

Nuestro estudio mostró que el gen *cpz* no se apagó luego del desarrollo embrionario y continuó sobre-expresándose en las ratas adultas lesionadas. Si esta proteína permanece altamente expresada en el cerebro adulto, es muy probable que exista una desregulación de la señalización mediada por Wnt.

Hasta la fecha, los genes *limk2* y *cpz* nunca antes habían sido asociados con la Esquizofrenia y, debido a su significativa sobre-expresión en nuestro modelo de estudio, es de augurar jueguen un papel transcendental en el desarrollo y curso de la misma. Sin lugar a dudas, futuras investigaciones y nuevas estrategias experimentales deberán ser diseñadas con el objeto de dilucidar la contribución de las proteínas LIMK2 y CPZ en esta enfermedad y establecer su papel como potenciales biomarcadores.

Con respecto a las tres áreas cerebrales valoradas (núcleo accumbens, hipocampo y corteza prefrontal), en el grupo de animales lesionados se observó una reducción considerable del número de genes regulados, en comparación con el grupo de animales falsamente lesionados o *sham*. Esto es congruente con el deterioro cognitivo que se ha observado en los cerebros de pacientes con Esquizofrenia, donde se ha evidenciado deterioro y/o daño neuronal en hipocampo y en corteza prefrontal⁵⁰. Dado el deterioro cognitivo que manifiestan los pacientes con Esquizofrenia, es posible que el daño en la corteza prefrontal sí se observe a largo plazo, lo cual es a su vez congruente con el modelo animal de Esquizofrenia LHVN que se sustenta en la hipótesis del neurodesarrollo, y que va de la mano de una lesión cerebral temprana en edad prenatal^{51,52} y de una afectación de la morfogénesis

de la región cortical-dorso-lateral⁵³. Además, nuestros hallazgos proyectan la posibilidad de que la maduración de los circuitos inhibitorios locales dentro de la corteza prefrontal pudieran estar alterados en ratas con lesión en hipocampo, tal y como lo ha reportado en un trabajo previo⁵⁴.

Una limitante en el presente estudio: la evaluación de los perfiles de expresión génica fue mediante el chip de ADN 5k, diseñado por el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, sabemos que actualmente en el mercado se encuentran disponibles chips de ADN de última generación que consideran más genes y otras características, los análisis con este tipo de chips pudieran proponer otros genes que nosotros con éste, no observamos. Sin embargo creemos que nuestros hallazgos son relevantes pues se observó la modulación de algunos genes ya antes relacionados con la Esquizofrenia, así como dos genes hasta ahora no vinculados, que podrían jugar un papel importante en la enfermedad.

CONCLUSIONES

Con este trabajo se evidencia que el transcriptoma de ratas jóvenes y adultas con LHVN se modificó diferencialmente respecto al del grupo control, y se reporta sobre-expresión y sub-expresión significativa de varios genes, previamente asociados o no con Esquizofrenia. Nuestro aporte en este sentido consiste en proponer 8 genes candidatos potenciales para su análisis en este trastorno, dos de los cuales no habían sido asociados previamente con este padecimiento (*limk2* y *cpz*). Estos hallazgos inéditos, abren nuevas interrogantes y amplían el panorama de futuras investigaciones a nivel funcional, tanto en modelos animales como en el humano, que permitan establecer biomarcadores moleculares de diagnóstico confiables en Esquizofrenia.

AGRADECIMIENTOS

Isabel Beltrán, Dr. Jorge Ramírez y su equipo: Lorena Chávez González, Simón Guzmán León y José Luis Santillán Torres por su asistencia técnica en las determinaciones de los microarreglos. Gerardo Coello, Gustavo Corral y Ana Patricia Gómez por su asistencia en el software genArise.

BIBLIOGRAFIA

1. Quintero J, Barbudo del Cura E, López-Ibor MI, López-Ibor JJ. La evolución del concepto de Esquizofrenia Resistente al Tratamiento. *Actas Esp Psiquiatr*. 2011;39(4):236-50.
2. <http://www.imss.gob.mx>
3. Ripke S, Sanders AR, Kendler KS, Levinson DF, Sklar P, Holmans PA, et al. Genome-wide association study identifies five new schizophrenia loci. *Nat Genet*. 2011;43(10):969-76.
4. Ulloa RE, Nicolini H, Fernández-Guasti A. Age differences in an animal model of obsessive-compulsive disorder: participation of dopamine: dopamine in an animal model of OCD. *Pharmacol Biochem Behav*. 2004;78(4):661-6.

5. Ulloa RE, Nicolini H, Fernández-Guasti A. Sex differences on spontaneous alternation in prepubertal rats: implications for an animal model of obsessive-compulsive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2004;28(4):687-92.
6. Fernández-Guasti A, Ulloa RE, Nicolini H. Age differences in the sensitivity to clomipramine in an animal model of obsessive-compulsive disorder. *Psychopharmacology (Berl)*. 2003;166(3):195-201.
7. Ulloa RE, Nicolini H, Avila M, Fernández-Guasti A. Age onset subtypes of obsessive compulsive disorder: differences in clinical response to treatment with clomipramine. *J Child Adolesc Psychopharmacol*. 2007;17(1):85-96.
8. Olszewski RT, Janczura KJ, Ball SR, Madore JC, Lavin KM, Lee JC, et al. NAAg peptidase inhibitors block cognitive deficit induced by MK-801 and motor activation induced by d-amphetamine in animal models of schizophrenia. *Transl Psychiatry*. 2012;31(2):145.
9. Chatterjee M, Verma R, Ganguly S, Palit G. Neurochemical and molecular characterization of ketamine-induced experimental psychosis model in mice. *Neuropharmacology*. 2012;63(6):1161-71.
10. Zuo D, Bzdega T, Olszewski RT, Moffett JR, Neale JH. Effects of N-acetylaspartylglutamate (NAAg) peptidase inhibition on release of glutamate and dopamine in prefrontal cortex and nucleus accumbens in phencyclidine model of schizophrenia. *J Biol Chem*. 2012;287(26):21773-82.
11. Nakajima M, Mori H, Nishikawa C, Tsuruta M, Okuyama S, Furukawa Y. Psychiatric disorder-related abnormal behavior and habenulointerpeduncular pathway defects in Wnt1-cre and Wnt1-GAL4 double transgenic mice. *J Neurochem*. 2013;124(2):241-9.
12. Haque FN, Lipina TV, Roder JC, Wong AH. Social defeat interacts with Disc1 mutations in the mouse to affect behavior. *Behav Brain Res*. 2012;233(2):337-44.
13. Marongiu MF, Poddie D, Porcu S, Manchinu MF, Castelli MP, Sogos V, et al. Reversible disruption of pre-pulse inhibition in hypomorphic-inducible and reversible CB1^{-/-} mice. *PLoS One*. 2012;7(4):e35013.
14. Powell SB. Models of neurodevelopmental abnormalities in schizophrenia. *Curr Top Behav Neurosci*. 2010;4(4):435-81.
15. Le Pen G, Grottick AJ, Higgins GA, Martin JR, Jenck F, Moreau JL. Spatial and associative learning deficits induced by neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats: further evaluation of an animal model of schizophrenia. *Behav Pharmacol*. 2000;11(3-4):257-68.
16. Albert H.C. Wong, Barbara K. Lipska, Olga Likhodi, Ernie Boffa, Daniel R. Weinberger, James L. Kennedy, et al. Cortical gene expression in the neonatal ventral-hippocampal lesion rat model. *Schizophrenia Research*. 2005;77:261-70
17. Guido Lastra L, Camila Manrique. Microarreglos: herramienta para el conocimiento de las enfermedades. *Revista colombiana de reumatología*. 2005;12(3):263-7.
18. Zimmermann M. Ethical principles for the maintenance and use of animals in neuroscience research. *Neurosci Lett*. 1987;73(1):1.
19. Lipska BK, Jaskiw GE, Chrapusta S, Karoum F, Weinberger DR. Ibotenic acid lesion of the ventral hippocampus differentially affects dopamine and its metabolites in the nucleus accumbens and prefrontal cortex in the rat. *Brain Res*. 1992;585(1-2):1-6.
20. Mostalac-Preciado CR, de Gortari P, López-Rubalcava C. Antidepressant-like effects of mineralocorticoid but not glucocorticoid antagonists in the lateral septum: interactions with the serotonergic system. *Behav Brain Res*. 2011;30;223(1):88-98.
21. Pérez-Carreón JI, Martínez-Pérez L, Loredó ML, Yañez-Maldonado L, Velasco-Loyden G, Vidrio-Gómez S, et al. An adenosine derivative compound, IFC305, reverses fibrosis and alters gene expression in a pre-established CCI (4)-induced rat cirrhosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(2):287-96.
22. Miyakawa T, Leiter LM, Gerber DJ, Gainetdinov RR, Sotnikova TD, Zeng H, et al. Conditional calcineurin exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(15):8987-92.
23. Liu CM, Fann CS, Chen CY, Liu YL, Oyang YJ, Yang WC, et al. ANXA7, PPP3CB, DNAJC9, and ZMYND17 genes at chromosome 10q22 associated with the subgroup of Schizophrenia with deficits in attention and executive function. *Biol Psychiatry*. 2011;70(1):51-8.
24. Ng MYM, Levinson DF, Faraone SV, Suarez BK, DeLisi LE, Arinami T, et al. Meta-analysis of 32 genome-wide linkage studies of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*. 2009;14(8):774-85.
25. Kurian SM, Le-Niculescu H, Patel SD, Bertram D, Davis J, Dike C. Identification of blood biomarkers for psychosis using convergent functional genomics. *Molecular Psychiatry*. 2011;16:37-58.
26. Engelder S. Huntingtin-associated protein 1 (HAP1) interacts with the p150Glued subunit of dynactin. *Hum Mol Genet*. 1997;6(13):2205-12.
27. Shaw PJ. Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry*. 2005;76(8):1046-57.
28. Bernstein HG, Ernst T, Lendeckel U, Bukowska A, Ansorge S, Stauch R, et al. Reduced neuronal expression of insulin-degrading enzyme in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with haloperidol-treated, chronic schizophrenia. *J Psychiatric Res*. 2009;43(13):1095-105.
29. Wei L, Sun D, Yin Z, Yuan Y, Hwang A, Zhang Y, et al. A PKC-beta inhibitor protects against cardiac microvascular ischemia reperfusion injury in diabetic rats. *Apoptosis*. 2010;15(4):488-98.
30. Hou Y, Zhou L, Yang QD, Du XP, Li M, Yuan M, et al. Changes in hippocampal synapses and learning-memory abilities in a streptozotocin-treated rat model and intervention by using fasudil hydrochloride. *Neuroscience*. 2012;3:200:120-9.
31. Toupance S, Brassart B, Rabenoelina F, Ghoneim C, Vallar L, Pollette M, et al. Elastin-derived peptides increase invasive capacities of lung cancer cells by post-transcriptional regulation of MMP-2 and uPA. *Clin Exp Metastasis*. 2012;29(5):511-22.
32. Gaiano N, Nye JS, Fishell G. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron*. 2000;26(2):395-404.
33. Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, Tashiro K, Kurooka H, Honjo T. Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF-responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron*. 2001;29(1):45-55.
34. Chambers CB, Peng Y, Nguyen H, Gaiano N, Fishell G, Nye JS. Spatiotemporal selectivity of response to Notch1 signals in mammalian forebrain precursors. *Development*. 2001;128(5):689-702.
35. Kerns D, Vong-Ghe S, Barley K, Dracheva S, Katsel P, Casaccia P, et al. Gene expression abnormalities and oligodendrocyte deficits in the internal capsule in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2010;120(1-3):150-8.
36. López-Valdés H, García-Colunga J. La participación de los receptores de acetilcolina nicotínicos en trastornos del sistema nervioso central. *Salud mental*. 2003;26(3):66-72.
37. Kishi T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Kawashima K. Genetic association analysis of tagging SNPs in alpha4 and beta2 subunits of neuronal nicotinic acetylcholine receptor genes (CHRNA4 and CHRN2) with schizophrenia

- in the Japanese population. *Journal of Neural Transmission*. 2008;115(10):1457-6.
38. De Luca V, Voineskos S, Wong G, Kennedy JL. Genetic interaction between alpha4 and beta2 subunits of high affinity nicotinic receptor: analysis in schizophrenia. *Experimental Brain Research*. 2006;174(2):292-6.
 39. García-Valencia J, Miranda AL, López-Jaramillo CA, Palacio-Acosta CA, Gómez-Franco J, Opsina-Duque J. Esquizofrenia y Neurodesarrollo. *Revista colombiana de psiquiatría*. 2005;34(01):63-76.
 40. te Velthuis Aartjan JW, Bagowski CP. PDZ and LIM domain-encoding genes: molecular interactions and their role in development. Review Article. *The ScientificWorld Journal*. 2007;7:1470-92.
 41. Hou Y, Zhou L, Yang QD, Du XP, Li M, Yuan M, et al. Changes in hippocampal synapses and learning-memory abilities in a streptozotocin-treated rat model and intervention by using fasudilhydrochloride. *Neuroscience*. 2012 3;200:120-9.
 42. Croft D, Crighton D, Samuel M, Lourenco F, Munro J, Wood J, et al. p53-mediated transcriptional regulation and activation of the actin cytoskeleton regulatory RhoC to LIMK2 signaling pathway promotes cell survival. *Cell Res*. 2011;21(4):666-8.
 43. Song L, Fricker LD. Cloning and expression of human carboxypeptidase Z, a novel metallo-carboxypeptidase. *J Biol Chem*. 1997;272(16):10543-50.
 44. Reznik SE, Fricker LD. Carboxypeptidases from A to Z: implications in embryonic development and Wnt binding. *Cell Mol Life Sci*. 2001;58:1790-1804.
 45. Guilarte TR, Hammoud DA, McGlothlan JL, Caffo BS, Foss CA, Kozikowski AP, et al. Dysregulation of glutamate carboxypeptidase II in psychiatric disease. *Schizophr Res*. 2008;99(1-3):324-32.
 46. Zhou CJ, Zhao C, Pleasure SJ. Wnt signaling mutants have decreased dentate granule cell production and radial glial scaffolding abnormalities. *J Neurosci*. 2004;24(1):121-6.
 47. Nathan D, Okerlund, Benjamin NR. Cheyette. Synaptic Wnt signaling a contributor to major psychiatric disorders? *J Neurodev Disord*. 2011;3(2):162-74.
 48. Varela-Nallar L, Grabowski CP, Alfaro IE, Alvarez AR, Inestrosa NC. Role of the Wnt receptor Frizzled-1 in presynaptic differentiation and function. *Neural Dev*. 2009;2:41.
 49. Sahores M, Gibb A, Salinas PC. Frizzled-5, a receptor for the synaptic organizer Wnt7a, regulates activity-mediated synaptogenesis. *Development*. 2010;137(13):2215-25.
 50. Harms MP, Wang L, Csernansky JG, Barch DM. Structure-function relationship of working memory activity with hippocampal and prefrontal cortex volumes. *Brain Struct Funct*. 2012;[Epub ahead of print]
 51. Hanlon FM, Houck JM, Pyeatt CJ, Lundy SL, Euler MJ, Weisend MP, et al. Bilateral hippocampal dysfunction in schizophrenia. *Neuroimage*. 2011;58(4):1158-68.
 52. Lillrank SM, Lipska BK, Weinberger DR. Neurodevelopmental animal models of schizophrenia. *Clin Neurosci*. 1995;3:98-104.
 53. Tseng JR, Kang KW, Dandekar M, Yaghoubi S, Lee JH, Christensen JG. Preclinical efficacy of the c-Met inhibitor CE-355621 in a U87 MG mouse xenograft model evaluated by 18F-FDG small-animal PET. *J Nucl Med*. 2008;49:129-34.
 54. Tucker DM, Derryberry D, Luu P. Anatomy and Physiology of Human Emotion: Vertical Integration of Brainstem, Limbic, and Cortical Systems. In J. Borod, Ed. *Handbook of the Neuropsychology of Emotion*. New York: Oxford, 2000.