



Tesina de Graduación

**KETAMINA:
EVALUACIÓN DE SUS EFECTOS COMPORTAMENTALES
EN DOS MODELOS DE MEMORIA EN RATA**

Micaela Sureda

Licenciatura en Bioquímica

Tutora: Dra. Cecilia Scorza

Co-tutora: MSc. Ximena López

Departamento de Neurofarmacología Experimental
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Montevideo, Julio 2015.

PÁGINA DE APROBACIÓN

Facultad de Ciencias

El tribunal docente integrado por los abajo firmantes aprueba la Tesina de Grado:

Título

Ketamina: evaluación de sus efectos comportamentales en dos modelos de memoria en ratas.

Autor

Micaela Sureda

Tutor

Dra. Cecilia Scorza

Co-tutor

MSc. Ximena López

Carrera

Licenciatura en Bioquímica

Puntaje

.....

Evaluador

Dra. Silvia Olivera

(Nombre y firma)

AGRADECIMIENTOS

A Silvia por sus aportes y correcciones.

A Cecilia por darme la oportunidad de realizar mi pasantía en el laboratorio, como también por su paciencia, motivación, buena disposición y apoyo en todas las instancias.

A Ximena por su paciencia, dedicación y apoyo en todas las etapas de este trabajo, como también su buena disposición para transmitirme de la mejor manera todos sus conocimientos y buenas prácticas.

A todo grupo de Laboratorio, que involucra tanto al Departamento de Neurofarmacología Experimental como al de Biología Celular: José, Martín, Paola, Analía, Paola, Gaby, Jessika y Mónica, quienes también me recibieron de la mejor manera en Laboratorio y generan un ambiente de trabajo excelente, y quienes estuvieron siempre dispuestos a darme una mano en lo que necesitase.

Al personal del bioterio por su trabajo y cuidado de los animales.

A mis amigas de facultad y las "de siempre" por todos los momentos compartidos y su apoyo, tanto desde dentro como fuera de la facultad. En especial a Carolina y Fabiana, por la generosidad con su material de estudio excelente que sin duda me ahorraron horas interminables de estudio.

A mi familia: mis padres, hermana, abuelos, tías y primos, por su apoyo incondicional y por siempre estar ahí para mí.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
PALABRAS CLAVE	3
INTRODUCCIÓN	4
Patología de la esquizofrenia	4
Aspectos generales y sintomatología	4
Tratamiento Farmacológico	5
Hipótesis neuroquímicas asociadas a la sintomatología de esquizofrenia	6
a. Hipótesis DAérgica	6
b. Hipótesis GABAérgica	7
c. Hipótesis 5-HTérgica	7
d. Hipótesis GLUérgica	7
Antagonistas NMDA como modelos farmacológicos de la esquizofrenia	8
NMDAR	9
Antecedentes particulares del trabajo	11
HIPÓTESIS DE TRABAJO	13
OBJETIVOS	14
Objetivo general de la pasantía	14
Objetivos específicos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	24
Evaluación del efecto de ketamina sobre la actividad locomotora	24
Evaluación del efecto comportamental de ketamina en el modelo de memoria LT.	32
Evaluación del efecto comportamental de ketamina en el modelo de memoria NOR	35

DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS	46

ABREVIATURAS

AAT: Antipsicóticos atípicos

AT: Antipsicóticos típicos

CA: Campo Abierto

DAérgica: Dopaminérgica

GLUérgica: Glutamatérgica

LT: Latencia de transferencia

NMDA: N-metil-D-aspartato

NMDAR: Receptor NMDA

NOR: *Novel Object Recognition*

PCP: Fenciclidina

5-HTérgica: Serotoninérgica

RESUMEN

La esquizofrenia es una patología sumamente compleja, que engloba tres tipos de trastornos: positivos, negativos y cognitivos. En particular, se considera que los trastornos cognitivos son los síntomas que, en mayor medida, impiden que el paciente tenga una buena calidad de vida y plena integración en la sociedad. Más aún, el tratamiento de estos trastornos con los fármacos antipsicóticos actuales no logra aplacarlos.

Para estudiar esta enfermedad fuera de la clínica, se generaron modelos farmacológicos capaces de representar, aunque parcialmente, sus diferentes aspectos. El modelo más aceptado actualmente se basa en la hipótesis neuroquímica glutamatérgica y consiste en el uso de antagonistas de receptores glutamatérgicos NMDA (NMDAR) en animales. Entre los antagonistas de los NMDAR, se encuentra la ketamina, un anestésico disociativo derivado de la fenciclidina (PCP o más conocida como “polvo de ángel”). Se ha reportado que la utilización de esta droga a dosis subanestésicas es utilizada como sustancia de recreación, la cual genera efectos tipo-psicóticos y alteraciones cognitivas similares a los de la enfermedad. Además, su consumo en pacientes esquizofrénicos, genera un agravamiento de los síntomas de la enfermedad. Por su parte, su administración sistémica en roedores genera efectos conductuales que remedan o son representativos de la patología, tales como: aumento de la actividad motora con desorganización del movimiento, aparición de estereotipias y signos de ataxia, alteraciones en el funcionamiento de los sistemas sensoriomotores y alteraciones en el aprendizaje y en ciertos tipos de memoria. Es por ello que el estudio de los efectos inducidos por los antagonistas NMDA, en particular, sobre la función cognitiva, es de nuestro interés.

El presente trabajo se basó en el uso de tres tipos de modelos comportamentales para evaluar los efectos inducidos por la administración sistémica de ketamina en ratas: Campo Abierto (CA), Latencia de Transferencia (LT) y *Novel Object Recognition* (NOR). El primero permite evaluar los efectos motores y exploratorios, mientras que LT y NOR permiten evaluar alteraciones en la función cognitiva. Estos últimos dos se basan en el aprendizaje y posterior evocación de una tarea determinada, diferenciándose en el parámetro a evaluar y la estructura espacial del modelo. Si bien los modelos de CA y LT son empleados con

frecuencia en el laboratorio, el NOR no había sido puesto a punto en el laboratorio, siendo éste uno de los objetivos del presente trabajo.

Los resultados encontrados indicaron que ketamina indujo en el modelo CA efectos que concuerdan con los de la literatura: un aumento significativo y dosis-dependiente de la actividad locomotora, con un patrón motor desorganizado, conducta de no frenado, estereotipias, signos de ataxia y *flat body posture*. Por otro lado, y a la dosis seleccionada, la ketamina no provocó alteraciones significativas en la memoria evaluada en los modelos de LT y NOR. Sin embargo, validación y puesta a punto del modelo NOR en el laboratorio resultó exitosa.

PALABRAS CLAVE

Esquizofrenia; comportamiento; ketamina; memoria; Campo Abierto; Latencia de Transferencia; *Novel Object Recognition*.

INTRODUCCIÓN

Patología de la esquizofrenia

Aspectos generales y sintomatología

La esquizofrenia es un desorden neuropsiquiátrico crónico y grave del sistema nervioso central, que se caracteriza por la manifestación de tres tipos de síntomas: positivos, negativos y alteraciones cognitivas. Las primeras alteraciones refieren a la presencia de alucinaciones visuales y auditivas, junto con desorganización del pensamiento. Por su parte, las segundas cuentan con pérdida de motivación y expresión emocional. Las últimas engloban alteraciones cognitivas en la atención, en funciones ejecutivas y en tipos específicos de memoria, en especial la memoria de trabajo, impidiendo que el paciente lleve adelante una vida plena. Sumado a esto, se ha demostrado que la función cognitiva disminuye rápidamente de 3 a 4 años una vez expresados los síntomas esquizofrénicos¹ y poseen una incidencia significativa en la recuperación del paciente². A su vez, la esquizofrenia aparece con patologías comórbidas como la depresión y los trastornos de ansiedad, que contribuyen al suicidio del 10% de los pacientes que sufren de esquizofrenia³. Por otro lado, se ha registrado que las personas que padecen de esta enfermedad presentan morbilidad a edades más tempranas que los individuos sanos, probablemente debido a una aceleración del proceso de envejecimiento⁴. La etiología de esta patología permanece aún desconocida, aunque se cree que están implicados tanto los factores ambientales como los genéticos en su desarrollo⁵⁻⁷. Los factores ambientales que parecen incidir son: residencia en zonas urbanas, la migración, estado socio-económico y los incidentes experimentados durante su vida fetal o perinatal. Dentro de este último grupo se incluyen la presencia de infecciones, las deficiencias nutricionales, la hipoxia neonatal y las complicaciones obstétricas⁸. En cuanto a los factores genéticos, es de amplio conocimiento que tanto las alteraciones genéticas comunes como las raras, constituyen un riesgo para la formación de una arquitectura neural normal. Ejemplos de estos factores genéticos son los polimorfismos de un único nucleótido (alteraciones comunes y de poca severidad) y las deleciones o duplicaciones que cambian el número de copias (eventos raros y severos)⁹. Se cree que estas variaciones

genéticas influyen tanto el neurodesarrollo como la señalización celular y las funciones sinápticas¹⁰. Los estudios de tomografía computarizada (CT), las imágenes por resonancia magnética (MRI) y los análisis post-mortem, permitieron evidenciar una arquitectura neural diferente en individuos esquizofrénicos con respecto a individuos sanos. Estas diferencias incluyen: pérdida de volumen en los lóbulos prefrontales, la corteza superior temporal y el hipocampo y aumento de volumen en los ventrículos laterales y en el tercer ventrículo¹¹. A su vez, se sabe que estos factores genéticos son altamente heredables, y por ende, probablemente también lo sea el fenotipo riesgoso¹².

Tratamiento Farmacológico

Los tratamientos actuales para la esquizofrenia incluyen farmacoterapias con drogas antipsicóticas típicas y atípicas. Estas median sus acciones terapéuticas diferencialmente, bloqueando receptores dopaminérgicos tipo D2 con mayor o menor afinidad¹³.

Los antipsicóticos típicos (AT) fueron descubiertos en los años 50 y son capaces de antagonizar los síntomas positivos, aunque no inciden sobre los negativos, ni mejoran las alteraciones cognitivas¹⁴. Además, generan efectos secundarios severos en los pacientes principalmente asociados al control motor, produciendo síntomas extrapiramidales (EPS), tales como temblor, rigidez y distonía, que usualmente llevan a dar término al tratamiento con este tipo de fármacos^{15,16}. Se ha demostrado mediante estudios de neuroimagen por tomografía de emisión de positrones (PET) que la expresión de los EPS vienen dados por la ocupación del 78 - 80% de los receptores D2, al cual los AT alcanzan su eficacia terapéutica. Por lo tanto, esta ocupación debería reducirse para posibilitar el empleo de ATs sin generar EPS, aunque es inviable durante la práctica clínica¹⁷. Además, no todos los pacientes esquizofrénicos responden al tratamiento con ATs¹⁸.

Los antipsicóticos atípicos (AAT) surgieron en los años 80 y poseen diversas ventajas en relación a los típicos. Son efectivos en el tratamiento de los síntomas positivos y negativos y mejoran, aunque no sustancialmente, las alteraciones cognitivas^{14,19}. A dosis terapéuticas, no producen los efectos secundarios extrapiramidales motores¹⁶. Aún así, se ha visto que su uso prolongado causa ganancia de peso²⁰, efectos cardíacos y metabólicos adversos²¹ e incluso agranulocitosis²². Mediante estudios de imagenología PET se ha demostrado que este tipo de antipsicóticos tiene una mayor afinidad hacia los receptores

serotoninérgicos 5-HT_{2A} respecto a los receptores dopaminérgicos D₂²³. Aún así, se postula que la generación de su efecto antipsicótico particular viene dado por la baja afinidad y una rápida disociación del receptor dopaminérgico tipo D₂, mientras que el receptor 5-HT_{2A} parece no ser necesario ni suficiente¹³. Los AATs también poseen afinidad por otros tipos de receptores de neurotransmisores como los muscarínicos de acetilcolina, y los receptores α -adrenérgicos²⁴. Ambos receptores parecen contribuir al efecto característico de este tipo de antipsicóticos, y se asocian a la falta de riesgo de generar EPS.

Es sabido que aún falta por implementar un tratamiento que sea lo suficientemente completo y eficiente que englobe un mejoramiento de todos los síntomas de esta enfermedad tan compleja.

Hipótesis neuroquímicas asociadas a la sintomatología de esquizofrenia

Existen diversas hipótesis neuroquímicas en la literatura que intentan explicar la aparición de los síntomas de la esquizofrenia. Entre ellas se encuentran: la hipótesis Dopaminérgica (DAérgica), la Glutamatérgica (GLUérgica), la Serotoninérgica (5-HTérgica) y la GABAérgica. Todas ellas involucran distintos sistemas de neurotransmisión, siendo las primeras dos hipótesis las más antiguas y dominantes respecto a las últimas dos.

a. Hipótesis DAérgica

La hipótesis DAérgica fue una de las hipótesis más duradera, que asentaba como centro de la enfermedad al neurotransmisor dopamina (DA). La hipótesis plantea sus bases a partir de evidencias clínicas de exacerbación de los síntomas psicóticos en pacientes esquizofrénicos e inducción de psicosis en pacientes sanos por empleo de drogas estimulantes como la cocaína y la anfetamina²⁵. A partir de ello, esta hipótesis fue evolucionando y resultó ser reformulada por Weinberger en 1994²⁶. En esa nueva versión, se asoció la presencia de sintomatología positiva a una hiperfunción de este neurotransmisor en la vía mesolímbica, mientras que una hipofunción en la vía mesocortical se asocia a la aparición de sintomatologías negativas y cognitivas. En

versiones más modernas, se busca generar una hipótesis más integradora, que incluya aspectos genéticos y ambientales²⁷.

b. Hipótesis GABAérgica

La hipótesis GABAérgica sostiene que existe una disfunción de las interneuronas GABAérgicas que sincronizan y controlan los circuitos corticales, pudiendo ser responsable de muchos síntomas de la patología²⁸.

c. Hipótesis 5-HTérgica

La hipótesis 5-HTérgica se encuentra basada en dos evidencias: 1) evidencias clínicas han demostrado que el agonismo de los receptores 5-HTérgicos del tipo 5-HT_{2A} causan efectos alucinógenos y 2) evidencias experimentales demostraron que los AATs poseen una alta afinidad por ellos, pudiendo estar involucrados en mediar sus efectos terapéuticos en la patología. Por lo tanto, una disfunción en ese sistema podría estar también implicada en la generación de la patología²⁹.

d. Hipótesis GLUérgica

En los últimos años, la hipótesis neuroquímica más aceptada para explicar la esquizofrenia es la hipótesis GLUérgica^{30,1}. La misma se basa en observaciones clínicas de exacerbación de los síntomas en pacientes esquizofrénicos o incluso de generación de los mismos en individuos sanos, bajo el uso de drogas como ketamina³¹ y fenciclidina (PCP)³², que son definidas como antagonistas de los receptores glutamatérgicos NMDA (NMDAR). Estas observaciones sugirieron de la existencia de una hipofunción GLUérgica mediada por los NMDAR que podrían desempeñar un papel en la patología^{33,34,1}.

Antagonistas NMDA como modelos farmacológicos de la esquizofrenia

Debido a que algunos de los síntomas de la esquizofrenia pueden ser evidenciados en animales bajo el tratamiento de antagonistas NMDA (ketamina, PCP y MK-801), estas drogas han sido empleadas para generar modelos farmacológicos de la enfermedad en animales. En este sentido, la administración sistémica de antagonistas NMDA en roedores genera efectos conductuales característicos que son atípicos de un animal sano y que remedan a los observados en la patología^{35,36}. Dependiendo de la dosis administrada, dichos efectos incluyen: aumento significativo de la locomoción con desorganización motora, aparición de estereotipias y signos de ataxia, alteraciones en el filtrado sensoriomotor, en el aprendizaje, y en ciertos tipos de memoria³⁷, tales como: memoria de asociación y espacial, memoria de trabajo y atención. Todas estas conductas son bloqueadas en los distintos modelos comportamentales por los AT y AATs, dándole validez predictiva al modelo farmacológico del antagonismo NMDA^{37,38}.

El modelo de esquizofrenia basado en el antagonismo NMDA es considerado uno de los más completos, ya que es capaz de generar efectos conductuales que representan varios aspectos de la patología^{1,37}. Esto no es logrado en otros modelos farmacológicos, como sucede con fármacos de acción DAérgica directa o indirecta, donde el empleo de drogas como anfetamina, cocaína y apomorfina, aumentan la transmisión DAérgica y generan síntomas psicóticos que pueden ser mitigados por administración de AT y AATs³⁷.

NMDAR

Los NMDAR son receptores ionotrópicos de glutamato, son heterotetrámeros, compuestos por hasta tres subunidades distintas: NR1, NR2 (A-D) y NR3 (A,B). La subunidad NR1 contiene el sitio de unión a la glicina, mientras que las subunidades NR2 contienen el sitio de unión al glutamato (Fig. 1). Típicamente, estos receptores se encuentran formados por dos subunidades NR1 y dos subunidades moduladoras: NR2-NR2 o NR2-NR3, aunque lo más común en el cerebro adulto es la conformada por NR2 A y B^{39,40}. Las diferentes combinaciones de estas subunidades aportan características particulares a los NMDAR que conforman, tanto en su farmacología, como en su cinética, conductancia y permeabilidad iónica. En particular, la funcionalidad diferencial de los NMDAR se ha asociado a la presencia de subunidades NR2⁴⁰. Mutaciones en las secuencias de las subunidades NR2A y NR2B se han asociado a la expresión del fenotipo de diversas patologías, como por ejemplo trastornos epilépticos para el primer caso, mientras que el autismo y la esquizofrenia se asocian al segundo⁴¹.

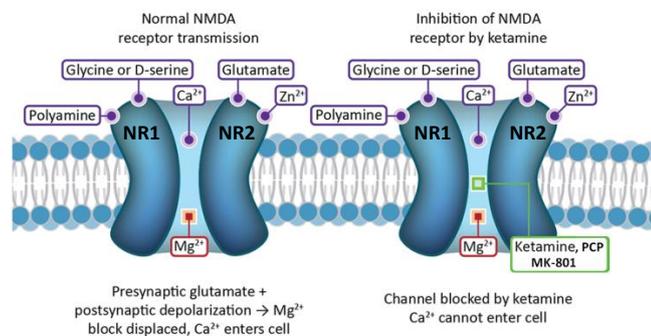


Figura 1: Representación esquemática del receptor NMDA, en la cual se pueden apreciar las subunidades NR1 y NR2 y los sitios de unión de sus múltiples ligandos. Se lo representa tanto en condiciones fisiológicas como durante el bloqueo del poro mediante antagonistas NMDA, como ketamina, PCP y MK-801. Como puede apreciarse, esta droga bloquea el ingreso de Ca²⁺ a la célula, impidiendo el funcionamiento normal del receptor (imagen adaptada de ⁴²).

Ketamina

La ketamina fue sintetizada por la compañía farmacéutica Parke-Davis en 1962. Es un derivado de la droga PCP sintetizada durante la búsqueda de un anestésico menos agresivo. La administración de PCP provocaba alucinaciones, confusión y delirio, mientras que la ketamina generaba menor cantidad de efectos adversos y actuaba con rapidez⁴³. Por lo tanto, esta droga fue y sigue siendo un anestésico más seguro para su administración en humanos.

Actualmente, la ketamina es reconocida como un anestésico disociativo que es utilizado tanto en humanos como en animales. La ketamina provee una ventaja adicional, ya que actúa como estimulante cardiorespiratorio⁴⁴. Aun así, a dosis subanestésicas es utilizada como droga de recreación, debido a sus efectos que incluyen: sensación de flotar fuera del cuerpo, alucinaciones visuales y estados de “soñar despierto”, entre otros⁴⁵.

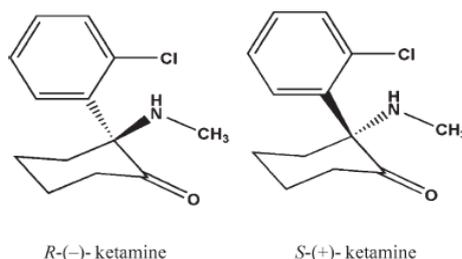


Figura 2: Isómeros ópticos de ketamina: R- y S- ketamina (figura obtenida de ⁴⁶).

La ketamina tiene un carbono quiral, por lo que hay dos enantiómeros: (R)-(-)- ketamina y (S)-(+)- ketamina (Fig. 2), usualmente encontrados en una mezcla racémica 1:1. Ambas conformaciones causan diferentes efectos sobre el individuo, destacándose la (S)-(+)- ketamina por su alta afinidad por el receptor NMDA respecto a la (R)-(-)- ketamina (Tabla 1).

A su vez, a esta droga actúa como un antagonista no competitivo del receptor NMDA, ya que se une al sitio de unión de la PCP⁴⁷ (Fig. 1). De esta forma, media los efectos antagonistas del NMDAR ya descritos y otros efectos neuroprotectores, analgésicos⁴⁸ y antidepresivos en pacientes que son resistentes a los tratamientos clásicos⁴⁹. Se sabe que la ketamina también posee un agonismo parcial por los receptores D2 y cierta afinidad por receptores sigma, kappa y opioideos, los cuales podrían tener alguna relevancia al momento del estudio de esta droga

como modelo farmacológico de esquizofrenia⁵⁰. Estudios de MRI han asociado el uso crónico dosis-dependiente de ketamina con una reducción del volumen de sustancia gris, lo cual es además observado en pacientes que padecen de esquizofrenia⁵¹.

Tabla 1. Comparación proporcional de los efectos de R- y S- ketamina.

Ketamine	S(+)	R(-)
NMDA affinity	4	1
Plasma concentration	1	1
Cerebral concentration	1	1
Elimination rate	1	0.8-1
Anaesthetic potency	3	1
Side-effects	Similar to racemic mixture	

Antecedentes particulares del trabajo

Numerosos trabajos han reportado que la administración en ratas de MK-801, el antagonista NMDA más potente, induce alteraciones cognitivas en varios modelos conductuales^{37,38}. Sin embargo, esta droga no es consumida por humanos como sí lo es la ketamina y la PCP. A diferencia de la PCP, la ketamina es de fácil acceso para su consumo, dada su venta como anestésico veterinario. Nuestro laboratorio ha trabajado intensamente en la caracterización de las conductas inducidas por MK-801⁵²⁻⁵⁵, aunque el estudio de los efectos de ketamina no se ha abordado aún.

En particular, en el laboratorio se ha trabajado con dos modelos comportamentales: Campo Abierto (CA)^{52,53,56} y Latencia de Transferencia (LT)^{52,55,56} para evaluar los efectos comportamentales del antagonista MK-801 y de su reversión mediante la administración de ciertos antipsicóticos. Por un lado, el modelo de CA para roedores es ampliamente utilizado en la literatura, y se basa en la situación de conflicto natural entre la exploración del ambiente nuevo y la aversión a los espacios abiertos y luminosos^{57,58}. A través de este paradigma se analizan las conductas del animal, como la actividad locomotora u otras conductas tales como la exploración vertical o *rearings*⁵⁷.

Por otro lado, el LT surge del modelo de laberinto en cruz elevado (LCE), que fue originalmente utilizado para evaluar ansiedad experimental⁵⁹. Sin embargo, a través de una modificación que permite cuantificar la latencia que el animal demora en realizar una tarea, puede utilizarse para valorar procesos de aprendizaje y memoria^{60,61}. Este modelo se basa en la aversión que sufre el roedor frente al espacio abierto y elevado que confiere la estructura del modelo^{59,62}. El paradigma se implementó en tres días seguidos, siendo el primer día (LT1) cuando el animal aprende la tarea y el segundo el día (LT2) cuando la evoca. Por esta razón, cuando el animal aprende dónde y cómo llegar al sitio de preferencia durante LT1, la latencia durante LT2 disminuirá concomitantemente. Contrariamente, un efecto amnésico se evidencia por el mantenimiento del valor de latencia del LT1 al LT2, por lo que la latencia funciona como un indicativo de aprendizaje y memoria. El tercer día (LT3), es utilizado como control de la desaparición del efecto amnésico en el animal.

Asimismo, otro modelo utilizado para evaluar la función cognitiva en los animales de experimentación es el *Novel Object Recognition* (NOR). Este es un paradigma etiológicamente relevante, que no involucra recompensas ni aversión, el cual se basa en la conducta espontánea de exploración de roedores para diferenciar objetos nuevos de familiares⁶³. El modelo NOR es ampliamente utilizado para la investigación de alteraciones en la memoria, específicamente la memoria episódica visual³². Estas alteraciones cognitivas pueden ser estudiadas en asociación al envejecimiento, manipulaciones genéticas o tratamientos farmacológicos. A su vez, el modelo también puede ser adaptado para medir atención, ansiedad y preferencia por lo desconocido en roedores⁶⁴.

El modelo consta de tres fases: habituación, *training* y *test*. Durante la primera, el animal se habitúa al lugar de prueba, durante el segundo se lo es expuesto a dos objetos iguales, mientras que durante el tercero se cambia a uno de los objetos por otro nuevo. Ninguno de estos objetos debe generar una preferencia natural o de asociación al animal. Asimismo, dadas las bases del modelo, el objeto nuevo debería ser el más atractivo y, por ende, el que más tiempo explora el animal en condiciones normales. Una alteración en la función cognitiva se caracteriza por una falla en el reconocimiento del objeto nuevo^{32,64} durante la fase de *test*. El tiempo de exploración en esta fase luego será utilizado para calcular los parámetros: índice de discriminación y % de tiempo de exploración como indicativos de la función cognitiva.

Si bien los modelos LT y NOR se utilizan ampliamente en la literatura para estudiar trastornos cognitivos y varios trabajos han reportado que la administración de ketamina genera alteraciones cognitivas en roedores en dichos modelos, este trabajo pretende implementar en el laboratorio el modelo NOR.

Por lo tanto, la implementación del modelo NOR y la evaluación de los efectos de ketamina empleando los tres modelos ampliarán la capacidad de análisis y la disponibilidad de modelos comportamentales en nuestro laboratorio. Por otra parte, colaborará con el estudio enfocado hacia una mejor terapéutica que la existente para esta enfermedad.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Basados en los datos aportados por la literatura, la administración sistémica aguda de una dosis de ketamina que no induce hiperactivación motora, altera la función cognitiva, lo que es evidenciado a través de las tareas evaluadas en los modelos de LT y NOR.

OBJETIVOS

Objetivo general de la pasantía

Caracterizar los efectos de la administración aguda de ketamina sobre la función cognitiva mediante el uso de dos modelos de memoria en ratas.

Objetivos específicos

1. Evaluación del efecto de ketamina sobre la actividad locomotora. Los efectos sobre la locomoción se evaluarán en el CA a través de una curva dosis-respuesta, con el fin de determinar la dosis efectiva para los modelos de memoria.
2. Evaluación del efecto comportamental de ketamina en el modelo de memoria LT.
3. Evaluación del efecto comportamental de ketamina en el modelo de memoria NOR.
 - 3.1. Implementación y validación del modelo Novel Object Recognition en el laboratorio.
 - 3.2. Evaluación del efecto comportamental de la ketamina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas macho de cepa Wistar (260 a 300 g) criados en las instalaciones del Bioterio del Instituto bajo las regulaciones éticas de la Ley Nacional de Experimentación Animal N° 18.611. Fueron criados y alojados en cajas de 48.0 x 37.5 x 21.0 cm en grupos de 6 animales y mantenidos en condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C), ciclo de luz-oscuridad constante (7:00 AM-7:00 PM), alimentación y agua *ad libitum*.

Drogas

Ketamina

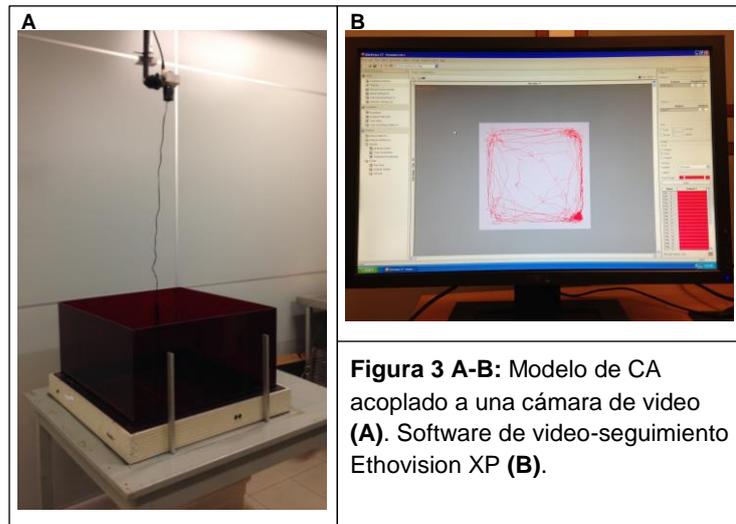
Se empleó un preparado comercial obtenido en la Veterinaria La Hacienda y fue diluida en agua destilada. Las dosis utilizadas fueron de 10, 25 y 40 mg/kg. Tanto ketamina como su vehículo fueron inyectados vía subcutánea (s.c.).

Modelos conductuales

Todos los experimentos comportamentales fueron llevados a cabo en el cuarto de experimentación del Departamento de Neurofarmacología Experimental en condiciones ambientales de temperatura y luz-oscuridad controladas y similares a las del Bioterio. Los animales fueron trasladados 24 hs antes para una correcta habituación al ambiente donde se realizaron los ensayos.

1. Modelo de CA

El CA para ratas consiste en una caja de 60x60 cm de lado con paredes de acrílico rojo (40 cm). El CA está asociado a una cámara de video que permite registrar los movimientos del animal. Cada video fue analizado utilizando el software de video seguimiento ETHOVISION, obteniendo automáticamente los parámetros: distancia recorrida, velocidad, tiempo en movimiento, patrón locomotor.



2. Modelo de LT:

En este modelo, el aparato consiste en dos brazos abiertos (50 x 10 cm) cruzados en ángulo recto con dos brazos cerrados (50 x 10 x 40 cm), unidos por una plataforma central común (10 x 10 cm) y elevado 50 cm del suelo. Se evaluó el tiempo que le lleva al animal para entrar a uno de los brazos cerrados, una vez que ha sido posicionado en el extremo de uno de los brazos abiertos durante tres días seguidos: LT1, LT2 y LT3. Aquellos animales que excedieran un tiempo de 90 segundos en el modelo sin haber ingresado a ninguno de ambos brazos cerrados⁶¹, junto con aquellos que se cayeran del mismo, fueron descartados de los grupos experimentales.



Figura 4: Modelo LCE utilizado para evaluar Latencia de Transferencia. Los brazos desnudos del modelo se los denomina como brazos abiertos, y a los otros como brazos cerrados.

3. NOR:

En el modelo NOR se utiliza el paradigma de CA en donde se posicionan dos objetos iguales o distintos entre sí, a 15 cm de las paredes de las esquinas. Se analiza el tiempo que el animal explora cada objeto, lo cual es utilizado para calcular un índice de discriminación, definido como la diferencia entre el tiempo que el animal explora el objeto nuevo y el familiar durante toda la fase de *test* (Ecuación 1).

$$ID = \frac{(T_B - T_A)}{(T_B + T_A)}$$

Ecuación 1: Cálculo del índice de discriminación. T_A = tiempo de exploración del objeto nuevo; T_B = tiempo de exploración del objeto conocido.

Otras conductas evaluadas fueron las conductas estereotipadas, que se cuantificaron directamente, mientras que la actividad locomotora horizontal del animal y los tiempos de exploración de cada objeto fueron analizados a través del software ETHOVISION.

Se consideró que el animal se encontraba explorando cuando acercaba su nariz al menos a 3.5 cm del objeto y/o lo tocaba con su nariz. Una conducta no exploratoria fue definida como sentarse o treparse sobre los objetos, incluyendo *rearings* con sus patas delanteras apoyadas sobre los mismos⁶⁵. Por su parte, aquellos animales que no sumaron un tiempo de

exploración entre los dos objetos mayor a 0 segundos durante la fase de *training*, fueron descartados del grupo experimental.

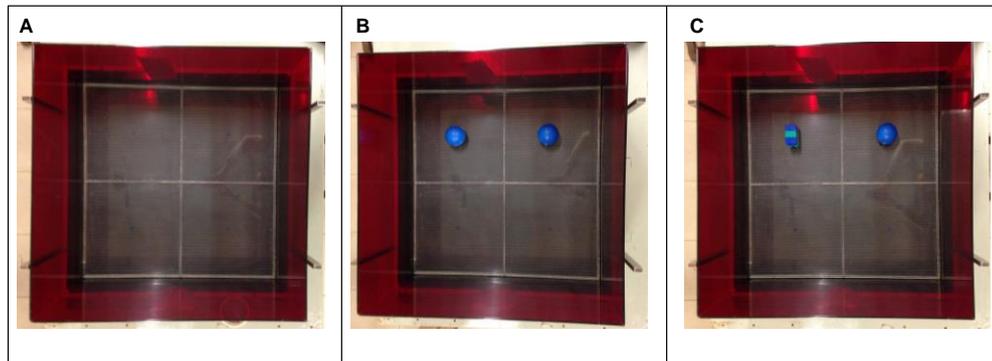


Figura 5 A-C: Modelo NOR dispuesto para las diferentes fases: Habitación **(A)**, *training* **(B)** y *test* **(C)**. En las fases de training y test pueden observarse los objetos utilizados, ya sean pelotas azules o construcción de lego azul y verde.

Análisis estadístico

Según el experimento, los datos fueron tratados con los siguientes test estadísticos: *Student t-test*, ANOVA de una y dos vías seguido de un test de comparación múltiple Newman-Keuls. Los datos fueron analizados y graficados mediante el programa GraphPad Prism 4.02. La significancia estadística fue fijada en $p < 0.05$. Los datos fueron expresados como la Media \pm Error Estándar de la Media (EEM).

Protocolos experimentales

Los experimentos conductuales se llevaron a cabo según los protocolos experimentales diseñados para cada objetivo:

Evaluación del efecto de ketamina sobre la actividad locomotora.

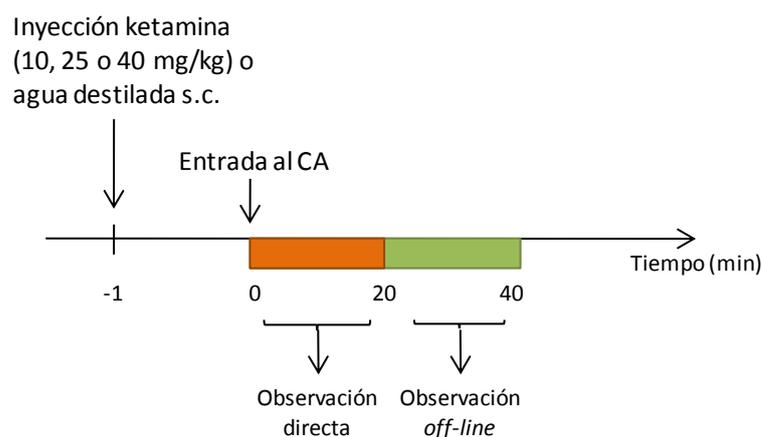
En estos experimentos, los animales fueron inyectados vía s.c. con dosis de ketamina 10, 25 y 40 mg/kg o vehículo. Un minuto después, el animal fue colocado en el CA durante 40 minutos. Con el objetivo de visualizar posibles cambios en la locomoción en función del tiempo, los 40 min de registro fueron desglosados en dos fases: de 0 a 20 minutos y de 20 a 40 minutos. Este protocolo es ilustrado en el Esquema 1.

Se cuantificaron automáticamente mediante ETHOVISION las conductas ya mencionadas arriba. Por su parte, otras conductas fueron evaluadas de forma directa de 0-20 minutos. Con el fin de no permanecer en el cuarto de experimentación durante el tiempo total de registro (40 min), la observación de las conductas durante la segunda fase (20-40 min) fue realizada de forma *off-line*, a través de observación de los videos grabados por el programa ETHOVISION en cada experimento. Estas conductas son las siguientes:

1) exploración vertical o *rearings* (el animal se para sobre sus patas traseras y levanta su tronco junto con sus patas delanteras; siendo libres o apoyados contra la pared) 2) *groomings*, como índice de habituación al CA (conducta de acicalamiento), 2) movimiento desorganizado (patrón locomotor no dirigido por la exploración), 3) conductas de estereotipias: *head shakes* (conducta normal del animal) y *head weavings* (conducta particular inducida por ciertos fármacos, en la cual el animal orienta su cabeza hacia un lado y hacia otro como si estuviese mirando un partido de tenis, sin locomoción), 4) conductas de ataxia: caídas torpes, arrastrado de patas y no frenado en las esquinas, 5) *flat body posture* o posición de cuerpo plano (conducta en la cual el animal pone en contacto la superficie ventral de su cuerpo con el suelo, por al menos 10 minutos).

Todas las conductas cuantificadas se encuentran asociadas al síndrome conductual motor inducido por la administración de antagonistas NMDA.

Esquema 1: Protocolo de experimentación



Esquema 1: Protocolo experimental para generar una curva dosis-respuesta de los efectos de ketamina sobre el patrón locomotor en el modelo CA.

Para cuantificar las conductas: movimiento desorganizado, arrastrado de patas y no frenado se utilizó una escala semicuantitativa del 0 al 3: 0 = conducta no presente, 1 = levemente presente, 2= presente y 3= intenso⁶⁶.

Entre cada experimento, el CA fue limpiado con alcohol 30% y posteriormente secado antes de colocar el próximo animal.

Evaluación del efecto comportamental de ketamina en el modelo de memoria LT

En este caso, los animales fueron inyectados vía s.c. con la dosis de ketamina 10 mg/kg, elegida al final del objetivo 1. Esta selección se hizo en base a la falta de aparición de signos de ataxia que imposibiliten su movimiento y, por lo tanto, su patrón locomotor no se encuentra alterado.

El protocolo de este modelo consiste en tres días consecutivos, y se realiza tras cumplir las 24 horas: LT1, LT2 y LT3. En el primer día, LT1, se inyectó al animal con ketamina o vehículo, se cumplió con un minuto de espera y se lo colocó en el CA durante 5 minutos. Luego, se colocó al animal en el brazo abierto del laberinto en cruz y se cuantificaron las conductas que serán descritas a continuación. El experimento finaliza 10 segundos después que el animal ha ingresado al brazo cerrado. Durante los días posteriores, LT2 y LT3, se colocó al animal de la misma forma en el modelo LT, y se cuantificaron las mismas conductas que en LT1. Sin embargo, durante LT2 y LT3 el experimento finaliza enseguida que el animal ingresa al brazo cerrado. Este protocolo puede visualizarse en el Esquema 2.

Las conductas cuantificadas fueron las siguientes: *rearings*, *groomings* y número de *head dipping*, junto con el parámetro Tiempo de Latencia. Todos ellos se evaluaron de forma directa, con ayuda de un cronómetro, utilizado para la cuantificación del Tiempo de Latencia. Por su parte, en el CA durante LT1 se evaluó únicamente la distancia recorrida. Este parámetro fue provisto por el software ETHOVISION automáticamente.

Esquema 2: Protocolo de experimentación



Esquema 2: Protocolo experimental para evaluar el efecto amnésico de ketamina en el modelo LT.

Entre cada animal se limpió tanto el modelo LT como el CA (cuando corresponde) con alcohol 30% y se lo secó antes de posicionar al próximo.

Evaluación del efecto comportamental de ketamina en el modelo de memoria NOR.

Para este objetivo específico, los animales fueron inyectados vía s.c. con ketamina 10 mg/kg o vehículo (solo vehículo para el objetivo 3.1). Este modelo consta de tres fases, separadas cada una por un tiempo de 24 horas, en tres días consecutivos: Habitación (día 1), Training (día 2) y Test (día 3). Este protocolo es presentado en el Esquema 3.

Con respecto a la fase de habitación (H), se colocó al animal durante dos sesiones de 10 minutos dentro del CA, siendo las sesiones separadas por un intervalo de espera de 1 hora y media. Las conductas cuantificadas por observación directa fueron: *rearings* y *groomings*, como índice de habitación al CA. Por otro lado, mediante observación off-line de los videos provistos por el programa ETHOVISION, se evaluó también la actividad locomotora horizontal suministrada igualmente por el programa. Ambas medidas permiten visualizar la correcta habitación del animal al CA. Este comportamiento favorece a que el animal aumente su interés por los objetos (que serán colocados en la siguiente fase) a que por el ambiente.

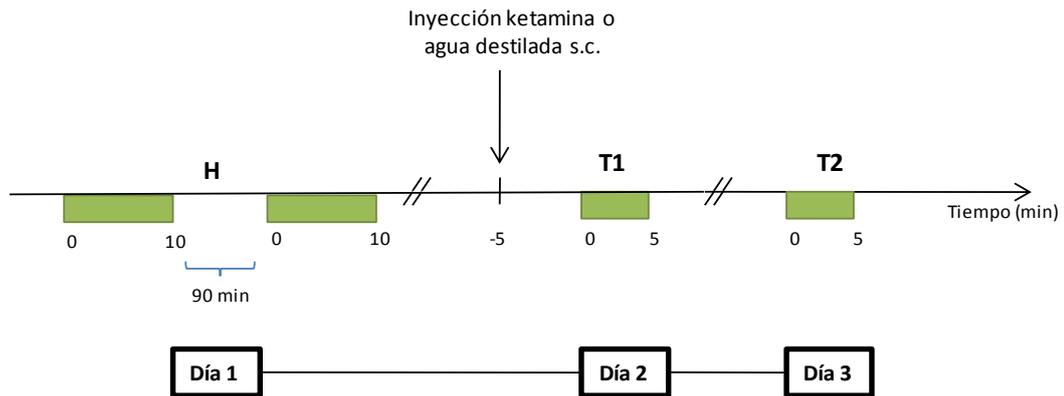
Por otra parte, el siguiente día corresponde a la fase de Training (T1). Este consiste en una inyección subcutánea del animal con la droga ó vehículo con posterior espera de 5 minutos, y finalmente una sola sesión en el CA de 5 minutos. Dentro del CA se posicionaron dos objetos iguales y pegados al piso del mismo, con su centro a 15 cm de las paredes de las esquinas. Los objetos que se utilizaron eran de dos tipos: una construcción de lego azul y verde o una pelota azul.

En este caso, se contabilizaron las conductas de *rearings* y *groomings* por observación directa, y mediante el programa ETHOVISION la actividad locomotora horizontal y cantidad de tiempo que el animal explora el objeto.

Finalmente, el último día corresponde a la fase de Test (T2). El animal se colocó de la misma forma en el CA durante una sola sesión de 5 minutos. En este caso, los objetos por cada animal se localizaron de igual forma en el CA, pero uno de ambos fue reemplazado por un objeto nuevo. Se reemplazó el objeto de la derecha o izquierda de manera contrabalanceada, para normalizar la presencia de posibles

perturbaciones como preferencia por cierto objeto y/o su posición. Respecto a las conductas, se contabilizaron las mismas que en el Training y de igual forma.

Esquema 3: Protocolo de experimentación



Esquema 3: Protocolo experimental para poner a punto el modelo NOR y evaluar el efecto amnésico de la ketamina en el mismo. H=habituación; T1 = *training*; T2 = *test*.

Luego de cada experimento, se limpió el CA y los objetos con alcohol 30%, secándolos posteriormente para luego introducir el próximo animal.

RESULTADOS

Evaluación del efecto de ketamina sobre la actividad locomotora.

En primer lugar, se realizó una curva dosis-respuesta de ketamina, caracterizando sus efectos tanto en la actividad motora como el patrón motor y conductas asociadas al síndrome conductual motor característico de los antagonistas NMDA^{37,52,67}.

Respecto a la actividad locomotora, ketamina indujo un incremento dosis-dependiente en la distancia recorrida respecto al control durante los 40 minutos de experimento (Fig. 6A). En el caso de la dosis de 10 mg/kg, se observó un aumento en la actividad aunque éste no fue significativo. Por otro lado, puede advertirse una tendencia al incremento de la actividad locomotora que no alcanza la significación estadística, al comparar las dosis de 40 respecto a la de 25 mg/kg.

Al desglosar los resultados del tiempo total de registro en dos períodos de 20 minutos (Fig. 6B), se observó que el grupo control disminuyó significativamente su actividad locomotora en el segundo período de registro, reflejando una correcta habituación al modelo. Al observar dentro del mismo grupo lo que sucede cada 5 minutos durante todo el tiempo de registro (Fig. 6C), se observa que su actividad disminuyó de manera constante hasta los 20 minutos de registro. Luego de ese punto, esta tendencia se atenuó, aunque siguió disminuyendo.

Por su parte, para las dosis de 10, 25 y 40 mg/kg dentro de los períodos de a 20 minutos (Fig. 6B), no se observó una disminución de su actividad locomotora en los 40 minutos de registro. A su vez, si se observa lo que sucede cada 5 minutos de registro (Fig. 6C) se distingue que la dosis de 10 mg/kg presentó la misma evolución que el grupo control durante los primeros 10 minutos. El resto del tiempo de registro se mantuvo a valores estables, sin disminuir como el grupo control. Por su parte, las dosis de ketamina 25 y 40 mg/kg presentaron patrones con valores mayores de actividad locomotora. A su vez, estos patrones son similares entre sí, excepto durante los 30 y 35 minutos de registro. La actividad locomotora no disminuyó significativamente para estas últimas dos dosis.

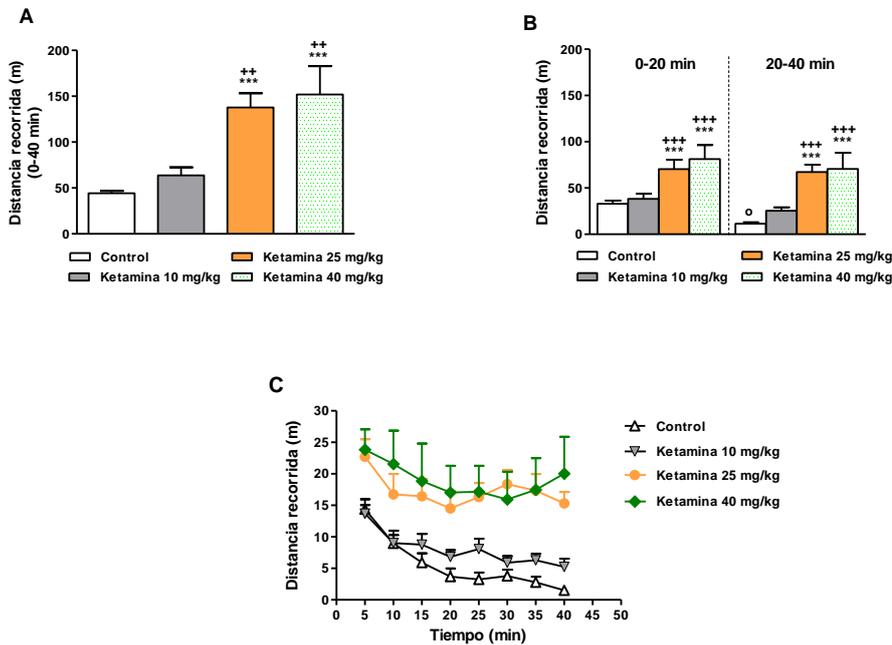


Figura 6 A-C: Efecto de ketamina 10, 25 y 40 mg/kg en la actividad locomotora en el registro total de 0-40 minutos en CA (**A**), o en períodos de a 20 minutos (**B**), o de a 5 minutos (**C**). Los resultados se encuentran expresados como la media \pm EEM de la distancia recorrida (m) provista por el programa ETHOVISION. ANOVA de una vía (A y B) o dos vías (C) seguido del test Newman-Keuls o *Student t-test* (B). * = vs control dentro del mismo período, + = vs ketamina 10 mg/kg dentro del mismo período, o = vs mismo tratamiento en diferente período. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$, o = $p < 0.05$.

Al analizar el parámetro de velocidad de desplazamiento del animal, se observaron las mismas tendencias que los del parámetro distancia recorrida. La velocidad fue significativamente mayor a la del grupo control en el caso de los animales tratados con ketamina 25 y 40 mg/kg, tanto para el registro total de 40 minutos como para cuando se desglosó el recorrido en tramos de a 20 minutos. Por el contrario, para el grupo de ketamina 10 mg/kg, la velocidad no se diferenció de la del grupo control de manera significativa (Fig. 7A y B). Al desglosar el registro cada 5 minutos (Fig. 7C), se observa nuevamente que los patrones son similares para ketamina 25 y 40 mg/kg, excepto durante los 30 y 35 minutos de registro. Por su parte, ketamina 10 mg/kg evoluciona igual que el grupo control durante los primeros 10 minutos de registro, para luego diferenciarse de este último, manteniendo su actividad relativamente constante.

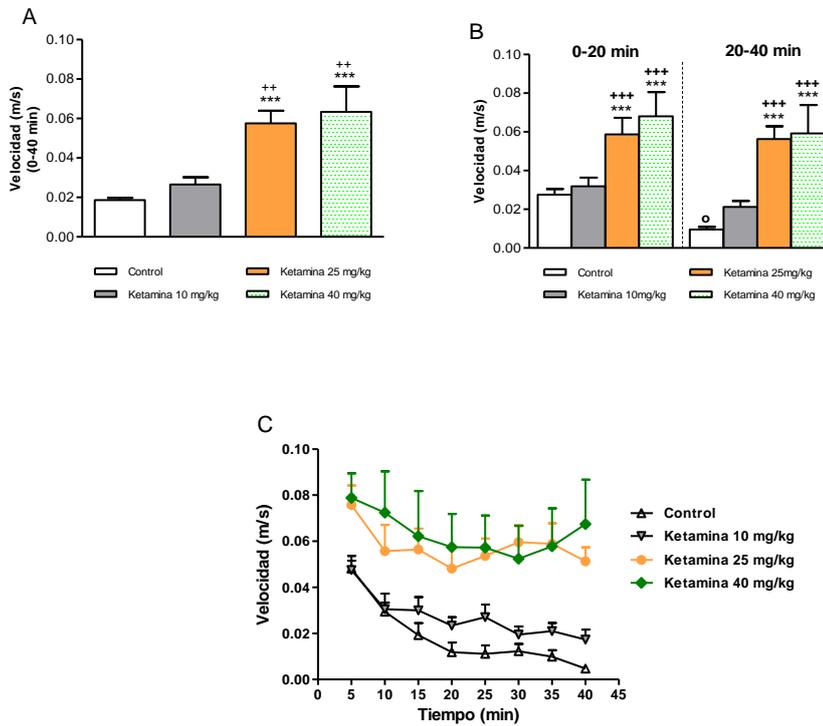


Figura 7 A-C: Efecto de ketamina 10, 25 y 40 mg/kg en la velocidad de movimiento en el registro total de 0-40 minutos en CA (A), o en períodos de a 20 minutos (B), o de a 5 minutos (C). Los resultados se encuentran expresados como la media \pm EEM de la distancia recorrida (m) provista por el programa ETHOVISION. ANOVA de una vía (A y B) o dos vías (C) seguido del test Newman-Keuls o *Student t-test* (B). * = vs control dentro del mismo período, + = vs ketamina 10 mg/kg dentro del mismo período, o = vs mismo tratamiento en diferente período. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, + = $p < 0.05$, ++ = $p < 0.01$, o = $p < 0.05$.

A su vez, se analizaron los patrones locomotores y conductas del animal en el CA. La Figura 8 A-D, muestra el patrón locomotor representativo de los animales controles y tratados en el modelo. Se advierte que los animales control (Fig. 8A) y ketamina 10 mg/kg (Fig. 8B) poseen un patrón similar. Sin embargo, a la dosis de ketamina 25 mg/kg (Fig. 8C) aumentó en intensidad el recorrido respecto a los anteriores, mientras que ketamina 40 mg/kg fue considerablemente más intenso y desorganizado que las demás dosis (Fig. 8D).

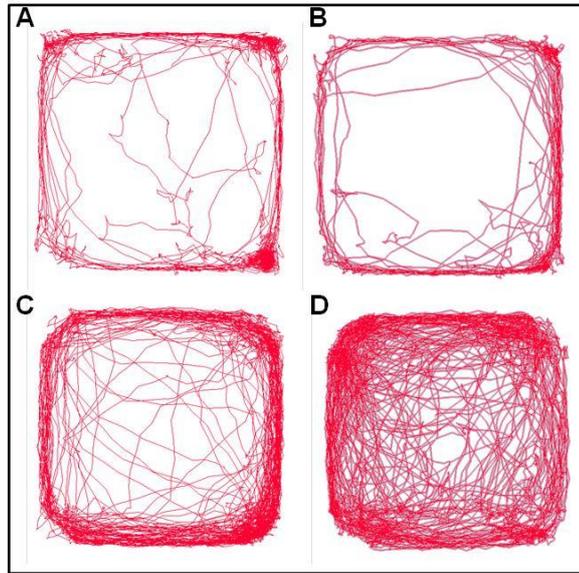


Figura 8 A-C: Recorrido representativo del grupo control **(A)**, ketamina 10 **(B)**, 25 **(C)** y 40 mg/kg **(D)** durante los 40 minutos de registro

La Tabla 2 muestra las conductas motoras inducidas por las diferentes dosis de ketamina durante todo el tiempo del experimento: movimiento desorganizado, caídas torpes y no frenado.

Por su parte, el movimiento desorganizado durante el tiempo total de registro aumentó de forma dosis-dependiente en los animales tratados, existiendo un aumento significativo para ketamina 25 y 40 mg/kg respecto a los demás tratamientos. Esto concuerda con lo visualizado en la Figura 8.

Por otro lado, el número de caídas torpes durante el tiempo total de registro aumentaron para la dosis de 40 mg/kg respecto a los demás grupos. Sin embargo, para la dosis de 25 mg/kg se observó la aparición de las conductas sin alcanzar una significancia estadística respecto al grupo control.

Procediendo ahora hacia la conducta de no frenado, también se encontró un aumento para la dosis de 40 mg/kg, aunque a dosis menores se observó una tendencia al incremento de tipo dosis-dependiente.

Tabla 2. Conductas motoras provocadas por administración de ketamina (0-40 min).

	Patrón locomotor	Signos de ataxia	
	Movimiento desorganizado	Caídas torpes	No frenado
Control	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Ketamina 10 mg/kg	0.3±0.1	0.0±0.0	0.2±0.1
Ketamina 25 mg/kg	1.8±0.1 ^{***+++}	4.7±2.0	0.6±0.2
Ketamina 40 mg/kg	2.6±0.1 ^{***+++//}	49.4±12.5 ^{***+++//}	0.7±0.2 ^{***+++//}

Tabla 2. Efecto de ketamina 10, 25 y 40 mg/kg sobre el patrón locomotor y signos de ataxia durante todo el tiempo de registro (0-40 min). Los resultados se encuentran expresados como la media ± EEM. ANOVA de una vía seguido del test Newman-Keuls. * = vs control en mismo período de tiempo, += vs ketamina 10 mg/kg en mismo período de tiempo, /= vs ketamina 25 mg/kg en mismo período de tiempo. *** = p<0.001, +++ = p<0.001, // = p<0.001.

En la Tabla 3 se exponen las mismas conductas durante todo el período de registro dividido en dos períodos de a 20 minutos.

Por su parte, en la conducta de movimiento desorganizado se encontraron aumentos significativos de las dosis 25 y 40 mg/kg respecto a los animales control y ketamina 10 mg/kg, tanto en los períodos de 0-20 como de 20-40 minutos. Esto también pudo observarse entre las dosis de 25 y 40 mg/kg. A su vez, en todas las dosis de ketamina se halló un aumento de esta conducta en segundo período de 20 minutos respecto al primero.

Siguiendo con la conducta de número de caídas torpes, se observó que solamente la dosis de 40 mg/kg presentó un aumento en ambos períodos respecto a los demás tratamientos. Aún así, la dosis de 25 mg/kg exhibió una tendencia al aumento no significativa, también en ambos períodos de 20 minutos respecto al grupo control y ketamina 10 mg/kg. Ninguna de las dosis de ketamina utilizadas presentó variaciones en la transición de los períodos de 0-20 a 20-40 minutos.

Con respecto a la conducta de no frenado, se observó que en el período de 0-20 minutos la dosis de ketamina 25 mg/kg presentó una tendencia al

aumento de esta conducta, mientras que la de 40 mg/kg lo exhibió de forma significativa respecto a los demás tratamientos. Durante el período de 20-40 minutos, ketamina 25 mg/kg posee un aumento estadísticamente significativo respecto al control y ketamina 10 mg/kg. Por su parte, ketamina 40 mg/kg demostró tener un aumento significativo respecto al grupo control, a la vez que presentó una disminución respecto al grupo de ketamina 25 mg/kg. Asimismo, ketamina 25 mg/kg fue la única dosis que exhibió un aumento significativo de esta conducta desde el período de 0-20 al de 20-40 minutos.

Tabla 3. Conductas motoras provocadas por administración de ketamina (0-20 y 20-40 min)

	Patrón locomotor		Signos de ataxia			
	Movimiento desorganizado		Caídas torpes		No frenado	
	0-20 min	20-40 min	0-20 min	20-40 min	0-20 min	20-40 min
Control	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
Ketamina 10 mg/kg	0.0±0.0	0.5±0.2 ^{oo}	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.3±0.2
Ketamina 25 mg/kg	1.3±0.2 ^{****}	2.3±0.2 ^{****ooo}	2.6±1.2	2.1±1.1	0.1±0.1	0.8±0.2 ^{****ooo}
Ketamina 40 mg/ml	2.2±0.2 ^{****+//}	3.0±0.0 ^{****+//ooo}	22.2±8.5 ^{****+//}	27.2±8.9 ^{****+//}	0.8±0.2 ^{****+}	0.4±0.2 ^{^/}

Tabla 3. Efecto de ketamina 10, 25 y 40 mg/kg sobre el patrón locomotor y signos de ataxia durante todo el tiempo de registro dividido en períodos 0-20 y 20-40 min. Los resultados se encuentran expresados como la media ± EEM. ANOVA de dos vías seguido del test Newman-Keuls. *= vs control en mismo período de tiempo, += vs ketamina 10 mg/kg en mismo período de tiempo, /= vs ketamina 25 mg/kg en mismo período de tiempo, °= vs 20-40 minutos de la misma dosis. * = p < 0.05, ** = p < 0.01, *** = p < 0.001, += p < 0.05, +++ = p < 0.001, / = p < 0.05, /// = p < 0.001, °° = p < 0.01 °°° = p < 0.001.

La Tabla 4 muestra el efecto de la administración de las diferentes dosis de ketamina durante los primeros 20 minutos, sobre las conductas de exploración vertical y otras conductas motoras. Estas conductas fueron registradas durante este período de tiempo debido a problemas técnicos en la cuantificación *off-line*, que corresponde al período de 20-40 minutos.

Comenzando por el número de *rearings*, se observó una disminución significativa de los mismos en todas las dosis de ketamina respecto al control, con un número mayor de los mismos en la dosis de ketamina 10 mg/kg. Los *groomings* también presentaron diferencias significativas en todas las dosis de la droga administrada respecto al control, inversamente proporcional a la dosis. En particular, a dosis de ketamina 40 mg/kg se encontró una supresión completa de esta conducta. Por su parte, el número de *head weavings* no fue significativo pero demostró generar un aumento a partir de la dosis de ketamina 25 mg/kg. A su vez, la conducta de *flat body posture* demostró aumentar significativamente respecto al control tanto en ketamina 25 como 40 mg/kg. Esta última dosis también aumenta fuertemente respecto a las dosis 10 y 25 mg/kg.

Por último, el resto de las conductas que no fueron mencionadas no presentaron diferencias estadísticas significativas en sus valores.

Tabla 4. Otras conductas motoras provocadas por administración de ketamina (0-20 min).

0-20 min	<i>Rearings</i>	<i>Groomings</i>	Signos de ataxia	Estereotipias		<i>Flat body posture</i>
Tratamiento			Arrastrado de patas	<i>Head shakes</i>	<i>Head weavings</i>	
Control	38.8±5.4	11.8±1.6	0.0±0.0	2.6±1.3	0.0±0.0	0.0±0.0
Ketamina 10 mg/kg	13.0±2.3 ***	1.0±0.5 ***	0.0±0.0	3.5±2.9	0.0±0.0	0.3±0.2
Ketamina 25 mg/kg	11.3±1.3 ***	0.3±0.3 ***	0.0±0.0	0.4±0.3	0.6±0.6	1.1±0.3 **+
Ketamina 40 mg/kg	11.8±5.7 ***	0.0±0.0 ***	0.0±0.0	0.0±0.0	1.6±0.8	2.6±0.2 ***+++////

Tabla 4. Efecto de ketamina 10, 25 y 40 mg/kg sobre la conducta exploratoria vertical, *groomings*, el patrón locomotor, signos de ataxia, esteriotipias y conducta de *flat body posture* durante los primeros 20 minutos de registro. Los resultados se encuentran expresados como la media ± EEM. ANOVA de una vía seguido del test Newman-Keuls. *= vs control, += vs ketamina 10 mg/kg, /= vs ketamina 25 mg/kg. **= p< 0.01, ***= p<0.001, += p< 0.05, +++= p<0.001, ///= p<0.001.

Evaluación del efecto comportamental de ketamina en el modelo de memoria LT.

En este caso, se evaluó el efecto sobre las funciones cognitivas de ketamina en el modelo de LT. Para ello, se eligió la dosis de 10 mg/kg a partir de los resultados del objetivo anterior, ya que ésta no generó efectos locomotores característicos del antagonismo NMDA que pudiesen interferir con la *performance* del animal en este modelo.

En la Figura 9A puede advertirse que el grupo tratado con ketamina a la dosis seleccionada demostró tener durante el primer día una LT1 similar al grupo control. Durante el día 2, los controles disminuyen su tiempo de latencia (LT2) de manera significativa respecto a su LT1, demostrando la correcta adquisición de la tarea realizada. En contraposición, los animales tratados con ketamina mostraron una LT2 levemente mayor en comparación con el grupo control en el mismo día, y un leve cambio en la LT2 respecto a su propia LT1. Sin embargo, la diferencia entre ambos grupos experimentales en LT2 no alcanzó significancia estadística, por lo que no se observa un efecto amnésico. Por otro lado, tanto el grupo control como el tratado disminuyeron su LT3 respecto a su propio LT1, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los LT3 de ambos grupos.

Previo al registro del parámetro latencia de transferencia en el día 1 (ver Esquema 2), se registró la actividad locomotora en CA durante 5 minutos (Fig. 9B). Se confirmó que a esta dosis, la ketamina no indujo hiperactividad locomotora.

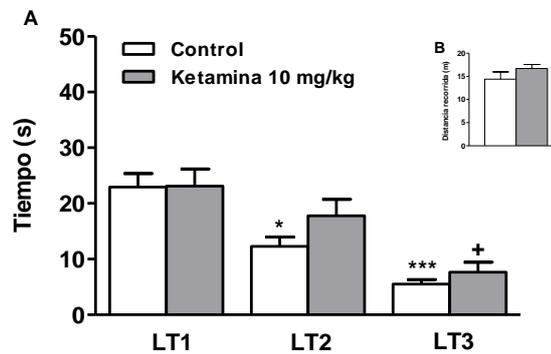


Figura 9 A-B: Efecto de ketamina 10 mg/kg sobre Latencia de Transferencia **(A)** y la actividad locomotora (m) en CA durante 5 minutos **(B)**. Los resultados se encuentran expresados como la media \pm EEM de los animales inyectados con ketamina 10 mg/kg o agua destilada (control). ANOVA de dos vías seguido del test Newman-Keuls entre los tres días consecutivos para ambos tratamientos. * = vs LT1 control, += vs LT2 ketamina 10 mg/kg. * = $p < 0.05$, *** = $p < 0.001$, + = $p < 0.05$.

Por otro lado, la Tabla 5 muestra el número de conductas de *head dipping* inducidas por la inyección s.c. de ketamina 10 mg/kg en el modelo LT. Para esta conducta, se observaron diferencias significativas durante el primer día entre los grupos tratados y controles. La inyección de ketamina 10 mg/kg indujo un aumento en su número. En los días siguientes, esta conducta disminuyó significativamente durante LT2 y LT3 respecto a LT1 para ambos tratamientos. Aún así, entre LT2 y LT3 del grupo control no se presentaron variaciones significativas. Lo mismo sucedió para el grupo de ketamina 10 mg/kg entre LT2 y LT3. Tampoco se presentaron variaciones en esta conducta al comparar los grupos control y tratado en LT2 y LT3. No se observaron variaciones en otros tipos de conductas.

Tabla 5. Conducta de *head dipping* inducida por la administración de ketamina 10 mg/kg en el modelo LT.

	Tratamiento	Nº <i>Head dipping</i>
LT1	Control	3.3±0.3
	Ketamina 10 mg/kg	5.5±1.0 *
LT2	Control	1.0±0.3 +
	Ketamina 10 mg/kg	2.6±0.6 °°
LT3	Control	0.5±0.2 +
	Ketamina 10 mg/kg	0.7±0.3 °°°

Tabla 5. Efecto de ketamina 10 mg/kg en la conducta de *head dippings* en el modelo LT. Los resultados se encuentran expresados como la media ± EEM. ANOVA de dos vías seguido del test Newman-Keuls entre los días consecutivos para ambos tratamientos. *= vs control mismo día, += vs LT1 control, ° = vs LT1 ketamina 10 mg/kg. * = p< 0.05, + = p< 0.05, °° = p< 0.01, °°° = p<0.001.

Evaluación del efecto comportamental de ketamina en el modelo de memoria NOR

Para cumplir con el tercer objetivo se realizó una nueva serie de experimentos que permitieron poner a punto el modelo NOR y evaluar el efecto de ketamina 10 mg/kg sobre la capacidad de generar memoria en la rata. La dosis de ketamina utilizada fue elegida bajo el mismo criterio que en el objetivo específico 2.

Fase de Habitación

Durante la fase de Habitación (ver Esquema 3), se registró la actividad locomotora durante las dos sesiones realizadas de 10 min cada una. Se observó una disminución estadísticamente significativa de este parámetro durante la segunda sesión (Fig. 10A).

A su vez, al desglosar estas sesiones en dos intervalos de 5 minutos (Fig. 10 B y C), puede verse que la actividad locomotora disminuye significativamente en el segundo período respecto al primero para ambas sesiones.

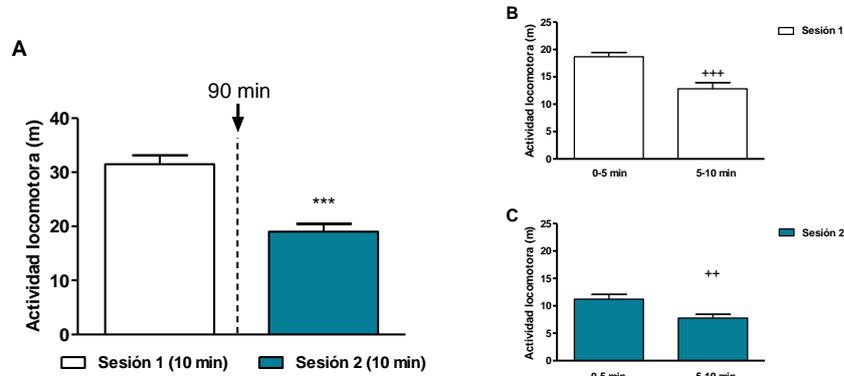


Figura 10 A-C: Distancia recorrida (m) de las dos sesiones de la fase de habituación del modelo NOR, durante todo el tiempo de registro (A), de la sesión 1 a intervalos de 5 minutos (B) y de la sesión 2 a intervalos de 5 minutos (C). Los resultados se encuentran expresados como la media \pm EEM de los animales. *Student t-test*. * = vs sesión 1, + = vs 0-5 min misma sesión. *** = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, +++ = $p < 0.001$.

Asimismo, se cuantificaron las conductas de *rearings* y *groomings* de la misma forma que la distancia recorrida. Se observó que ambas conductas demostraron tener diferencias significativas en la sesión 2 respecto a la sesión 1 durante el registro completo de cada sesión (Fig. 11A y 11D), donde los *rearings* disminuyen y los *groomings* aumentan en número.

Al desglosar el registro de las sesiones en dos períodos de 5 min, se observó que en el segundo período de la primera sesión, los *rearings* (Fig. 11B) y *groomings* (Fig. 11E) disminuyen y aumentan de forma estadísticamente significativa, respectivamente. Sin embargo, en la segunda sesión y en el mismo período de tiempo, solamente los *rearings* (Fig. 11C) mostraron una disminución significativa, mientras que los *groomings* (Fig. 11F) no demostraron cambios.

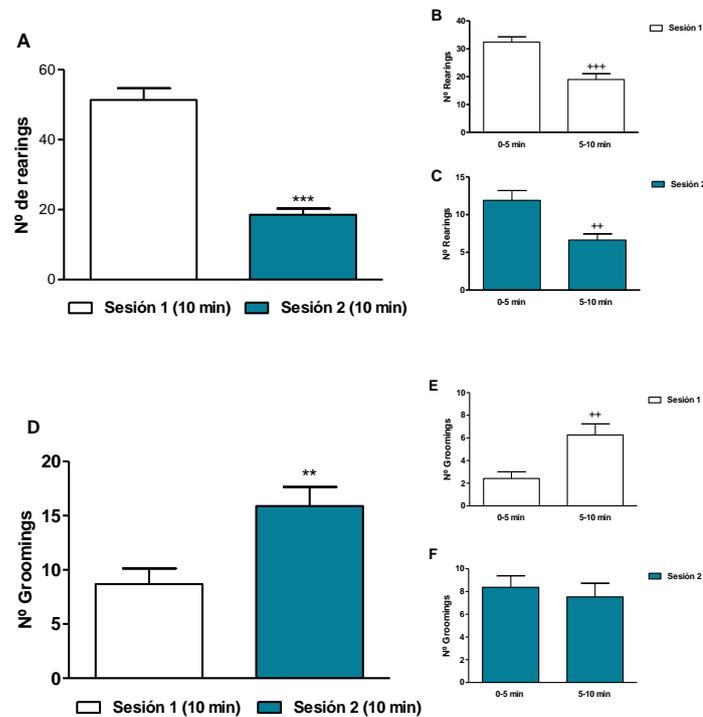


Figura 11 A-F: Conductas registradas durante las dos sesiones de la fase de habituación: *rearings* durante los 10 minutos de cada sesión (A), o desglosado en dos períodos de 5 minutos para la sesión 1 (B) o para la sesión 2 (C), y *groomings* durante los 10 minutos de cada sesión (D) o desglosado en dos períodos de 5 minutos para la sesión 1 (E) o para la sesión 2 (F). Los resultados se encuentran expresados como la media \pm EEM de los animales. *Student t-test*. * = vs sesión 1, + = vs 0-5 min misma sesión. ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$, ++ = $p < 0.01$, +++ = $p < 0.001$.

Fase de Training

Durante la fase de *training*, la actividad locomotora, los *rearings* y *groomings* fueron cuantificados con el fin de evaluar la selección de los objetos y el efecto de ketamina en esta fase. Pudo verse que la dosis de ketamina utilizada no alteró la actividad locomotora (Fig. 12A) ni los *rearings* (Fig 12B) en el modelo, aunque sí disminuyó significativamente los *groomings* (Fig. 12C).

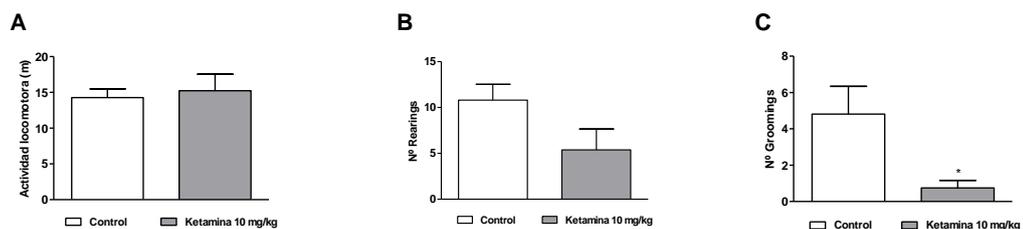


Figura 12 A-C: Efecto de ketamina 10 mg/kg en la actividad locomotora (m) (A), *rearings* (B) y *groomings* (C) durante la fase de *training* en el modelo NOR. Los resultados se encuentran expresados como la media \pm EEM de los animales. *Student t-test*. * = vs control. * = $p < 0.05$.

A su vez, durante esta fase también se cuantificó el tiempo total de exploración para ambos objetos. En la Figura 13A, puede apreciarse que los animales control como los tratados demostraron tener tiempos de exploración similares, sin observarse diferencias significativas. Además, se observó que el tiempo de exploración para ambos objetos (A y A+) son similares para ambos grupos experimentales (Fig. 13B).

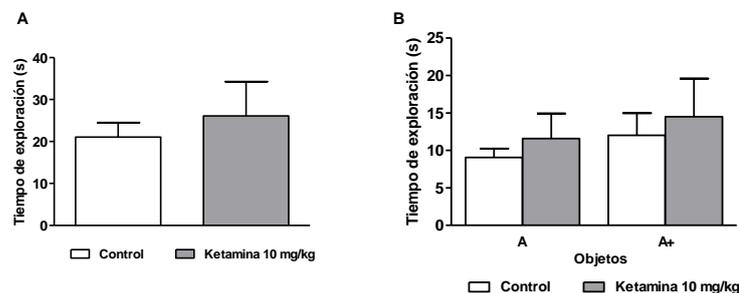


Figura 13 A-B: Efecto de ketamina 10 mg/kg en el tiempo de exploración total de ambos objetos en total (A) y de cada objeto independientemente (B) durante la fase de *training* del modelo NOR. La letra A representa al objeto que permanece igual durante la fase *test* (objeto conocido) y A+ el objeto que será cambiado por un objeto nuevo durante la misma. Los resultados se encuentran expresados como la media \pm EEM de los animales. ANOVA de dos vías seguido del test Newman-Keuls o *Student t-test*. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales.

Fase de Test

En esta fase, se evaluaron los parámetros: % tiempo de exploración para cada objeto e índice de discriminación como indicadores de la función cognitiva. Ambos parámetros se obtuvieron a partir del registro de los tiempos de exploración de los objetos A y B (ver materiales y métodos).

Al evaluarse el parámetro % tiempo de exploración de cada objeto (Fig. 14A), se encontró un aumento significativo de la exploración del objeto desconocido (B) respecto al conocido (A) tanto para los animales control como para los animales tratados con ketamina 10 mg/kg, sin observarse diferencias entre ambos grupos experimentales.

En cuanto al índice de discriminación (Fig. 14B), tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos.

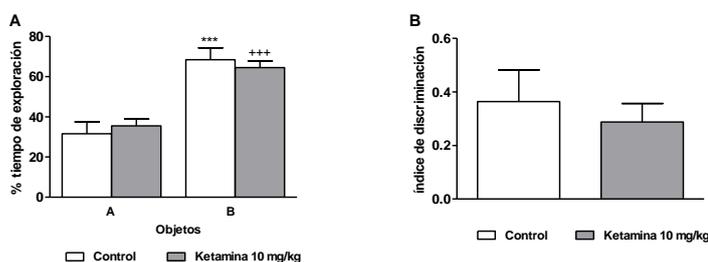


Figura 14 A-B: Efecto de ketamina 10 mg/kg en el % tiempo de exploración de ambos objetos (A, conocido; B, nuevo) (**A**) e índice de discriminación (**B**) en la fase *test* del modelo NOR. Los resultados se encuentran expresados como la media \pm EEM de los animales. ANOVA de dos vías seguido del test Newman-Keuls o *Student t-test*. * = vs % tiempo de exploración objeto A control, + = vs % tiempo de exploración objeto A ketamina 10 mg/kg. *** = $p < 0.001$, +++ = $p < 0.001$.

DISCUSIÓN

El presente trabajo de pasantía se centró en el estudio del efecto de la ketamina sobre la actividad locomotora y las conductas asociadas al síndrome conductual motor descrito para los antagonistas NMDA y sobre la función cognitiva evaluada en dos modelos de memoria.

Evaluación del efecto de ketamina sobre la actividad locomotora

En la literatura está ampliamente descrito que los antagonistas NMDA inducen una hiperactividad en animales de laboratorio. En particular, trabajos específicos de nuestro laboratorio han descrito de forma más amplia el síndrome conductual motor que induce la administración del antagonista NMDA más potente, el MK-801⁵². Sin embargo, no se había descrito el síndrome completo para la ketamina.

A partir de los resultados obtenidos, puede observarse que las dosis de ketamina empleadas generaron los efectos conductuales característicos del síndrome conductual motor inducido por otros antagonistas NMDA descritos en la literatura^{52,68-70}. Entre ellos se encuentran: hiperactividad locomotora, disminución del número de *rearings* y *groomings*, desorganización del movimiento y aumento de signos de ataxia (no frenado y caídas torpes). La mayoría de ellos mostraron dependencia directa con la dosis, siendo la dosis mayor la que indujo los cambios más notorios o severos.

Por lo tanto, en cuanto con lo reportado anteriormente, las alteraciones en las conductas de actividad locomotora, *groomings* y movimiento desorganizado aparecían de forma dosis-dependiente, tal como fue ya caracterizado para el MK-801⁵²⁻⁵⁴.

A pesar de lo ya mencionado, el síndrome conductual inducido por ketamina a las dosis empleadas agrega una nueva conducta que no se había tomado en cuenta en el laboratorio para MK-801: el *flat body posture*. Esta conducta clásicamente se relaciona con una alta actividad de los circuitos serotoninérgicos, por lo cual se registra como una de las conductas del síndrome serotoninérgico⁷¹. Este síndrome puede ser inducido por la sobredosis de una sola droga, o por el consumo de

drogas que aumenten los niveles de serotonina. Esta conducta fue dosis-dependiente. Asimismo, se sabe que las conductas de *head shakes* y *head weavings* se encuentran moduladas por este tipo de circuitos⁷². Cabe destacar que la conducta de *head weavings* es atípica del animal y solo aparece bajo el efecto de ciertas drogas, como la ketamina como el MK-801, sugiriendo una interacción entre el sistema serotoninérgico y glutamatérgico.

Al mismo tiempo, es necesario notar que existen otras conductas "típicas" de antagonista NMDA que han sido vastamente vinculadas en la literatura a la activación de otros circuitos neurales específicos. En particular, la aparición de *rearings*, *groomings* e hiperactivación locomotora se ha vinculado con la activación del sistema dopaminérgico^{73,74}. Esto se ha comprobado gracias a estudios realizados con agonistas indirectos como cocaína que estimula la generación de dichas conductas. En el caso de este trabajo, lo que sucedió con las conductas de *rearings* y *groomings* frente al aumento de la dosis, podría asociarse al gran aumento en la actividad locomotora horizontal, producido por el bloqueo de los receptores NMDA.

Por lo tanto, ambos sistemas indicados parecen estar afectados por el antagonismo del receptor NMDA, llevando a la exacerbación o inhibición de las conductas mencionadas. Estos efectos evidencian la estrecha relación que existe entre el sistema de neurotransmisión glutamatérgico y los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos en circuitos de control motor. Por lo tanto, la acción ya conocida de los antagonistas NMDA desencadena la activación de otros sistemas de neurotransmisión que pueden encontrarse implicados en la enfermedad, como ya ha sido propuesto por varios autores⁷⁵⁻⁷⁷.

A su vez, en algunos casos es interesante advertir que los efectos de la droga se hacen más o menos visibles en el segundo período de tiempo (20-40 minutos), como sucede claramente para el movimiento desorganizado. Esto podría indicar una evolución del efecto farmacológico de ketamina en el tiempo, lo cual podría ser importante para considerar al momento de realizar experimentos conductuales y para identificar los circuitos que subyacen a esta conducta.

Evaluación del efecto comportamental de la ketamina en el modelo de memoria LT.

Como ya fue mencionado anteriormente, los antagonistas NMDA son capaces de ocasionar efectos amnésicos que alteran la generación de memorias. En particular, se ha descrito que la ketamina induce déficit en la memoria en diferentes modelos⁷⁸⁻⁸⁰. Sin embargo, su efecto no había sido evaluado en la adquisición de la tarea en el modelo de LT.

En este caso, con el LCE se determinó la capacidad de aprendizaje de los animales bajo el efecto de ketamina 10 mg/kg. Esta dosis fue escogida a partir del resultado del objetivo específico 1, considerando que no generaba un efecto locomotor que pudiese interferir en la tarea del modelo de LT a registrar.

Al evaluarse el parámetro tiempo de transferencia, se demostró que los animales controles realizaron la tarea que se esperaba observar en el modelo. Por su parte, para aquellas drogas capaces de inducir un efecto amnésico, se espera registrar un aumento de LT2 y una diferencia significativa con la LT2 de los animales control. El tratamiento con ketamina a la dosis de 10 mg/kg, no fue capaz de generar un claro efecto amnésico en el modelo de LT. Por lo tanto, se puede concluir que la dosis de ketamina utilizada no fue efectiva en la generación del efecto amnésico esperado. Aunque en ciertos estudios se han testeado dosis menores de ketamina^{81,82}, en animales o modelos diferentes a los utilizados en este trabajo, es posible esperar que dosis menores a 10 mg/kg de ketamina sean efectivas en el modelo de LT. Se deberán ensayar nuevos experimentos para confirmar dicha hipótesis.

Al evaluar lo que sucedió durante el tercer día para los animales control, donde volvió a evocarse la tarea aprendida durante el primer día, cumpliendo así con lo esperado. Por su parte, para los animales tratados se demostró que la droga no generó un posible efecto residual, dado que fueron capaces de evocar la tarea aprendida.

A su vez, se evaluó la conducta de *head dipping*. Esta conducta se utiliza como un indicador de la ansiedad del animal en el plus-maze⁸³. Entonces, durante el día 1 para los animales tratados se generó una disminución en su ansiedad, sugiriendo que la ketamina pudo generar efectos ansiolíticos. Sin embargo, hay que considerar la evolución que se observó durante los días sucesivos para ambos grupos, ya que el número de *head dippings* se redujo en los animales expuestos repetidamente al modelo.

Evaluación del efecto comportamental de ketamina en el modelo de memoria NOR.

Durante la tercera fase de este trabajo, se puso a punto el modelo NOR en el Laboratorio, y se evaluó el efecto de ketamina 10 mg/kg en el mismo. Varios trabajos han reportado el efecto de ketamina en las funciones cognitivas aplicadas a este modelo^{32,35,64}.

Habitación

Durante esta fase, se demostró que las condiciones para la realización del experimento fueron las óptimas y que utilizando el protocolo descrito los animales fueron capaces de adaptarse con éxito.

Training

Durante el *training*, los cambios que se observaron fueron los esperables dado que los animales tratados con ketamina respecto a los animales del grupo control, tanto para la actividad locomotora como para los *groomings*, manifestaron las mismas variaciones provocadas por la droga observadas durante el objetivo 1. El número de *rearings* en los animales tratados con ketamina reflejan la correcta habitación al modelo.

Al analizar los tiempos de exploración total de cada objeto (Fig. 13A), pudo verificarse que ketamina a la dosis inyectada no generó otros efectos que pudiesen interferir con la capacidad exploratoria del animal hacia los objetos. A continuación, si se consideran a los objetos de forma individual, no se encontró ningún tipo de preferencia de un objeto frente a otro.

De esta forma, se concluye que la segunda fase que compete a este modelo fue efectuada con éxito: los objetos eran adecuados, el modelo no genera una preferencia por alguno de ellos y la ketamina a esta dosis permite que se dé una exploración similar a lo que sucede en el control.

Test

Por último, en esta fase se evalúa la capacidad del animal de evocar la tarea. Como era de esperarse, los resultados indican que los animales del grupo control fueron capaces de explorar por más tiempo al objeto nuevo y reconocer como objeto familiar al que habían sido expuestos durante la fase del *training*. Aún así, en los trabajos que utilizan este tipo de modelo, los índices de discriminación para los animales control suelen ser de valores mayores a 0.4. En este caso, nuestra media se encuentra por debajo del mismo. Este detalle puede deberse a condiciones particulares del cuarto de experimentación, como podría ser diferencias en la dispersión de luz dentro de la caja.

Por otro lado, se demostró que la dosis de ketamina utilizada no generó el efecto amnésico característico que ha sido descrito en este modelo. Por lo tanto, al igual que lo concluido para el modelo de LT, se debería testear otra dosis de ketamina con el fin de observar la alteración cognitiva esperada. Existen ciertos trabajos que han demostrado que a dosis menores de ketamina, el efecto amnésico puede ser concebido. Un ejemplo de esto es con dosis de ketamina de 1-3 mg/kg administradas vía intraperitoneal en ratas⁸¹, mientras que en otros modelos animales como conejos se logró a dosis de 1 mg/kg s.c.⁸⁴.

En suma, puede decirse que los animales se habituaron con éxito al modelo en la fase de habituación. Durante la fase de *training*, los animales demostraron no tener preferencia por ninguno de los objetos y que el patrón locomotor inducido por la droga no afectó la capacidad de exploración del animal. Finalmente, en la fase de *test*, los controles demostraron actuar de acuerdo a lo esperado, con una mayor preferencia hacia el objeto desconocido en relación al familiar. Por su parte, los animales tratados con la dosis de ketamina utilizada no generaron el efecto amnésico en este modelo.

Ventajas de la validación de dos modelos de memoria en el laboratorio

En este trabajo, se implementaron dos modelos de memoria: LT y NOR. Tanto el modelo de LT como el de NOR presentan ciertas características en común: ambos modelos no necesitan de recompensa ni aversión, son económicos en costos y tiempo^{60,63} y miden memorias a corto, mediano y largo plazo^{85,86}. Además, ambos son sensibles a antagonistas NMDA^{61,87}.

A pesar de estos puntos en común, ambos modelos presentan características particulares. Por un lado, el modelo de LT evalúa memoria y aprendizaje espacial⁸⁸, y la actuación del animal en el modelo depende de sistemas hipocampales, que a su vez dependen de los niveles de la proteína BDNF (brain derived neurotrophic factor, parámetro molecular asociado al aprendizaje), lo cual ha sido estudiado recientemente en el laboratorio donde realicé mi pasantía⁸⁹. Por otro lado, el NOR evalúa memoria de reconocimiento de objeto, memoria episódica⁶⁵ y, algunos autores, establecen que también evalúa memoria de trabajo. A su vez, se han asociado ciertas áreas cerebrales al *performance* de los animales en este modelo: el núcleo de Accumbens, hipocampo y corteza cerebral, entre otras⁹⁰.

Por lo tanto, ambos modelos son capaces de evaluar, con bajo costo de tiempo y dinero, distintos tipos de memoria. Esto confiere una ventaja importante, ya que se complementan el uno al otro y permiten evaluar de forma más completa las diferentes dimensiones de los trastornos cognitivos de la esquizofrenia.

CONCLUSIONES

El desarrollo de esta tesina permitió alcanzar las siguientes conclusiones:

- 1) Se caracterizaron con éxito los efectos comportamentales de la administración sistémica de ketamina 10, 25 y 40 mg/kg en el modelo CA. Ellos concuerdan con los reportados en la literatura.
- 2) Se puso a punto el modelo NOR en el laboratorio. De esta forma se sientan las bases para perpetuar su uso en el laboratorio.
- 3) La dosis de ketamina utilizada en ambos modelos de memoria (LT y NOR) no generó las alteraciones esperadas en la función cognitiva. Se deberá probar una dosis menor para evaluar sus efectos amnésicos en los modelos.

REFERENCIAS

1. Javitt, D. C. Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr. J. Psychiatry Relat. Sci.* **47**, 4-16 (2010).
2. Hopper, K. Rethinking social recovery in schizophrenia: What a capabilities approach might offer. *Soc. Sci. Med.* **65**, 868-879 (2007).
3. Lewis, D. a & Lieberman, J. a. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* **28**, 325-334 (2000).
4. Anthes, E. Ageing: Live faster, die younger. *Nature* **508**, S16-S17 (2014).
5. Van Haren, N. E. M. *et al.* The genetic and environmental determinants of the association between brain abnormalities and schizophrenia: The schizophrenia twins and relatives consortium. *Biol. Psychiatry* **71**, 915-921 (2012).
6. Tsuang, M. Schizophrenia: Genes and environment. *Biol. Psychiatry* **47**, 210-220 (2000).
7. Modinos, G. *et al.* Molecular genetic gene-environment studies using candidate genes in schizophrenia: A systematic review. *Schizophr. Res.* **150**, 356-365 (2013).
8. Altamura, C., Fagiolini, A., Galderisi, S., Rocca, P. & Rossi, A. Schizophrenia today : epidemiology , diagnosis , course and models of care. *J. Psychopathol.* **20**, 223-243 (2014).
9. Bassett, a. S., Scherer, S. W. & Brzustowicz, L. M. Copy Number Variations in Schizophrenia : Critical Review and New perspectives on concepts of genetics and disease. *Am. J. Psychiatry* **167**, 899-1010 (2010).
10. Gill, M., Donohoe, G. & Corvin, a. What have the genomics ever done for the psychoses? *Psychol. Med.* **40**, 529-540 (2010).
11. Harrison, P. J. & Harrison, P. J. The neuropathology of schizophrenia: A critical review of the data and their interpretation. **122**, 593-624 (1999).
12. Moran, M. E., Pol, H. H. & Gogtay, N. A family affair: Brain abnormalities in siblings of patients with schizophrenia. *Brain* **136**, 3215-3226 (2013).

13. Kapur, S. & Seeman, P. Does fast dissociation from the dopamine D2 receptor explain the action of atypical antipsychotics?: A new hypothesis. *Am. J. Psychiatry* **158**, 360-369 (2001).
14. Meltzer, H. Y. & McGurk, S. R. The Effects of Clozapine, Risperidone and Olanzapine on Cognitive Function in Schizophrenia. 233-256 (1994).
15. Ross, C., Margolis, R., Reading, S., Pletnikov, M. & Coyle, J. Neurobiology of Schizophrenia. *Neuron* **52**, 139-153 (2006).
16. Miyamoto, S., Duncan, G. E., Marx, C. E. & Lieberman, J. a. Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol. Psychiatry* **10**, 79-104 (2005).
17. Kapur, S., Zipursky, R., Jones, C., Remington, G. & Houle, S. Relationship between dopamine D2 occupancy, clinical response, and side effects: A double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* **157**, 514-520 (2000).
18. Kane, J. M. The current status of neuroleptic therapy. *J. Clin. Psychiatry* **50**, 322-328 (1989).
19. Hagger, C., Buckley, P., Kenny, J. T., Friedman, L., Ubogy, D., & Meltzer, H. Y. Improvement in cognitive functions and psychiatric symptoms in treatment-refractory schizophrenic patients receiving clozapine. *Biol. Psychiatry* **34**, 702-712 (1993).
20. Leucht, S. *et al.* Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet* **373**, 31-41 (2009).
21. Bailly, D. Antidepressant use in children and adolescents. *Arch. Pediatr.* **16**, 1415-1418 (2009).
22. Jose Ma. J. Alvir, Jeffrey A. Lieberman, Allan Z. Safferman, Jeffrey L. Schwimmer, J. A. S. Clozapine-Induced Agranulocytosis. Incidence and Risk Factors in the United States. *N. Engl. J. Med.* **329**, 162-167 (1993).
23. Kapur, S. *et al.* 5-HT₂ and D2 receptor occupancy of olanzapine in schizophrenia: A PET investigation. *Am. J. Psychiatry* **155**, 921-928 (1998).

24. Horacek, J. *et al.* Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs and the neurobiology of schizophrenia. *CNS Drugs* **20**, 389-409 (2006).
25. 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.* **93**, 9235-9240 (1996).
26. Weinberger, D. R., Aloia, M. S., Goldberg, T. E. & Berman, K. F. The frontal lobes and schizophrenia. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* **6**, 419-427 (1994).
27. Howes, O. D. & Kapur, S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: Version III - The final common pathway. *Schizophr. Bull.* **35**, 549-562 (2009).
28. Nakazawa, K. *et al.* GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology* **62**, 1574-1583 (2012).
29. Aghajanian, G. K. & Marek, G. J. Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res. Rev.* **31**, 302-312 (2000).
30. Lisman, J. E. *et al.* Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci.* **31**, 234-242 (2008).
31. Lahti, A. C., Weiler, M. a., Michaelidis, T., Parwani, A. & Tamminga, C. a. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* **25**, 455-467 (2001).
32. Neill, J. C. *et al.* Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol. Ther.* **128**, 419-432 (2010).
33. Cioffi, C. L. Modulation of NMDA receptor function as a treatment for schizophrenia. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 5034-44 (2013).
34. Moggaddam, B. Recent basic findings in support of excitatory aminoacid hypotheses of schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **18**, 859-870 (1994).

35. Hou, Y. *et al.* Neuronal injury, but not microglia activation, is associated with ketamine-induced experimental schizophrenic model in mice. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **45**, 107-116 (2013).
36. Kessler, J.P., Chuang, K. R., Berchtold, N. C. & Cotman, C. W. Erratum to 'Spatial learning is delayed and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression inhibited by administration of MK-801 in rats' [*Neurosci. Lett.* 353 (2003) 95–98]. *Neurosci. Lett.* **369**, 85 (2004).
37. Geyer, M. a. & Ellenbroek, B. Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **27**, 1071-1079 (2003).
38. Brown, J. W., Whitehead, C. a., Basso, A. M., Rueter, L. E. & Zhang, M. Preclinical evaluation of non-imidazole histamine H3 receptor antagonists in comparison to atypical antipsychotics for the treatment of cognitive deficits associated with schizophrenia. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 1-16 (2012).
doi:10.1017/S1461145712000739
39. Paoletti, P. & Neyton, J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* **7**, 39-47 (2007).
40. Traynelis, S. *et al.* Glutamate Receptor Ion Channels: Structure, Regulation and Function. *Pharmacol. Rev.* **62**, 405-496 (2010).
41. Burnashev, N. & Szepietowski, P. NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders. *Curr. Opin. Pharmacol.* **20**, 73-82 (2015).
42. Frohlich, J. & Van Horn, J. D. Reviewing the ketamine model for schizophrenia. *J. Psychopharmacol.* **28**, 287-302 (2014).
43. Rowland, L. M. Subanesthetic ketamine: How it alters physiology and behavior in humans. *Aviat. Sp. Environ. Med.* **76**, (2005).
44. Li, J.-H. *et al.* To use or not to use: an update on licit and illicit ketamine use. *Subst. Abuse Rehabil.* 11 (2011).
doi:10.2147/SAR.S15458

45. City, S. L. Club Drugs: MDMA, Gamma-Hydroxybutyrate (GHB), Rohypnol, and Ketamine. (2004).
46. Pai, a. & Heining, M. Ketamine. *Contin. Educ. Anaesthesia, Crit. Care Pain* **7**, 59-63 (2007).
47. Mion, G. & Villeveille, T. Ketamine Pharmacology: An Update (Pharmacodynamics and Molecular Aspects, Recent Findings). *CNS Neurosci. Ther.* **19**, 370-380 (2013).
48. Hirota, K. & Lambert, D. G. Ketamine: its mechanism(s) of action and unusual clinical uses. *Br. J. Anaesth.* **77**, 441-444 (1996).
49. Berman, R. M. *et al.* Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol. Psychiatry* **47**, 351-354 (2000).
50. Frohlich, J. & Van Horn, J. D. Reviewing the ketamine model for schizophrenia. *J. Psychopharmacol.* **28**, 287-302 (2014).
51. Liao, Y. *et al.* Reduced dorsal prefrontal gray matter after chronic ketamine use. *Biol. Psychiatry* **69**, 42-48 (2011).
52. Scorza, M. C. *et al.* Prefrontal cortex lesions cause only minor effects on the hyperlocomotion induced by MK-801 and its reversal by clozapine. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **11**, 519-532 (2008).
53. Scorza, M. C., Castañé, A., Bortolozzi, A. & Artigas, F. Clozapine does not require 5-HT_{1A} receptors to block the locomotor hyperactivity induced by MK-801. Clz and MK-801 in KO1A mice. *Neuropharmacology* **59**, 112-120 (2010).
54. López Hill, X. & Scorza, M. C. Role of the anterior thalamic nucleus in the motor hyperactivity induced by systemic MK-801 administration in rats. *Neuropharmacology* **62**, 2439-2445 (2012).
55. López Hill, X. Aportes al estudio de las bases neurales de la sintomatología positiva de la esquizofrenia y de la acción terapéutica de clozapina sobre los trastornos cognitivos de la enfermedad. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (2012).
56. Meikle, M. N. Caracterización de las conductas inducidas por el antagonista NMDA, MK-801 en ratas. Tesina de grado. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemete Estable (2008).

57. Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Setem, J. & Morato, S. Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **41**, 135-140 (2008).
58. Archer, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. 205-235 (1973).
59. Pellow, S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety: are exploratory models of anxiety in rodents valid? *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* **8**, 557-565 (1986).
60. Itoh, J., Nabeshima, T. & Kameyama, T. Utility of an elevated plus-maze for the evaluation of memory in mice: effects of nootropics, scopolamine and electroconvulsive shock. *Psychopharmacology (Berl)*. **101**, 27-33 (1990).
61. Hlíák, Z. & Krejčí, I. MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice. *Behav. Brain Res.* **131**, 221-225 (2002).
62. Cruz, A. P., Frei, F. & Graeff, F. G. Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated plus-maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **49**, 171 (1994).
63. Antunes, M. & Biala, G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn. Process.* **13**, 93-110 (2012).
64. Goulart, B. K. *et al.* Ketamine impairs recognition memory consolidation and prevents learning-induced increase in hippocampal brain-derived neurotrophic factor levels. *Neuroscience* **167**, 969-973 (2010).
65. Ennaceur, a. & Meliani, K. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. III. Spatial vs. non-spatial working memory. *Behav. Brain Res.* **51**, 83-92 (1992).
66. Tricklebank, M., Forler, C. & Fozard, J. The involvement of subtypes of the 5-HT₁ receptor and of catecholaminergic systems in the behavioural response to 8-hydroxy-2- (di-n-propylamino)tetralin in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* **106**, 271-282 (1985).
67. Andiné, P. *et al.* Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 1393-1408 (1999).

68. Loscher, W. & Honack, D. The behavioural effects of MK-801 in rats: Involvement of dopaminergic, serotonergic and noradrenergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* **215**, 199-208 (1992).
69. Ögren, S. O. & Goldstein, M. Phencyclidine- and Dizoclipine-induced hyperlocomotion are differentially mediated. *Neuropsychopharmacology* **11**, 167-177 (1994).
70. Hiramatsu, M., Cho, A. K. & Nabeshima, T. Comparison of the behavioral and biochemical effects of the NMDA receptor antagonists, MK-801 and phencyclidine. *Eur. J. Pharmacol.* **166**, 359-366 (1989).
71. Habertzettl, R., Bert, B., Fink, H. & Fox, M. a. Animal models of the serotonin syndrome: A systematic review. *Behav. Brain Res.* **256**, 328-345 (2013).
72. Sandler, R. Concentration of norepinephrine in the hypothalamus of the rat in relation to the estrous cycle. *Endocrinology* **83**, 1383-1386 (1968).
73. Ushijima, I., Carino, M. a & Horita, a. Involvement of D1 and D2 dopamine systems in the behavioral effects of cocaine in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **52**, 737-741 (1995).
74. Starr, B. S. & Starr, M. S. Differential effects of dopamine D1 and D2 agonists and antagonists on velocity of movement, rearing and grooming in the mouse. Implications for the roles of D1 and D2 receptors. *Neuropharmacology* **25**, 455-463 (1986).
75. Carlsson, A., Waters, N., Waters, S. & Carlsson, M. L. Network interactions in schizophrenia-therapeutic implications **1,342-349** (2000).
76. Carlsson, A. *et al.* Interactions between monoamines, glutamate and GABA in schizophrenia: New Evidence. (2001).
77. Geyer, M. A. & Vollenweider, F. X. Serotonin research : contributions to understanding psychoses. 445-453 (2008). doi:10.1016/j.tips.2008.06.006
78. Smith, J. W. *et al.* A comparison of the effects of ketamine and phencyclidine with other antagonists of the NMDA receptor in rodent assays of attention and working memory. *Psychopharmacology (Berl)*. **217**, 255-269 (2011).

79. Wang, J. H., Fu, Y., Wilson, F. a W. & Ma, Y. Y. Ketamine affects memory consolidation: Differential effects in T-maze and passive avoidance paradigms in mice. *Neuroscience* **140**, 993-1002 (2006).
80. Lalonde, R. & Joyal, C. C. Effects of ketamine and L-glutamic acid diethyl ester on spatial and nonspatial learning tasks in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **44**, 539-545 (1993).
81. Pitsikas, N., Boultadakis, a. & Sakellaridis, N. Effects of sub-anesthetic doses of ketamine on rats' spatial and non-spatial recognition memory. *Neuroscience* **154**, 454-460 (2008).
82. Taffe, M. a, Da, S. a, Gutierrez, T. & Gold, L. H. Ketamine impairs multiple cognitive domains in rhesus monkeys. **68**, 175-187 (2002).
83. Dawson, G. R. & Tricklebank, M. D. Use of the elevated plus maze in the search for novel anxiolytic agents. *Trends Pharmacol. Sci.* **16**, 33-36 (1995).
84. Hoffman, K. L. & Basurto, E. One-trial object recognition memory in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is disrupted by NMDA receptor antagonists. *Behav. Brain Res.* **250**, 62-73 (2013).
85. Taglialatela, G. Taglialatela G , Hogan D , Zhang WR , Dineley KT . Intermediate and long term recognition memory deficits in Tg2576 mice are reversed with acute calcineurin inhibition NIH Public Access. (2009). doi:10.1016/j.bbr.2008.12.034
86. Baamonde, C., Ferna, A., Dierssen, M. & Toben, A. Impaired short- and long-term memory in Ts65Dn mice , a model for Down syndrome. **247**, 171-174 (1998).
87. Meltzer, H. Y., Rajagopal, L., Huang, M., Oyamada, Y. & Kwon, S. Translating the N -methyl- D -aspartate receptor antagonist model of schizophrenia to treatments for cognitive impairment in schizophrenia. 2181-2194 (2013). doi:10.1017/S1461145713000928
88. Rodgers, R. J., Johnson, N. J. T., Carr, J. & Hodgson, T. P. Resistance of experientially-induced changes in murine plus-maze behaviour to altered retest conditions. **86**, 71-77 (1997).
89. López, X., Richeri, A. & Scorza, C. Physiology & Behavior Measure of anxiety-related behaviors and hippocampal BDNF levels associated to the amnesic effect induced by MK-801 evaluated in the modified elevated plus-maze in rats. *Physiol. Behav.* **147**, 359-363 (2015).

90. Dere, E., Huston, J. P. & De Souza Silva, M. A. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **31**, 673-704 (2007).