

TESIS DOCTORAL
2017

Caracterización paramétrica de un modelo animal de activación inmunológica prenatal para su aplicación al estudio de la patología dual



Raquel Santos Toscano

Licenciada en Psicología

Programa de Doctorado en Psicología de la Salud

Directores: Dr. Alejandro Higuera Matas
Dr. Emilio Ambrosio Flores

TESIS DOCTORAL
2017

Caracterización paramétrica de un modelo animal de activación inmunológica prenatal para su aplicación al estudio de la patología dual



Raquel Santos Toscano

Licenciada en Psicología

Programa de Doctorado en Psicología de la Salud

Directores: Dr. Alejandro Higuera Matas
Dr. Emilio Ambrosio Flores

Agradecimientos por la financiación proporcionada por: Ministerio de Ciencia e Innovación (PSI2010-20355); Instituto de Salud Carlos III (Red de Trastornos Adictivos-RD06/001/0029); Plan Nacional sobre Drogas (2008-2010); Dirección General de Investigación de la Comunidad de Madrid (S-2011/BMD-2308; Consorcio I+D CANNAB-CM); y UNED (Plan de Promoción de la Investigación).

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a Emilio por darme la oportunidad de realizar mi doctorado en su grupo. Quiero trasladarte mi gratitud por confiar en mí, tanto en el ámbito científico como en el docente; por guiarme siempre con buenos consejos y por orientar mi carrera científica por el buen camino. Es digno de mención el esfuerzo que realizas diariamente para mantener la ciencia a flote en este país, pese a todas las dificultades que surgen.

A Alejandro, gracias por ser el director de esta tesis con todo el trabajo que ha implicado. De ti he aprendido que las dificultades pueden ser superadas con una fórmula tan elemental como a veces compleja de aplicar: el trabajo bien hecho. Tu labor ha sido fundamental en esta etapa final de redacción, en la que has puesto a mi disposición tu experiencia y conocimiento.

A Colin, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio en Londres durante mi estancia. También por transmitirme tu conocimiento acerca de tu trabajo, que es mucho, y por tratarme como una profesional, discutiendo ideas y dándome una amplia libertad para tomar decisiones. Y sobre todo, gracias por confiar en mí cuando se te presentó la ocasión de elegir a un investigador que trabajase contigo. También quiero agradecerte a ti y al Gobierno británico la oportunidad de poder acabar mi tesis con una digna remuneración. Un privilegio.

A Nuria del Olmo, a Javier Fernández Ruiz y a sus respectivos equipos de trabajo. Muchas gracias por acogerme en vuestros laboratorios y por tratarme como una más. Nuria, te estaré agradecida siempre por enseñarme lo poquito que sé de electrofisiología y que tanto me sirvió en mi estancia. Eres un ejemplo como persona y como profesional. Javier, gracias por permitirme acabar buena parte de mi trabajo en tu laboratorio y por preocuparte tanto por mi salud. También quiero agradecer a todo tu equipo tantos buenos recuerdos durante esos meses. Gracias por cuadrar los horarios de western blot, ayudarme con dudas, compartir agobios de tesis, por esas comidas tan divertidas y por hacerme sentir tan a gusto con vosotros.

Quiero expresar mi agradecimiento a mis compañeros. A los que siguen y a los que ya se fueron: Amparo, David, Lidia, Miguel, Mónica y Santiago. Gracias por haber dedicado parte de vuestro tiempo a enseñarme tantas cosas fuera y dentro del laboratorio. Navarrica uruguaya, te tengo especial cariño y admiración en muchos sentidos. Nos debemos unos días juntas, ya sea en Iruña o en Preston.

A los técnicos del laboratorio y del animalario. En especial, quiero agradecer a Rosa y Gonzalo todo el esfuerzo que durante dos años habéis realizado con los animales. Ambos leísteis, día tras día, las notas interminables que os escribía e hicisteis vuestro trabajo siempre con buen humor y la mejor disposición. Fuisteis mis manos y mis ojos en el animalario. Os estoy muy agradecida. Espero que consideréis parte de esta tesis como vuestra, pues así lo es. También quiero resaltar la inestimable ayuda de Alberto Marcos, siempre al pie del cañón con cualquier cosa que he necesitado. Tu paciencia para explicarme todo lo relacionado con la electroforesis capilar -pese a tu falta de tiempo- es digna de mención.

A toda la gente amiga de Preston, gracias por apoyarme y no dejarme caer en este duro año de espera e incertidumbre. Gracias por cuidarme tanto, como miembro de la pequeña familia que formamos fuera de nuestro país, y sobre todo por tantos buenos momentos que pasamos juntos; y obviamente por los que nos quedan. En especial quiero agradecer a Leti y Carol tantas noches

de vinos divagando.....no sé qué haría sin vosotras!

Gracias a mis chicos de la UNED: Javi, Marcos, Rober y Shi shir. Empezamos siendo compañeros de trabajo y ahora os habéis convertido en oso pander, cambodian, bestia parder y chichir, lo que viene siendo grandes amigos a los que tengo mucho cariño. Chicos, gracias por nuestros torneos de padel, clases de natación, días de escalada y de cometas, por nuestras fiestas, las que se saben cuándo empiezan pero no cuando acaban. Gracias por nuestro viaje a la India donde Shi shir nos abrió las puertas de su casa y su familia y donde además nosotros formamos nuestro pequeño núcleo de Priyancos. Gracias por compartir tanto de cada uno y hacerme sentir tan bien a vuestro lado. En definitiva, gracias por estar siempre ahí, para lo bueno y lo malo, antes cerca y ahora lejos. En especial quiero agradecer a Marcos tantos momentos y tan divertidos durante estos seis años. Gracias por explicarme una y mil veces lo mismo y siempre con una sonrisa, por enseñarme buena parte de lo que sé en el lab, por compartir fines de ratas, por ratitos de sol, terraza y desayunos y sobre todo por respetar mi TOC. Ha sido genial empezar simultáneamente esta aventura contigo!

A mis chicas de la UNED, gracias por quererme tanto y por dejar que yo os quiera igual. Por compartir logros y frustraciones; y por todos esos buenos momentos que pasamos juntas. Gracias por hacer posible que disfrute de vosotras pese a la distancia y siempre sea con tantas ganas y entusiasmo. Daniela, gracias por los buenos consejos que me trasladaste antes de afrontar la entrevista en la que obtuve mi actual trabajo. Natalia, gracias por esas palabras que siempre me aportan tanto y, sobre todo, por hacerme sentir siempre cerca, muy cerca. Inma, gracias por muchas cosas. Por escucharme diariamente, por compartir tiempo de pitis, haga frío o calor, por esas charlas eternas, por nuestros paseos en primavera hasta que nos cansábamos de andar (porque de hablar no), por ser incondicional y estar siempre ahí, por la motivación que despierta en mí verte trabajar, por la ayuda en la edición de mi tesis...y tantas cosas más.

A mis amigas de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM), gracias porque las raíces de esta tesis comenzaron allí, trabajando codo con codo con vosotras durante la carrera. Aprendiendo las unas de las otras y compartiendo apuntes, mini-clases particulares de estadística, cervezas, comidas de cafetería y ratitos de césped. Es increíble que después de tanto tiempo todo siga igual.

Gracias a mis niñas, las de toda la vida. Porque ya son 20 años los que llevamos juntas, creciendo y apoyándonos. Gracias por todo el cariño que me dais, por ser partícipes de todos los momentos importantes de mi vida, por animarme a conseguir mis sueños y por alegraros cuando alguno llega, sin importar los pasos en falso que pude dar. Gracias por quererme como soy....y aguantarme, que no es poco!

A Rubén, gracias por todo el apoyo que me has brindado desde que te conozco. Por los muchísimos y buenísimos momentos que hemos vivido, por tu buen humor y por tu forma de relativizar los problemas. También por insistir en que debía seguir el camino marcado hacia a mi objetivo -pese a las dificultades- y por enseñarme a ver el otro lado de las cosas, tanto de mi persona como de la vida en general. Buena parte de esta tesis también es gracias a ti.

A Dori, a quien tanto echo de menos. Gracias por ser como eres, un ejemplo de persona y de buen hacer. Gracias por compartir tanto durante tanto tiempo conmigo. Gracias por escucharme, por aprender a llevarme, por comprenderme, por regañarme, por quererme y sobre todo, gracias por dejarme aprender de ti. Aunque ahora sea más difícil, sabes que siempre estamos juntas, y ahora mucho más. Enhorabuena mamá!

A mi familia, mi madre y mi hermano, gracias por todo el amor que me otorgáis. Por la confianza que mostráis en cada decisión que tomo en mi vida, por cuidarme, mimarme e incluso consentirme; por convertir mis momentos difíciles en algo más liviano y hacerlo siempre con dulzura y amor. Por implicaros tanto en lo que me emociona, dedicando tiempo y ganas; por escucharme y reprenderme cuando lo he necesitado y, en definitiva, por hacer que cada día aprenda a ser mejor persona. Todo lo que soy, sin duda alguna, os lo debo a vosotros dos. Sin vuestro cariño y apoyo esta tesis no hubiera sido posible. Creo que no puedo quererlos más.

A mi padre, por heredar su carácter y su modo de entender la vida, por transmitirme la importancia del conocimiento, por hacerme creer que los sueños son posibles si luchas por ellos, por despertar en mí algo tan valioso como la curiosidad, el inconformismo y la autocrítica, por enseñarme a pensar por mí misma y a pensar en los demás con respeto y amor. Sé que estarías incluso más feliz que yo viendo esta tesis escrita y viéndome ahora, todo lo que soy también es gracias a ti.

Raquel

Índice

Clave de abreviaturas	1
Resumen	5
Abstract	7
Introducción	9
1. Esquizofrenia	12
1.1 Historia y definición de la esquizofrenia	12
1.2 Diagnóstico de la esquizofrenia	16
1.3 Epidemiología. Prevalencia e incidencia	17
1.4 Etiopatogenia de la esquizofrenia	18
1.4.1 Factores biológicos	18
1.4.2 Factores ambientales.	25
1.5 Modelos animales en esquizofrenia	29
1.5.1 Modelos genéticos	30
1.5.2 Modelos Farmacológicos.	32
1.5.3 Modelos del neurodesarrollo: prenatales, perinatales y neonatales.	33
1.6 Relevancia clínica de los biomarcadores en la esquizofrenia	40
2. Trastornos adictivos	44
2.1 Consideraciones diagnósticas	44
2.2 Adicción a la cocaína	44
2.3 Datos epidemiológicos	45
2.4 Bases neurobiológicas de la adicción	47
2.5 Modelos animales en adicción	49
3. Patología dual: esquizofrenia y adicción	51
3.1 Definición de patología dual	51
3.2 Epidemiología en patología dual	52
3.3 Circuitos neuronales implicados en esquizofrenia y adicción	53
3.4 Modelos animales en patología dual	55

Planteamiento de la Investigación **61**

Materiales y Métodos **67**

Chapter I. Rattus Norvegicus Wistar 69

1. Animals 69
2. Experimental design 69
3. Model validation 70
4. Prepulse inhibition of the acoustic startle response 71
5. Cocaine self-administration 72
6. Food self-administration 75
7. Data Analysis 76

Chapter II. Rattus Norvegicus Lewis 77

1. Animals 77
3. Model validation 77
4. Inhibition prepulse 77
5. Cocaine self-administration 77
6. Flow Cytometry 78
7. Data Analysis 82

Chapter III. Rattus Norvegicus Sprague Dawley 83

1. Animals 83
2. Experimental design 83
3. Model validation 83
4. Behavioural studies of schizophrenia-like symptoms 84
5. Impulsivity 86
6. Cocaine self-administration 87
7. Data Analysis 88

Resultados **91**

Chapter 1. Rattus Novergicus Wistar 93

- **Study 1**

1. LPS administration on alternate gestational days neither decreases body weight nor increases temperature of pregnant rats.	94
2. LPS administration to pregnant rats diminished startle response in their offspring.	94
3. LPS offspring showed a higher cocaine intake during the acquisition of cocaine self-administration.	95
4. LPS offspring did not show altered food-reinforced instrumental responding.	96

• Study 2

1. LPS administration on alternate gestational days neither decreases body weight nor increases temperature of pregnant rats.	99
2. Prenatal immune activation did not change PPI in adulthood.	99
3. Prenatal immune activation did not induce a potentiation of cocaine self-administration.	100

• Study 3

1. LPS administration did not induce any change in body weight or body temperature in pregnant rats.	103
2. Potentiated PPI in the offspring of LPS treated dams at PD 90 but not at PD 120.	103

Chapter 2. Rattus Novergicus Lewis 106

1. Daily LPS administration had no effects on the body weight of the dams.	108
2. LPS-exposed offspring showed a diminished PPI as compared to control rats in 120_16 trials.	108
3. LPS-exposed offspring did not show an increased intake of cocaine, motivation for its consumption or cue-induced drug seeking as compared to controls.	109
4. Fewer D3-expressing granulocytes in LPS-exposed offspring.	111

Chapter 3. Rattus Norvegicus Sprague 116

1. LPS administration increased TNF α levels in pregnant rats.	117
2. Maternal body weight and temperature are decreased by LPS administration.	117
3. Higher anxiety-like behaviour in the open field in females as compared to males.	119
4. LPS treated offspring did not show social interaction deficits.	120
5. Working memory deficits in LPS-exposed offspring.	121
6. Sex and treatment effects in startle response, its habituation and PPI.	122
7. Unaltered impulsivity in LPS-exposed offspring.	125
8. No differences were found in cocaine self-administration between groups.	125

Discusión	131
Capítulo I. Rattus Norvegicus Wistar	133
Capítulo II. Rattus Norvegicus Lewis	138
Capítulo III. Rattus Norvegicus Sprague Dawley	142
Conclusiones	149
Bibliografía	155

Índice de figuras y tablas

Figura 1. Datos globales del porcentaje de años vividos con discapacidad en los trastornos mentales

Figura 2. Heredabilidad en la esquizofrenia

Figura 3. Interacciones entre las vías glutamatérgicas y dopaminérgicas

Figura 4. Validez en los modelos animales de esquizofrenia

Figura 5. Mecanismos que median la infección prenatal, a corto y largo plazo, en la función cerebral

Figura 6. Representación de los potenciales biomarcadores para la esquizofrenia

Figura 7. Prevalencia del consumo de cocaína en el último año entre los adultos jóvenes (15-34) en la Unión Europea

Figura 8. Circuitos neuroquímicos en el refuerzo de las drogas

Figura 9. Principales hipótesis sobre la patología dual en la esquizofrenia

Figura 10. Caja de condicionamiento de Skinner

Figura 11. Gráfico representativo de los leucocitos separados por tamaño y complejidad

Figura 12. Histogramas de frecuencias de intensidad de fluorescencia para el receptor D3

Figura 13. Diseño experimental capítulo 1. Estudio 1 y 2

Figura 14. Peso y temperatura materna

Figura 15. Porcentaje de PPI en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 16. Conducta de autoadministración de cocaína en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 17. Conducta de autoadministración de comida en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 18. Peso y temperatura materna en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 19. Porcentaje de PPI en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 20. Conducta de autoadministración de cocaína en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 21. Diseño experimental capítulo 1. Estudio 3

Figura 22. Peso y temperatura materna

Figura 23. Porcentaje de PPI en ratas administradas con LPS o SAL en GD 90

Figura 24. Porcentaje de PPI en ratas administradas con LPS o SAL en GD 120

Figura 25. Diseño experimental capítulo 2.

Figura 26. Peso materno en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 27. Porcentaje de PPI en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 28. Conducta de autoadministración de cocaína en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 29. Curva dosis-respuesta, razón progresiva, extinción y recaída inducida por claves

Figura 30. Porcentaje de poblaciones celulares inmunológicas

Figura 31. Porcentaje de células inmunológicas CB2

Figura 32. Porcentaje de células inmunológicas D3

Figura 33. Porcentaje de células inmunológicas D5

Figura 34. Diseño experimental capítulo 3. Validación del modelo de MIA

Figura 35. Efectos del tratamiento de LPS sobre la expresión de TNF α

Figura 36. Incremento del peso materno tras la primera dosis de LPS en el GD 15

Figura 37. Temperatura materna medida en tres puntos temporales

Figura 38. Diseño experimental capítulo 3. Pruebas conductuales

Figura 39. Conducta de ansiedad medida con la prueba *open field* en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 40. Conducta de interacción social en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 41. Resultados de la memoria de trabajo medida con la prueba del laberinto en T en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 42. Porcentaje de PPI en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 43. Porcentaje de habituación de la respuesta de sobresalto en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 44. Porcentaje de PPI en la segunda serie de animales

Figura 45. Conducta impulsiva en ratas administradas con LPS o SAL

Figura 46. Conducta de autoadministración de cocaína, curva dosis-respuesta, extinción y recaída inducida por claves en ratas administradas con LPS o SAL

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en el estudio de citometría

Tabla 2. Valores correspondientes a las variables medidas en interacción social

Clave de abreviaturas

5-HT: 5-hidroxitriptamina o serotonina

Amg: amígdala

AMP: anfetamina, del inglés *Amphetamine*

ANOVA: análisis de la varianza, del inglés *Analysis of Variance*

BDNF: factor de crecimiento neurotrófico derivado del cerebro, del inglés *Brain-Derived Neurotrophic Factor*

CeA: núcleo central de la amígdala, del inglés *Central Amygdala*

COC: cocaína

CPf: corteza prefrontal

CPP: condicionamiento de preferencia al lugar, del inglés *Conditioned Place Preference*

D1R: receptores dopamina tipo 1

D2R: receptor de dopamina tipo 2

D4R: receptores dopamina tipo 4

DA: dopamina

DAT: transportador de dopamina, del inglés *Dopamine Transporter*

dB: decibelios

DSM: manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, del inglés *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*

EEG: electroencefalografía

FSC: detector de dispersión frontal, del inglés *Forward Scatter Channel*

GABA: ácido- γ -aminobutírico

GD: día gestacional, GD del inglés *Gestational Day*

Gln: glutamina

Glu: glutamato

H2N2: influenza virus tipo 2

Hp: hipocampo

HpV: hipocampo ventral

HSV-2: virus herpes simple, del inglés *Herpes Simplex Virus type 2*

ICD: clasificación internacional de enfermedades, del inglés *International Classification of Diseases*

IFN γ : interferón gamma

IL1 β : interleuquina 1 beta

IL2: interleuquina 2

IL6: interleuquina 6

IL8: interleuquina 8

ip: intraperitoneal
ISI: intervalo interestímulo, del inglés *interstimulus interval*
iv: intravenoso
KO: *knock-out*
L-DOPA: L-3,4 dihidroxifenilalanina
LPS: lipopolisacárido
MAM: acetato de metilazoximetanol, del inglés *Methylazoxymethanol Acetate*
MANOVA: análisis multivariado de la varianza, del inglés *Multivariate Analysis of Variance*
MD: privación materna, del inglés *Maternal Deprivation*
MIA: activación materna inmune, del inglés *Maternal Immune Activation*
MK-801: dizocilpina
NA⁺: sodio
NAcc: núcleo accumbens
NaCl: cloruro sódico
NGF: factor crecimiento nervioso, del inglés *Nerve Growth Factor*
NI: aislamiento neonatal, del inglés *Neonatal Isolation*
NMDA: N-metil-D-aspartato
NOR: test de reconocimiento del objeto novedoso, del inglés *Novel Object Recognition*
NVHL: lesión neonatal del hipocampo ventral, del inglés *Neonatal Ventral Hippocampal Lesion*
PANSS: escala de síntomas positivos y negativos, del inglés *Positive and Negative Syndrome Scale*
PBMC: células mononucleares de sangre periférica, del inglés *Peripheral Blood Mononuclear cells*
PBS: tampón fosfato salino, del inglés *Phosphate Buffered Saline*
PCP: fenciclidina, del inglés *Phencyclidine*
PD: día postnatal, del inglés *Postnatal day*
Poli I:C: ácido poliinosínico-policitidílico
PPI: inhibición prepulso, del inglés *Prepulse Inhibition*
RMN: resonancia magnética nuclear
SAL: salino
sc: subcutáneo
SCC: detector de dispersión lateral, del inglés *Side Scatter Channel*
SERT: transportador de serotonina, del inglés *Serotonin Transporter*
SNC: sistema nervioso central
St: estriado, del inglés *Striatum*
TLR4: receptores tipo toll 4, del inglés *Toll-Like Receptor 4*
TNF α : factor de necrosis tumoral alfa, del inglés *Tumor Necrosis Factor alpha*

TUS: trastorno por uso de sustancias

VP: pálido ventral, del inglés *Ventral Pallidum*

VTA: área tegmental ventral, del inglés *Ventral Tegmental area*

Resumen

Los trastornos del espectro esquizofrénico constituyen la psicopatología más debilitante y difícil de tratar. Son muchos los factores que contribuyen a tal dificultad, sin embargo uno de ellos merece especial atención, la comorbilidad con un trastorno adictivo, condición que se ha venido a denominar Patología Dual. Existe muy poca investigación desde el punto de vista preclínico sobre la Patología Dual, quizás en parte por la falta de buenos modelos animales de síntomas esquizofrénicos. El objetivo de la presente tesis doctoral ha sido por tanto realizar una caracterización exhaustiva de las variables que pudieran ser importantes en el establecimiento de un modelo de síntomas esquizofrénicos basado en el neurodesarrollo. Este modelo fue el de la activación inmunológica prenatal.

En primer lugar quisimos utilizar este modelo, tal como lo propusieron Borrell y colaboradores en el año 2002, para, por primera vez en la literatura de los modelos de activación inmunológica, estudiar la conducta de autoadministración de cocaína (considerado el mejor modelo animal de refuerzo por drogas de abuso y adicción a las mismas). Para tal fin, utilizamos la descendencia adulta de ratas Wistar gestantes expuestas a la endotoxina bacteriana lipopolisacárido (inyecciones subcutáneas durante todos los días de la gestación a una dosis de 2 mg/kg de LPS). Como prueba del establecimiento de la sintomatología “psicótica” en estos animales se realizaron pruebas de filtrado sensoriomotor (en el paradigma de la inhibición por prepulso de la respuesta de sobresalto). Posteriormente se realizaron los experimentos de autoadministración de cocaína bajo diferentes programas de reforzamiento (razón fija 1, 5, razón progresiva...) y también un control de autoadministración de comida. A pesar de algunos resultados preliminares interesantes la conducta de los animales en las diferentes pruebas, a lo largo de diferentes rondas de replicación, no fue consistente. Estos experimentos constituyen el Capítulo 1 de la presente tesis doctoral.

En el Capítulo 2, modificamos los parámetros de la activación inmunológica prenatal, tal y como sugieren Romero y colaboradores en 2010. Estas modificaciones consistieron en una reducción de la dosis (a 1 mg/kg) de la endotoxina y en los días de administración de la misma durante la gestación (días alternos en lugar de todos los días). De nuevo nos encontramos con un patrón de resultados poco consistentes en los estudios de inhibición por prepulso en las diferentes rondas de replicación que realizamos, y además la activación inmunológica prenatal no afectó a la conducta de autoadministración de cocaína. En este capítulo también quisimos hacer una prueba de concepto con el modelo y ver si podíamos encontrar algún biomarcador

periférico (dentro de un conjunto de células inmunes seleccionadas previamente) que pudiera ser sensible a los efectos de la activación inmunológica prenatal. Nuestros resultados en esta línea apuntaban a que una subpoblación de granulocitos, aquellos que expresaban el receptor dopaminérgico D3, difería en número en función de la activación inmunológica prenatal experimentada. A pesar de estos interesantes resultados, nuestro principal objetivo, encontrar un modelo fiable de síntomas esquizofrénicos, no se había cumplido.

En el Capítulo 3 de la presente tesis doctoral decidimos adoptar un modelo (descrito por Fortier y colaboradores en 2007) basado en una activación inmunológica más restringida en el tiempo (días gestacionales 15 y 16), de mayor intensidad (una dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ administrados por la vía intraperitoneal) y en una cepa de ratas (Sprague-Dawley) que muestra mayor estabilidad en la inhibición por prepulso. En este caso realizamos una caracterización más exhaustiva, estudiando los niveles de citoquinas proinflamatorias tras el desafío inmunológico en varios compartimentos del interfaz madre-feto (plasma sanguíneo e hipocampo materno, placenta, cerebro fetal y líquido amniótico). También estudiamos algunos comportamientos que son remi-niscentes de los síntomas negativos en la esquizofrenia (alteraciones en la interacción social y conductas relacionadas con la ansiedad) así como de los síntomas cognitivos de la enfermedad (alteraciones en la memoria de trabajo, usando el laberinto en T). Usando este modelo de activación inmunológica, obtuvimos déficits en la inhibición por prepulso, déficits en la memoria de trabajo y una potenciación en la habituación de la respuesta de sobresalto en las hembras expuestas a LPS durante la gestación. A pesar de que, a luz de estos resultados, y de la elevación de citoquinas, hipotermia y pérdida de peso en las madres tras el desafío, el modelo parecía estar funcionando, no encontramos diferencias significativas entre grupos en la autoadministración de cocaína en ninguna de las fases estudiadas (adquisición, extinción, recaída inducida por claves), ni alteraciones en la curva dosis-respuesta a la droga.

Estos resultados sugieren que, si bien las hipótesis del neurodesarrollo como origen etiológico de los trastornos del espectro esquizofrénico pueden tener base empírica, la comorbilidad observada entre estas patologías y los desórdenes adictivos no obedecería a un mecanismo biológico común, quizás factores que sólo operan en seres humanos (aspectos sociales, económicos, educativos...) son los que podrían explicar el complejo fenómeno de la Patología Dual.

Abstract

Schizophrenia-spectrum disorders are the most debilitating and difficult to treat of all the psychopathologies. There are several factors explaining such difficulties but one arises as particularly important, the comorbidity of the schizophrenic condition with an addictive disorder, a coexistence that has been termed as Dual Diagnosis. The preclinical research carried out on the Dual Diagnoses is scarce, probably due to the lack of animal models that adequately reproduce the schizophrenic symptoms. The main goal of this doctoral dissertation was to characterize those variables that might be crucial for the establishment of a proper neurodevelopment-based animal model of schizophrenic symptoms. Thus, the prenatal immune activation model was chosen to carry out the experiments of this Thesis.

First, we set out to employ the neurodevelopmental model, as described by Borell and colleagues in 2002, to study for the first time in a prenatal immune activation scenario, cocaine self-administration behaviour (arguably the best animal model of drug reinforcement and addiction). To attain such a goal, we used the adult offspring of Wistar rats treated with the bacterial endotoxin lipopolysaccharides during pregnancy (subcutaneous injections of LPS or saline at a dose of 2 mg/kg in each gestational day). As a proof for the proper establishment of the schizophrenia-like condition, we performed sensorimotor gating experiments (using the prepulse inhibition of the acoustic startle response) and subsequently we carried out the cocaine self-administration experiments under several schedules or reinforcement (fixed ratio 1, 5, progressive ratio...) and also a food self-administration control experiment. In spite of some promising preliminary results, the behaviour of the animals across the different replication experiments was not consistent. These experiments constitute the main body of Chapter 1 of the present doctoral dissertation.

In Chapter 2, we decided to modify the parameters of the immune activation as suggested by Romero and colleagues in 2010. These modifications included a reduction in the dose (from 2 mg/kg to 1 mg/kg), and the administration days (in these experiments we injected every other day). Again, we found an inconsistent pattern of results in the prepulse inhibition in several replication experiments and we did not observe any effects of the prenatal immune activation on cocaine self-administration. We also wanted to determine if we could find a peripheral biomarker that could be sensitive to the effects of the immune activation. Our results suggest that a specific

subpopulation of granulocytes, those expressing the D3 dopamine receptor, were altered in their numbers in the immune activated subjects. Despite these interesting results, our main aim, finding a reliable model of schizophrenia symptoms, had not been achieved.

In Chapter 3 of this doctoral thesis, we decided to adopt the a model (described by Fortier and colleagues in 2007) that employed a more time-restricted (occurring only at gestational days 15 and 16), more potent (100µg/kg immune activation intraperitoneally injected) immune activation protocol, and we also used a rat strain (Sprague-Dawley) that shows a more steady prepulse inhibition phenomenon. In these experiments we decided to carry out a more thorough exploration of the effects of the prenatal immune activation, looking at the levels of proinflammatory cytokines after the immune challenge in several compartments of the mother-foetus interface (that is, the plasma and hippocampus of the mothers, the placentas, foetal brains and amniotic fluid). We also studied some behaviours that are reminiscent of the negative (altered social interaction and anxiety-like responses) and cognitive (altered working memory capacities as measured in the T maze) symptoms. By using this immune activation protocol, we obtained a prepulse inhibition deficit, along with working memory deficits and increased habituation of the startle response. In spite of these behavioural results and the significant increase in the levels of cytokines, hypothermia and weight-loss after the challenge, we did not detect significant differences between the groups in cocaine self-administration behaviour (acquisition, extinction, cue-induced reinstatement) or in the dose-response curves.

These results suggest that, even if neurodevelopmental theories on the origin of schizophrenia may have an empirical basis, the comorbidity observed between this pathology and addiction does not seem to depend on a shared biological mechanism. Perhaps other factors that only operate in humans (such as the socio-economic or educational background) may be responsible for the phenomenon known as Dual Disorder.

Introducción



El concepto de patología dual es relativamente reciente. Durante muchos años, el diagnóstico de los diferentes trastornos mentales ha sido independiente del de abuso de drogas, pese a la coexistencia que existe entre ambos en muchos pacientes. A partir de la década de los noventa se ha manifestado mayor interés desde la clínica hacia esta población de pacientes duales, sin embargo este interés ha venido acompañado de cierta confusión por parte los profesionales y también desde los modelos de diagnósticos actuales. No obstante, el avance en este campo ha sido notorio y evidentemente la concienciación de los clínicos ha ayudado a que se tengan en cuenta consideraciones importantes para estos pacientes comórbidos, tanto en el diagnóstico como el tratamiento.

Desde la ciencia básica experimental el esfuerzo de los investigadores ha ido encaminado a diseñar modelos animales que sean capaces de reproducir la sintomatología de los trastornos psiquiátricos e hipotetizar sobre la etiopatogenia de la patología dual. A día de hoy, no son muchos los grupos de investigación básica que se han dedicado a esta tarea, además de cuestionarse en muchos casos la validez de los modelos animales desarrollados.

Por tanto, el objetivo principal de esta tesis ha sido comprobar qué modelo animal de activación maternal inmune (MIA) para el trastorno de la esquizofrenia es eficaz para el estudio de la patología dual.

A lo largo de la introducción se exponen las cuestiones más importantes para cada uno de los trastornos, finalizando con un apartado exclusivo de patología dual. El primer apartado de la introducción comienza con la definición, sintomatología, diagnóstico y datos epidemiológicos de la esquizofrenia, para más adelante, profundizar sobre los aspectos etiopatogénicos y los modelos animales desarrollados para este trastorno. Además se incluye para finalizar un apartado que trata la relevancia clínica de los biomarcadores en este trastorno. El segundo apartado está dedicado a la adicción, donde se explican las consideraciones diagnósticas para este trastorno, datos de prevalencia, las bases neurobiológicas que sustentan la adicción y por último los modelos animales que se utilizan en experimentación. En el último apartado de la introducción se define la patología dual y se comentan los datos epidemiológicos, además de explicar los circuitos neuronales que son comunes a los dos trastornos para finalizar con los modelos animales en este campo.

I. Esquizofrenia

I.1 Historia y definición de la esquizofrenia

La **esquizofrenia** como trastorno mental tiene una larga historia. Ya fue mencionada en antiguos textos de medicina Ayurvédica y en el antiguo y nuevo testamento. Pero no fue hasta el año 1809 cuando Pinel describe claramente una sintomatología de este trastorno y ya en 1890, **Emil Kraepelin**, va mucho más allá de esta descripción y clasifica la psicosis en dos categorías; la primera de ellas definida como maniacodepresiva y la segunda como demencia precoz. Años más tarde, incluyó en la demencia precoz los subtipos de esquizofrenia que se conocen hoy en día: hebefrénica, catatónica y paranoide. Observó que la edad de aparición, la historia familiar y la personalidad o temperamento premórbido eran útiles para distinguir entre la demencia precoz y la locura maníaco-depresiva (Aderibigbe, 1999).

Eugen Bleuler, en 1911, acuña por primera vez el término de esquizofrenia y aunque hace un intento de desarrollar el concepto de Kraepelin, en realidad lo modifica sustancialmente (Naqvi, 2008), entendiendo la esquizofrenia como un proceso psicológico más que una lesión cerebral fija y aproximándose a un diagnóstico más dimensional que categorial (Heckers, 2011). Las principales características que definían la enfermedad, para Bleuler se conocían popularmente como las «cuatro As»: (1) liberación de asociaciones, (2) aplanamiento afectivo, (3) autismo y (4) ambivalencia. Bleuler creía que los pacientes experimentaban características esenciales y accesorias. Consideró menos importantes las características accesorias (alucinaciones, delirios, catatonia, somatización, cambios en el habla y la escritura) mientras que las esenciales eran fundamentales para el paciente sin pertenecer a ningún subtipo latente. Esta distinción entre características esenciales y accesorias precedió a la división actual de rasgos positivos y negativos de la esquizofrenia.

El trabajo de **Kurt Schneider**, en 1959, logró establecer criterios operacionales para la esquizofrenia, al afirmar que había nueve manifestaciones psicóticas (denominadas “First-rank symptoms”) que tenían un peso decisivo en el diagnóstico del trastorno (Jablensky, 2010), y que fueron incluidas en los manuales de diagnóstico clínico como el DSM-III. En su intento de definir la esquizofrenia, abarca muchos conceptos de Kraepelin pero a su vez, descarta la clasificación entre características esenciales y accesorias propuestas por Kraepelin y Bleuler.

Aunque otros autores ya habían realizado una clasificación entre síntomas positivos y negativos en los trastornos mentales, no fue hasta 1980, con **Tim Crow**

cuando se dio mayor énfasis a esta clasificación en la esquizofrenia. De este modo se establecían dos tipos de pacientes: los pacientes tipo I o con predominio de síntomas positivos, que se caracterizan por presentar alucinaciones, delirios y trastorno de pensamiento formal; y los pacientes tipo II, con saliencia de síntomas negativos, que muestran retiro social, pérdida de volición, aplanamiento afectivo y pobreza del discurso.

En la actualidad, la esquizofrenia se encuadra en los trastornos del pensamiento y el lenguaje. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la esquizofrenia se caracteriza por una distorsión del pensamiento, la percepción, las emociones, el lenguaje, la conciencia de sí mismo y la conducta.

El cuadro sintomatológico comprende tres principales conjuntos de síntomas (Turner, 1997):

- **Positivos:**

- Alucinaciones: percepciones falsas en cualquiera de los sentidos. Son más comunes las auditivas pero también pueden presentarse olfativas y táctiles.

- Delirios: son creencias falsas sostenidas con absoluta certeza, que dominan la mente del paciente y no son sostenibles en términos de los antecedentes socioculturales.

- **Negativos:** envuelven la pérdida de habilidades personales como la iniciativa, interés en los otros, anhedonia, emociones fatuas y conversación limitada.

- **Cognitivos:** alteración de la atención, memoria de trabajo y función ejecutiva (Barry, Gaughan, & Hunter, 2012).

Además de los síntomas psicopatológicos, durante el curso de la esquizofrenia, se presenta una mayor recurrencia de **enfermedades somáticas** en comparación con el resto de la población, así como diabetes, síndrome metabólico y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Gondek, Królic, Patryk, & Ki, 2015). Además, la adicción en la esquizofrenia es más común que en el resto de la población y es un factor de riesgos para otras muchas enfermedades somáticas. Esta comorbilidad, aumenta el riesgo de mortalidad, reduciendo así la media de la esperanza de vida de estos pacientes, que en el caso de las mujeres se sitúa entre 9.8 -17.5 años de pérdida, y en el de los hombres entre 8-14.6 años (Chang et al., 2011).

Otra causa de mortalidad importante en las personas con esquizofrenia es el suicidio. Mientras que el **riesgo de suicidio** para personas que no cursan ningún trastorno mental es de 0.3%, aumenta hasta un 3.4%, cuando se presenta un trastorno mental y hasta 6.2% cuando se presenta más de uno (Holmstrand, Bogren, Mattisson, & Bradvik, 2015). En esquizofrenia, la tasa estimada de suicidios es de 579/100.000 y el riesgo de muerte por suicidio es del 5.6% (Hor & Taylor, 2010), aumentando hasta dos veces más en el curso de inicio del trastorno que en un curso más avanzado (Nordentoft, Madsen, & Fedyszyn, 2015; Palmer, Pankratz, & Bostwick, 2005).

En cuanto al curso de la enfermedad, diversos autores han contribuido a desarrollar modelos de diagnóstico basados en estudios longitudinales más focalizados en la evolución y estados que presentan los pacientes con esquizofrenia. Indistintamente de los modelos todos parecen coincidir en cinco fases claras en el curso de la enfermedad (Group & Melbourne, 2013; Wójc, Agnieszka, & Ry, 2016):

- **Fase pre-psicótica:** El sujeto no tiene síntomas específicos claros, si aparecen son principalmente negativos y afectivos, o tiene antecedentes familiares que conlleven riesgo de sufrir el trastorno.
- **Fase aguda:** Suele ser el primer contacto del sujeto con los servicios de salud mental. Aparecen síntomas positivos claros.
- **Periodo crítico:** Se estima una duración entre 3 y 5 años. En esta fase los síntomas que pueden aparecer son positivos, desde moderados hasta severos, un moderado deterioro cognitivo, aislamiento social y comportamiento disruptivo.
- **Fase subcrónica:** Se caracteriza por muchas recaídas que requieren en la mayoría de casos hospitalización. Los síntomas positivos aparecen atenuados y los negativos son residuales. Sin embargo, hay un progresivo deterioro clínico tanto físico como psicológico.
- **Fase crónica:** Se puede establecer cuando los pacientes han pasado más de cinco años desde su inicio en la enfermedad. Hay presencia de síntomas negativos y síntomas residuales graves, tales como: empobrecimiento de las emociones, limitaciones en el discurso y pensamiento, falta de energía, anhedonia y falta de concentración y atención que se manifiestan sobre todo en un contexto social.

En este trastorno también parecen existir diferencias entre hombre y mujeres. Diversos estudios refieren que en las mujeres con esquizofrenia son más comunes los síntomas afectivos mientras que en los hombres parecen predominar los síntomas

negativos (Barajas, Ochoa, Obiols, & Lalucat-jo, 2015). En relación al inicio de la enfermedad las mujeres tienen un inicio más tardío que los hombres, situándose en 2.9 años más que ellos (Riecher-Rossler & Hafner, 2000). Además, las mujeres parecen mostrar mayor predisposición a la búsqueda de ayuda y tienen unas actitudes más positivas en cuanto al tratamiento (Galdas, Cheater, & Marshall, 2005).

La evolución en el tratamiento de la esquizofrenia ha seguido el curso natural de la comprensión histórica del trastorno. El tratamiento farmacológico ha sido y es considerado como el componente esencial para tratar los síntomas psicóticos.

Aunque los avances en la medicación han aliviado significativamente los distintos grupos de la sintomatología esquizofrénica parece no ser suficiente para lograr una total adaptación en estos pacientes. En los últimos años, se apuesta por un **tratamiento multidimensional** en la esquizofrenia, al igual que en el resto de los trastornos mentales. Esto implica la necesidad de acompañar la medicación con intervenciones psicológicas y sociales. Además, se ha comprobado que existe una mejora funcional de los síntomas cuando se combina el tratamiento farmacológico y el psicosocial (Kern, Glynn, Horan, & Marder, 2009).

En los resultados del metaanálisis realizado por Pfammatter y cols, se han identificado cuatro enfoques de tratamiento psicológico en la esquizofrenia: entrenamiento en habilidades sociales, recuperación cognitiva, intervenciones psicoeducacionales orientadas al afrontamiento o *coping* y terapia cognitivo-conductual. Los resultados confirman un efecto amplio, homogéneo y duradero en la adquisición de habilidades sociales y una mejora a corto plazo de la asertividad. Además esta capacitación conduce a una mejora significativa del funcionamiento social, reduce ligeramente la psicopatología en general y disminuye la tasa de hospitalización. La capacitación cognitiva ha sido definida como una intervención focalizada en mejorar las disfunciones cognitivas mediante el uso repetitivo de tareas o el aprendizaje de estrategias. La evidencia de los distintos estudios muestra efectos beneficiosos de este entrenamiento en las funciones ejecutivas, memoria y atención. Los resultados en cuanto a las intervenciones psicoeducativas favorecen el conocimiento de la enfermedad, conducen a un cambio de las expresiones emocionales y disminución del tratamiento hospitalario. Por último, la terapia cognitivo-conductual conduce a una disminución sustancial de la psicopatología y de los síntomas positivos persistentes (Pfammatter, Junghan, & Brenner, 2006).

I.2 Diagnóstico de la esquizofrenia

Las nuevas revisiones de los manuales diagnósticos para los trastornos psiquiátricos, versiones ICD11 y DSM-5, han intentado alcanzar una mayor armonización entre los diagnósticos propuestos para cada uno de ellos. Posibles puntos de encuentro incluyen un menor énfasis en los síntomas de primer rango de Schneider y la sustitución de los subtipos de esquizofrenia con síntomas especificados. Ambos proponen la inclusión de síntomas cognitivos y los criterios para el curso del trastorno se han igualado (Gaebel, Zielasek, & Cleveland, 2013).

Para el cumplimiento del **diagnóstico según el DSM-5** deben presentarse dos de los siguientes síntomas, apareciendo claramente en el periodo mínimo de un mes uno de los tres primeros: Alucinaciones, delirios, habla desorganizada, comportamiento catatónico y síntomas negativos.

Otro criterio diagnóstico a considerar son las áreas funcionales a las que está afectando el trastorno, como pueden ser: el trabajo, relaciones interpersonales y el autocuidado. Para el diagnóstico, una de ellas o más, debe encontrarse en niveles más bajos que antes del comienzo del trastorno. Además, estos signos de alteración deben presentarse al menos durante seis meses.

También se debe descartar que exista un trastorno esquizoafectivo, depresivo o bipolar y los síntomas psicológicos tampoco pueden ser asociados a un consumo de sustancias o a otra condición médica.

La **polémica en cuanto al diagnóstico** ahora se centra en compatibilizar diagnósticos categoriales, como son el ICD y DSM, junto con un diagnóstico dimensional, el cual nos aporta información de los síntomas a lo largo de un continuo de bienestar-enfermedad. La evidencia científica apunta a que el fenotipo natural de la psicosis es dimensional, con diferentes dominios de síntomas: positivos, negativos, desorganizados, maniacos, depresivos y neurocognitivos distribuidos a lo largo de un continuo y cómo los cambios en las distintas dimensiones van a trazar el tratamiento e influir en el resultado (van Os et al., 1999). Un creciente número de estudios han comprobado que en muestras clínicas de pacientes con trastornos psicóticos diagnosticados tanto dimensional como categorialmente; se obtienen mejores resultados con un diagnóstico combinado que con uno que no lo es, en términos de utilidad de los criterios, información sobre la etiología, necesidad de tratamiento y resultados (Allardyce, Mccreadie, Morrison, & Os, 2007; Dikeos et al., 2006; van Os et al., 1996).

I.3 Epidemiología. Prevalencia e incidencia

La **incidencia** es definida como el número de nuevos casos en una población sobre un periodo de observación. En el caso de la esquizofrenia la incidencia se encuentra sobre 0.20/1000/año (Messias, Chen, & Eaton, 2007).

La **prevalencia** puede clasificarse en dos tipos: puntual y de periodo. La primera hace referencia a la proporción de individuos que tienen una determinada enfermedad en un momento dado, mientras que la segunda informa de qué proporción de personas sufrirán la enfermedad en algún momento de la vida. Así, la prevalencia puntual de la esquizofrenia se estima alrededor de 5 por cada 1000 habitantes (Messias et al., 2007). En una revisión más actual donde evalúan la prevalencia de la esquizofrenia desde el año 1990 hasta el 2013 se estima que la prevalencia puntual se sitúa en un 0.32% mientras que la prevalencia de periodo, para 12 meses o tiempo de vida, está alrededor de 0.39% (Simeone, Ward, Rotella, Collins, & Windisch, 2015).

Según la Organización Mundial de la Salud, la esquizofrenia es un trastorno mental que llega a cronificarse generando años de incapacidad para los pacientes que la sufren. Como puede comprobarse en la **figura 1**, este trastorno ocupa el cuarto lugar, dentro de las enfermedades mentales, en cuanto a años vividos con discapacidad.

Por último, hay que destacar que la esquizofrenia no se distribuye homogéneamente a lo largo de culturas, países o géneros. En cuanto al género, aun no encontrándose diferencias en la prevalencia de la esquizofrenia, parece haber mayor incidencia entre los hombres que en las mujeres (Barajas et al., 2015).



Figura 1.

Datos globales del porcentaje de años vividos con discapacidad en los trastornos mentales.

Adaptado de Vos et al., 2012.

I.4 Etiopatogenia de la esquizofrenia

I.4.1 Factores biológicos

I.4.1.1 Genética de la esquizofrenia

Desde hace bastantes décadas se ha demostrado que existe un **componente genético** en la esquizofrenia, traducido en altos índices de heredabilidad. Se han llevado a cabo diferentes estudios para comprobar esta asociación, desde datos de familiares hasta estudios de adopción. Como se muestra en el **figura 2** (Ruiz, De, Sánchez, & Páez, 2010), cuanto mayor es el grado de parentesco, mayor riesgo se tiene en el desarrollo de la esquizofrenia. En estudios de gemelos se ha observado una mayor concordancia entre monocigóticos (27% al 69%) que en los dicigóticos (5% al 31%) (Kallmann, 1994; Kendler, 1983) y en los estudios de adopción se encontró una prevalencia hasta del 11% en los hijos de madres esquizofrénicas mientras que en los hijos de madres no esquizofrénicas no se observó ningún caso (Heston, 1966).

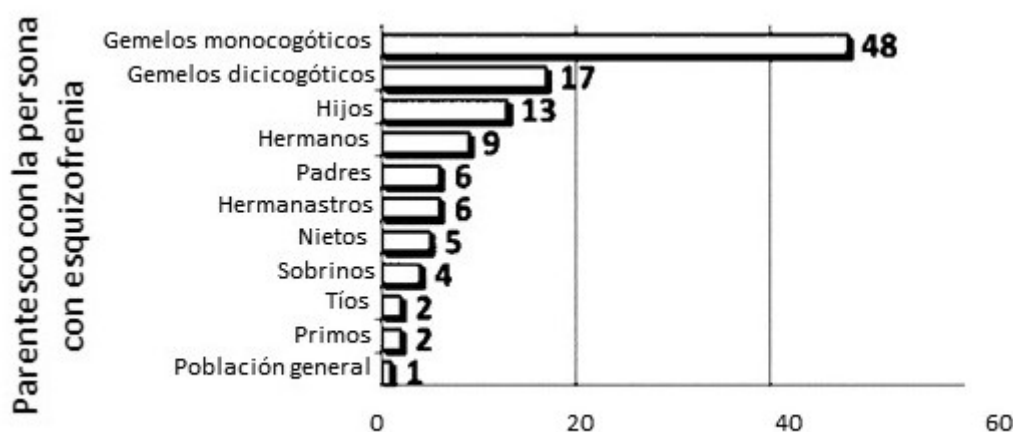


Figura 2.

Heredabilidad en la esquizofrenia.

Estudios de ligamiento y asociación han sido realizados para identificar cuáles son los genes implicados en la esquizofrenia. Aunque se debe resaltar que la genética en la esquizofrenia presenta una gran complejidad ya que están comprometidos múltiples genes que tienen un efecto modesto e interactúan produciendo los distintos fenotipos. A continuación pasamos a describir algunos de los genes que se han visto implicados en los trastornos del espectro esquizofrénico.

Numerosos estudios han encontrado asociaciones entre el **gen de la Neuregulina 1** (*nrg1*) y la esquizofrenia. Se sabe que la señalización por *nrg1*, vía ErbB, la regulación de receptores de ácido N-metil-aspartato (NMDA) y las proteínas de densidad postsináptica (*psd-95*), están implicados en la diferenciación y la migración neuronal.

Aunque el papel que juega *nrg1* en la esquizofrenia aún es desconocido, podría sugerirse que el aumento encontrado en muestras postmortem de humanos de la señalización de *nrg1* inhibiría la función de los receptores NMDA (Hahn et al., 2006).

El **gen de que codifica a la proteína Disbindina**, el *dtncp1*, que está ampliamente localizado en el cerebro, tanto pre como postsinápticamente, parece tener cierta influencia en la transmisión glutamatérgica y se ha visto también implicado en este trastorno. De este modo, se han encontrado en cerebros de pacientes esquizofrénicos niveles bajos de la expresión del mensajero del gen *dtncp1* o de la proteína correspondiente (Bray et al., 2005). Además, se ha descrito la asociación entre haplotipos de riesgo de *dtncp1* y síntomas negativos más graves (DeRosse et al., 2006; Fanous et al., 2012).

En el cromosoma 13 se ha encontrado un locus fuertemente asociado a la esquizofrenia, entre otros genes, este locus contiene el **gen activador de la D-aminoácido oxidasa** (*daoa*) (J. Chen et al., 2013). La expresión de este gen tiene como consecuencia la activación de la D-aminoácido oxidasa y esta a su vez, oxida a la D-serina la cual es un coagonista de los receptores de NMDA. Por este motivo, parece ser un candidato que sustenta la hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia.

La **catecol-ometiltransferasa**, codificada por el gen *comt* ha recibido mucha atención en los últimos tiempos. Se trata de una enzima que participa en la eliminación de la dopamina (DA) del espacio sináptico y podría estar implicada en la regulación de la neurotransmisión relacionada con la esquizofrenia (Craddock, Owen, & O'Donovan, 2006; Tunbridge, Harrison, & Weinberger, 2006). El estudio de Egan et al., 2001, revela que el alelo **Val(108/158)Met** de la *comt* al aumentar la catabolización de la DA en la corteza Prefrontal (CPf) perjudica a la cognición, siendo este mecanismo el que confiere mayor riesgo de esquizofrenia.

La translocación que se ha encontrado en el cromosoma 1 y que ocasiona la disrupción del gen *disc* (del inglés: **disrupted in schizophrenia 1**) está relacionada con la esquizofrenia y también con otros trastornos psiquiátricos. De hecho, en los últimos años este gen ha emergido como el mejor candidato para este trastorno siendo un factor de riesgo en diferentes poblaciones (Craddock, O'Donovan, & Owen, 2005; Hennah, Thomson, Peltonen, & Porteous, 2006; Porteous, Thomson, Brandon, & Millar, 2006). Varios estudios de neuroimagen refieren que los haplotipos de *disc* están asociados con una alteración en la función hipocámpal, en la memoria de trabajo y en la cognición, en individuos que presentan esquizofrenia pero también en aquellos que no la presentan, lo que explicaría la influencia de este gen en los distintos endofenotipos cognitivos (Callicott et al., 2005; Cannon et al., 2005; Porteous et al., 2006).

1.4.1.2 Alteraciones neuroquímicas en la esquizofrenia

- Hipótesis dopaminérgica

En la década de los 70, con el descubrimiento de los antipsicóticos y su efectividad en la esquizofrenia, se comenzó a relacionar este trastorno con alteraciones dopaminérgicas, sosteniendo así la hipótesis de que la sintomatología esquizofrénica podía deberse a un exceso o extremada sensibilidad de este neurotransmisor.

Estos cambios bioquímicos han sido localizados **anatómicamente** en regiones específicas del cerebro mediante estudios post-mortem. Diversos estudios muestran un incremento de los niveles de DA en el estriado (St) y de la densidad de los receptores de dopamina tipo 2 (D2R), sin embargo no se han encontrado cambios en la densidad del transportador de dopamina (DAT) (Mackay et al., 1982; Pearce, Seeman, Jellinger, & Tourtellotte, 1990). Un estudio reciente ha sido capaz de especificar cuál es la naturaleza de los cambios en los D2R, observándose que la expresión presináptica de los D2R estaba incrementada mientras que la expresión predominantemente post-sináptica estaba decrecida en la CPf dorsolateral en relación con los sujetos control (Kaalund et al., 2014). También ha sido relevante el estudio del receptor de dopamina tipo 4 (D4R) ya que se ha observado un incremento de hasta seis veces en la densidad de este receptor en pacientes esquizofrénicos (P Seeman, Guan, & Van Tol, 1993).

Los **estudios de neuroimagen**, tanto la Tomografía por Emisión de Positrones como la Tomografía Computerizada por Emisión de Fotón Único, han permitido la cuantificación de la función dopaminérgica “in vivo”. Con estas investigaciones se ha podido comprobar que los antipsicóticos son capaces de traspasar la barrera hematoencefálica y a su vez, que bloquean los receptores estriatales D2/3 con dosis clínicamente efectivas (O. Howes, Mccutcheon, & Stone, 2016). El potencial efecto de los antipsicóticos sobre los D2R se ha demostrado en un estudio que fue llevado a cabo en pacientes tratados con antipsicóticos por un periodo prolongado, y que temporalmente se les había retirado la medicación, y en pacientes naïve (sin tratamiento). Los resultados mostraron un incremento en la biodisponibilidad de los D2R en los pacientes con tratamiento prolongado con antipsicóticos, confirmando que hay un aumento en regulación de los D2R en los tratamientos antipsicóticos (Silvestri et al., 2000). Sin embargo, los resultados de este tipo de estudios parecen mostrar cierta inconsistencia debido a la heterogeneidad entre los mismos; tanto por los distintos marcadores radioactivos utilizados, por la duración de la enfermedad o incluso por el tratamiento farmacológico empleado.

En cuanto al estudio de la densidad del receptor de dopamina tipo 1 (D1R), las distintas investigaciones han mostrado bastante disparidad entre ellas. Se han encontrado, por un lado, disminuciones en la densidad de los D1R en áreas corticales y estriatales en pacientes medicados (Kosaka et al., 2010), mientras que otros estudios presentan disminuciones de este receptor en áreas corticales (Abi-Dargham et al., 2012). Esta heterogeneidad en los resultados puede venir explicada porque los radioligandos utilizados para los D1R también se unen a los receptores de serotonina (5-HT), que a su vez, también están implicados en la etiología de la esquizofrenia.

Distintos estudios de neuroimagen también han investigado la densidad de los DAT. Una de las primeras teorías degenerativas de la esquizofrenia se basaba en que los cambios en la densidad del DAT en los terminales estriatales eran fundamentales para la etiología del trastorno. Se proponía que esta relación era debida a la actividad hiperdopaminérgica y que esta actividad podría ser neurotóxica, ocasionando pérdida de neuronas dopaminérgicas en el St (J A Lieberman, Kinon, & Loebel, 1990). Diferentes metaanálisis no han encontrado evidencia de alteraciones en la densidad de los DAT en el St en pacientes esquizofrénicos (J. Chen et al., 2013; O. D. Howes et al., 2012), lo que indica que los cambios dopaminérgicos en la esquizofrenia no son secundarios a los cambios encontrados en los DAT o en la densidad de neuronas dopaminérgicas a nivel presináptico (O. Howes et al., 2016).

En cuanto a la **síntesis de DA** la mayoría de estudios se han llevado a cabo con el radio marcador para la L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), ya que proporciona un índice de la capacidad en la síntesis de DA presináptica y la disponibilidad de DA para la liberación desde los terminales presinápticos (Kumakura & Cumming, 2009). En estas investigaciones se ha evidenciado una gran elevación en la capacidad de síntesis en la esquizofrenia en comparación con los sujetos controles (O. D. Howes et al., 2012). La liberación de DA ha sido medida utilizando radio trazadores, como la [11C] racloprida o el [123I] IBZM, que se unen a los D2R compitiendo así con la DA. Por tanto, si después de un desafío farmacológico que provoca liberación de DA se observa una disminución en la unión del radio trazador se asume que ha habido un aumento de la DA extracelular. Las investigaciones que han utilizado este enfoque han demostrado que hay un aumento significativo en la liberación de DA en los pacientes esquizofrénicos en comparación con los controles. Además se observó que el grado de desplazamiento del radio trazador correlacionó con el grado de empeoramiento de los síntomas psicóticos (Laruelle, Abi-Dargham, Gil, Kegeles, & Innis, 1999; Pogarell et al., 2012).

- Hipótesis glutamatérgica

Los inicios de esta hipótesis se remontan hacia los años 50 con estudios que describían mejoras en los pacientes esquizofrénicos tratados con ácido glutámico. Originalmente, esta hipótesis fue concebida como un déficit en la neurotransmisión glutamatérgica y después de desarrollarse durante décadas parece que prevalece la implicación de los **receptores NMDA**. Así, en estudios postmortem se ha encontrado una densidad reducida de la subunidad 1 de los receptores NMDA en la corteza frontal y temporal superior (Humphries, Mortimer, Hirsch, & de Belleruche, 1996; Sokolov, 1998).

Otros resultados que apoyan la disfunción de los receptores NMDA en la esquizofrenia son los **estudios realizados con antagonistas** para estos receptores, y muestran que la administración de estos desencadena en síntomas psicológicos que se asemejan a la sintomatología esquizofrénica, incluyendo tanto síntomas positivos como negativos (Javitt, 2007; Krystal et al., 1994; Morgan & Curran, 2006). Se ha demostrado que la administración de antagonistas de los receptores de NMDA produce neurotoxicidad en regiones corticales, alterando el volumen de estas zonas, parecidas a las observadas en pacientes esquizofrénicos, y por tanto se sugirió que el glutamato (Glu) podría subyacer a estos efectos neurotóxicos (Olney & Farber, 1995). El mecanismo por el cual los antagonistas de los receptores de NMDA producen aumentos de Glu y neurotoxicidad no ha sido esclarecido, aunque parece ser que las interneuronas GABAérgicas estarían involucradas en el mismo. En este sentido, se ha demostrado que los antagonistas de NMDA reducen la función de las interneuronas GABAérgicas lo que aumentaría el disparo de las neuronas piramidales (Homayoun & Moghaddam, 2007; Olney & Farber, 1995).

Los **estudios de neuroimagen**, aunque bastante posteriores a los realizados en el sistema dopaminérgico, también apoyan la hipótesis glutamatérgica. La espectroscopía por resonancia magnética nuclear (RMN) ha permitido medir los niveles de Glu y Glutamina (Gln), en personas con alto riesgo de psicosis. Tanto en primeros episodios psicóticos, como en esquizofrénicos crónicos se ha encontrado que los niveles de Gln, en el primer caso, y el ratio de Gln/Glu, en el segundo, se encontraban aumentados en el córtex cingulado anterior (Homayoun & Moghaddam, 2007; Tandon et al., 2013).

En resumen, parece que hay aspectos del trastorno que tienen una explicación más claramente dopaminérgica, como los síntomas psicóticos (Reith et al., 1994), mientras que los síntomas cognitivos y negativos parecen explicarse mejor desde el sistema glutamatérgico (Javitt, 2010).

No obstante, en los últimos años se ha propuesto una **hipótesis que integra tanto los cambios en el sistema dopaminérgico como en el glutamatérgico debido a las extensas y recíprocas interacciones** que se dan entre ellos. Las neuronas dopaminérgicas están reguladas por las proyecciones glutamatérgicas que se dirigen a los núcleos dopaminérgicos del mesencéfalo, lo que puede producir cambios temporales debidos a la función glutamatérgica. Como se muestra en la **figura 3**, se ha sugerido que la actividad dopaminérgica en la esquizofrenia podría ser secundaria a la alteración de la actividad glutamatérgica (O. Howes et al., 2016).

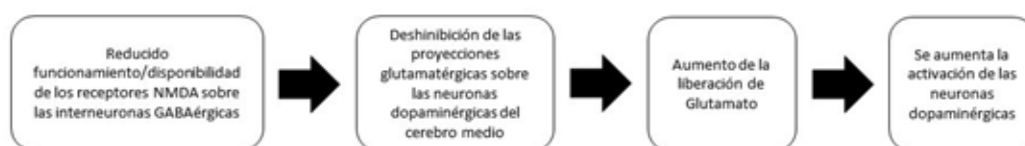


Figura 3.

Interacciones entre las vías glutamatérgicas y dopaminérgicas. Adaptado de Howes et al., 2016

1.4.1.3 Alteraciones neuroanatómicas en la esquizofrenia.

Los estudios con Tomografía Axial Computerizada como los de RMN han hecho posible el estudio de estas alteraciones en los trastornos esquizofrénicos. A pesar de los avances encontrados en este campo, la heterogeneidad en los resultados entre los distintos estudios es muy grande, lo que podría obedecer a la variabilidad clínica que se presenta en los pacientes. En general, se ha encontrado una disminución del volumen total cerebral, sin diferencias entre los dos hemisferios, y que puede estar asociado al ensanchamiento de los surcos corticales (Kleinschmidt et al., 1994). Aun así, los distintos estudios parecen señalar que habría unas estructuras más afectadas que otras en la esquizofrenia.

Prácticamente todos los estudios han mostrado la afectación de los **ventrículos laterales**. En los pacientes esquizofrénicos se ha encontrado un aumento en el volumen ventricular cerebral, especialmente en las astas temporales y frontales (Lawrie & Abukmeil, 1998; Shenton, Dickey, Frumin, & McCarley, 2001; I. C. Wright et al., 2000). Esta alteración estructural no puede ser debida al efecto de la medicación o al proceso degenerativo de la enfermedad ya que ha sido encontrada en las fases tempranas (Andreasen et al., 1990). Por el contrario, las diferencias encontradas en los ganglios basales sí parecen estar mediadas por la medicación neuroléptica. Se ha observado un aumento de volumen del núcleo caudado, putamen y el globo pálido en pacientes esquizofrénicos que están tratados con antipsicóticos típicos y parece que

el efecto se revierte cuando son sustituidos por antipsicóticos de segunda generación (Corson, Nopoulos, Miller, Arndt, & Andreasen, 1999; Scheepers, Gispen de Wied, Hulshoff Pol, & Kahn, 2001; I. C. Wright et al., 2000).

También existen numerosas investigaciones que coinciden en la disminución del **volumen del complejo hipocampo-amígdala y del giro temporal superior**, así como una disminución en las áreas temporolímbicas y el giro hipocampal (Matsumoto et al., 2001; Nelson, Saykin, Flashman, & Riordan, 1998; Sanfilipo et al., 2000; I. C. Wright et al., 2000). Estos hallazgos son consistentes con los déficits de memoria que presentan los pacientes esquizofrénicos.

La hipófisis es otra de las estructuras implicadas en la esquizofrenia y se ha encontrado que en los primeros episodios el volumen hipofisario es mayor que en los estadios más cronificados de la enfermedad donde este se ve disminuido debido a los repetidos episodios de activación asociados al estrés (Pariante et al., 2004).

1.4.1.4 Alteraciones neurofisiológicas en la esquizofrenia.

Las principales técnicas utilizadas han sido la electroencefalografía (EEG) y los potenciales evocados.

Los resultados obtenidos mediante la EEG muestran que las **ondas alfa 1** (ondas de menor frecuencia, relacionadas con procesos atencionales y de memoria) presentaban mayor actividad en los pacientes esquizofrénicos con predominancia de síntomas positivos en comparación con aquellos que presentaban más síntomas negativos y con los controles. Las **ondas alfa 2** (ondas de mayor frecuencia, relacionadas con la memoria semántica a largo plazo) mostraban menor actividad en los pacientes con un reciente inicio en la esquizofrenia en comparación con los sujetos controles en las áreas frontales, además el subgrupo de síntomas negativos mostraba menor actividad aún (John et al., 2009). Esta actividad también ha sido asociada a la respuesta al tratamiento, así una mayor actividad de alfa 1 predice mejores respuestas mientras los aumentos de alfa 2 estarían informando de la resistencia al mismo (Ramos, Cerdan, Guevara, Amezcua, & Sanz, 2001). Las **ondas delta**, relacionadas con la formación de la memoria y la recuperación de la información, mostraron mayor potencia en el subgrupo con mayores síntomas negativos, vinculándose estos síntomas al hipometabolismo cortical difuso. Además una menor actividad de estas ondas parece relacionarse con una mejor respuesta al tratamiento (Ramos et al., 2001), por tanto cabe esperar que los pacientes con predominancia de síntomas negativos muestren mayor resistencia al mismo. Sin embargo, la disminución de las **ondas theta**, encontrada

tanto en el subgrupo de síntomas positivos como negativo, se propone como un sello distintivo en la esquizofrenia, que junto con la reducción de la potencia de alfa 2 podría explicar los síntomas cognitivos en la esquizofrenia. Para finalizar, en este estudio no se encontraron diferencias entre los grupos en las **ondas beta**.

En cuanto a los estudios realizados con **potenciales evocados**, estos revelan que los pacientes esquizofrénicos sufren alteraciones en la **onda P50** (reflejo de un mecanismo de inhibición para eliminar estímulos irrelevantes). Una alteración en esta onda podría imposibilitar la capacidad de discriminar los estímulos relevantes debido a una sobrecarga sensorial (Bramon, Rabe-Hesketh, Sham, Murray, & Frangou, 2004).

También se ha investigado la amplitud de la **onda P300** que aparece en torno a 300 ms después de la presentación de un estímulo anormal en una serie de estímulos congruentes. Los distintos estudios han comprobado que esta onda parece disminuida en sujetos con esquizofrenia (Frodl-Bauch, Gallinat, Meisenzahl, Moller, & Hegerl, 1999; Mathalon, Ford, & Pfefferbaum, 2000).

Por último el **potencial de disparidad**, que muestra una disminución en su amplitud en la esquizofrenia y que al estar asociado a procesos preatencionales parece indicar un claro deterioro del procesamiento de la información auditiva y de la memoria sensorial auditiva. Además este potencial está relacionado con el curso de la enfermedad ya que no se encuentra alterado en los primeros episodios pero sin embargo comienza a mostrarse la alteración a medida que el trastorno comienza a cronificarse (Umbricht & Krljes, 2005).

1.4.2 Factores ambientales.

Los primeros trabajos sobre la etiopatogenia de la esquizofrenia ya discutían la relevancia de los factores ambientales, pero siempre quedaron ensombrecidos por las limitaciones metodológicas y por el quizá excesivo número de modelos biológicos utilizados. Aunque hasta hace pocos años la etiología de la esquizofrenia ha sido dominada por la búsqueda de genes, recientemente las hipótesis ambientales han ido ganando fuerza (Alan S. Brown, 2011).

La evidencia muestra que en el **periodo prenatal y perinatal** hay factores ambientales asociados al desarrollo de la esquizofrenia. Las infecciones maternas por virus (sarampión, rubeola, varicela, herpes simple tipo 2), bacterias (pielonefritis, neumonía y otras infecciones respiratorias) o parásitos (toxoplasma), parecen ser

candidatos plausibles. Además es sabido que los microbios infecciosos causan anomalías congénitas en el cerebro, disfunciones neurocognitivas y alteraciones comportamentales (Alan S. Brown, 2011).

Muchas de estas investigaciones se han centrado en una epidemia del **virus influenza A subtipo 2** (H2N2) que ocurrió en el año 1957. Se ha seleccionado esta epidemia sobre otras por su alta morbilidad y por estar circunscrita al periodo de ocurrencia. Inicialmente se observaron asociaciones entre la esquizofrenia y la epidemia del virus influenza en todo o parte del segundo trimestre del desarrollo gestacional (Alan S Brown & Derkits, 2010). Aunque este estudio tuvo sus limitaciones, debido a que estos mismos resultados han sido encontrados en diferentes países (Kendell & Kemp, 1989; Kunugi et al., 1995; J McGrath & Castle, 1995).

En el caso de la **rubeola**, se ha encontrado que hay 5 veces más de riesgo de sufrir esquizofrenia en las madres que estuvieron expuestas a este virus, además de una disminución del cociente intelectual y anomalías neuromotoras y conductuales premórbidas (A S Brown et al., 2001).

Otro patógeno que puede estar asociado a una mayor prevalencia de la esquizofrenia durante el embarazo es el *Toxoplasma gondii*. Se ha observado que el incremento materno de los niveles del anticuerpo de inmunoglobulina para *Toxoplasma gondii* en la madre duplica el riesgo de sufrir esquizofrenia (Alan S Brown et al., 2005). Sin embargo, con el **virus del herpes simple tipo 2** (HSV-2), donde las anomalías congénitas son similares a las que se desarrollan con la infección de *Toxoplasma gondii*, parece haber cierta controversia. De los dos estudios principales llevados a cabo, uno de ellos demuestra asociaciones entre altos niveles de inmunoglobulina para HSV-2 y el riesgo de esquizofrenia (Buka, Cannon, Torrey, & Yolken, 2008), mientras que el otro no ha sido capaz de replicar estos hallazgos. Estas diferencias parecen explicarse por las divergencias metodológicas entre las dos investigaciones, tanto por la selección de la cohorte como por el número de sujetos.

Pero no todo el periodo de gestación entraña el mismo riesgo, parece haber vulnerabilidad a la esquizofrenia con las infecciones que se producen desde el inicio hasta la mitad del embarazo. Se ha encontrado que influenza virus en la primera mitad del embarazo aumenta el riesgo de esquizofrenia en la descendencia hasta tres veces más mientras que en el primer trimestre hasta siete veces. En la rubeola y otras infecciones bacterianas la mayor asociación se encontró en el primer trimestre (Alan S Brown & Susser, 2002; Sorensen, Mortensen, Reinisch, & Mednick, 2009). Sin embargo, no se han encontrado asociaciones entre la segunda mitad del embarazo y el riesgo de esquizofrenia (Alan S Brown et al., 2004).

Otro factor gestacional al que se le ha prestado atención en los últimos tiempos es la **nutrición**. Un gran número de trastornos neuropsiquiátricos están relacionados con la deprivación nutricional y se ha comprobado que la utilización de suplementos vitamínicos y minerales previenen este riesgo (A S Brown et al., 1996).

Principalmente son dos los micronutrientes implicados en el riesgo de esquizofrenia: **el ácido fólico y la vitamina D**. Los **niveles bajos de ácido fólico** se traducen en niveles altos de homocisteína, considerándose al segundo un marcador del primero (Alan S. Brown, 2011). La homocisteína está implicada en la esquizofrenia a través del antagonismo de los receptores de NMDA (ver hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia).

Se ha propuesto que **niveles bajos de vitamina D** podrían ser otro factor de riesgo en el desarrollo de la esquizofrenia, lo que se ha justificado por dos variables importantes: la estación en la que se nace y el color de piel. En el primer caso, se ha observado que en los países donde los rayos del sol inciden menos y hay menos horas de luz, o el nacimiento es en la estación invernal, aumenta el riesgo de esquizofrenia por la disminución en los niveles de vitamina D (Davies et al., 2003). Estos hallazgos también se han comprobado en personas con la tez más oscura ya que presentan niveles más bajos de vitamina D (Elizabeth Cantor-Graae & Selten, 2005; Davies et al., 2003).

En cuanto a las **complicaciones obstétricas** como preeclampsia, diabetes materna, asfixia, atonías uterinas o cesáreas de emergencia, se han encontrado incrementos en el riesgo de padecer esquizofrenia hasta dos veces mayor, llegando hasta tres veces en el caso de la diabetes, cesáreas de emergencia, bajo peso en el nacimiento y desprendimiento de la placenta (M. Cannon, Jones, & Murray, 2002).

Por último, el **estrés maternal** también se ha postulado como factor predisponente. Se ha comprobado que los hijos de madres que han sufrido estrés durante el embarazo debido a una muerte o una grave enfermedad en la familia, tienen hasta dos veces más riesgo de desarrollar esquizofrenia (Khashan et al., 2008).

Además de los factores prenatales y perinatales, existen otros factores ambientales, de carácter social y relacional, que parecen influir en el desarrollo de este trastorno mental.

Desde hace 50 años se ha relacionado la **edad parental** con el desarrollo de esquizofrenia, pero quedaba por aclarar si incidía más la edad materna, paterna o ambas.

Estudios más actuales llevados a cabo en distintas poblaciones ponen de manifiesto que el riesgo de esquizofrenia aumentó dos veces más en padres que comprendían edades entre 45-49, aumentando hasta tres veces en padres que sobrepasaban los 50 años, en comparación con padres de 25 años (Malaspina et al., 2001).

Otro factor de vulnerabilidad para el desarrollo de la esquizofrenia es el **trauma en el periodo infantil**. Esto incluye tanto maltrato físico como psicológico, pérdida parental, divorcio o separación, abuso de drogas en los padres o pobreza. Hay hasta tres veces más de riesgo de sufrir la enfermedad en las personas que padecieron traumas como los descritos anteriormente (Sahin et al., 2013). Además parece que existe una relación directa entre la severidad de los síntomas con el grado de maltrato, de este modo las personas que sufrieron un maltrato severo presentarán mayor sintomatología de la enfermedad (Braehler et al., 2013). También parece estar asociado con una mayor presencia de síntomas positivos y con la no remisión de los mismos en estados avanzados de la enfermedad (Cohen, Palekar, Barker, & Ramirez, 2012).

El concepto de **derrota social**, asociado a la población inmigrante, ha adquirido cierta importancia en la explicación de la esquizofrenia en los últimos años. El modelo de estrés social denominado intruso-residente se basa en las experiencias estresantes, derrotistas y con poco control a las que se expone un individuo cuando es introducido en una sociedad donde ya vivían previamente otros con diferente cultura. Este argumento es sostenido por la idea que los estresores sociales, que inciden más marcadamente en grupos en riesgo de exclusión social, pueden ser el desencadenante de un riesgo genético subyacente (Davis et al., 2016).

Por último, el **estatus socioeconómico** es otro de los factores que aportan vulnerabilidad en la esquizofrenia. La mayoría de estudios dedican sus esfuerzos a conocer si un estatus socioeconómico bajo es la causa o la consecuencia de la enfermedad. La primera hipótesis propondría que la exposición a este tipo de ambientes, asociado a su vez a factores psicosociales y biológicos, daría como resultado una mayor propensión a sufrir esquizofrenia. Mientras que la segunda hipótesis sugiere que la enfermedad resulta en contextos más desfavorecidos y estatus sociales más bajos. Aunque estudios realizados hace varias décadas no encontraron asociación alguna entre las variables, en los últimos estudios realizados se ha comprobado que un estatus socioeconómico bajo puede influir en el riesgo de esquizofrenia (Corcoran et al., 2009; Wicks, Hjern, Gunnell, Lewis, & Dalman, 2005).

En resumen, son muchos los estudios que han demostrado que los factores biológicos están implicados en la esquizofrenia. Distintas áreas de conocimiento de la

genética y las neurociencias han atestiguado estas alteraciones y, de hecho, en la mayoría de los casos estas han presentado correspondencia con la sintomatología propia de este trastorno, llegando a ser posible incluso diferenciar entre la heterogeneidad presentada en los pacientes esquizofrénicos. Sin embargo, cuando consideramos la etiopatogenia de un trastorno mental, como es el caso de la esquizofrenia, el esfuerzo no debe estar encaminado a encontrar la causa de la enfermedad. En la actualidad, se contemplan modelos interaccionistas donde se asocian distintas variables que darían lugar al desarrollo del trastorno. Por tanto, se puede considerar que los factores biológicos pueden ser expresados, o no, dependiendo de ciertos factores ambientales, dando lugar así a la esquizofrenia.

1.5 Modelos animales en esquizofrenia

Los modelos animales son una herramienta muy útil para la investigación de las bases neurobiológicas de los trastornos mentales. Permiten una rápida monitorización del proceso de la enfermedad y la realización de procedimientos invasivos que no serían posibles en los pacientes. Los modelos animales para el estudio de la neurobiología de los trastornos mentales deben cumplir tres criterios fundamentales (**Figura 4**).

- **Validez de constructo:** el fundamento del modelo debe basarse en la hipótesis que explica el trastorno, es decir que el modelo debe medir lo que se pretende medir.
- **Validez predictiva:** si el modelo responde adecuadamente a los efectos del tratamiento que se da en la condición patológica.
- **Validez de apariencia:** es la similitud fenomenológica entre lo que se presenta en el trastorno psicopatológico y el modelo.

Sin embargo, la utilización de estos modelos plantea algunos problemas como la evaluación de las funciones cognitivas superiores (lenguaje y pensamiento) que se dan propiamente en humanos. En el caso de la esquizofrenia además se presenta otro problema, y es que no se puede contar con un control positivo en la medicación ya que no existe en la actualidad, un solo fármaco que aúne el tratamiento de todos los síntomas.

Hasta la fecha se han desarrollado unos 20 modelos animales diferentes para la esquizofrenia (Carpenter & Koenig, 2008), aunque muchos de ellos muestran una superposición metodológica y podrían encuadrarse dentro de tres categorías: manipulación genética, farmacológicos y del neurodesarrollo.

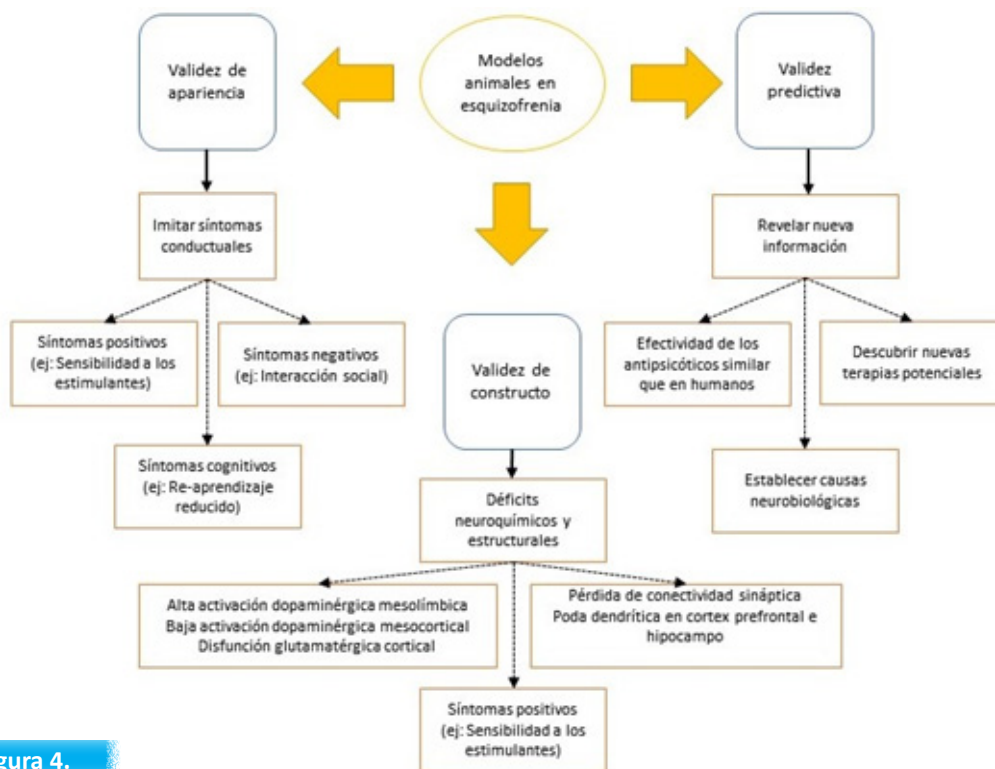


Figura 4.

Validez en los modelos animales de esquizofrenia. Adaptado de Jones et al., 2011.

1.5.1 Modelos genéticos

La forma de estudiar la implicación en un trastorno concreto suele realizarse mediante los animales transgénicos. Específicamente se utiliza ratones a los cuales se les modifica uno o más de sus genes, inactivando en el caso de los *knock-out* (KO) o sobreexpresando en los *knock-in*. Esto permite medir las diferencias que presentarán los animales en comparación con el grupo control en relación a la función que tiene ese gen en concreto.

El primero de los genes implicados en la esquizofrenia ha sido *disc1*, el cual está implicado en funciones como la sinaptogénesis, migración neuronal y plasticidad sináptica. Algunas alteraciones patológicas y del comportamiento en estos ratones son similares a las encontradas en la esquizofrenia. Neuroanatómicamente, se observa en estos ratones un aumento del volumen de los ventrículos laterales y una disminución en el grosor cortical y en el volumen cerebral. Además, existen resultados que indican reducciones en la complejidad dendrítica del hipocampo (Hp), en la estructura y la densidad, consistente con los déficits cognitivos encontrados en esquizofrenia (Jaa-

ro-Peled, Ayhan, Pletnikov, & Sawa, 2010; Shen et al., 2008). Comportamentalmente, se han observado déficits sutiles en la inhibición prepulso (PPI) e hiperactividad locomotora en el *open field*, además de síntomas negativos como anhedonia y depresión (Hikida et al., 2007). Sin embargo, estos hallazgos son controvertidos ya que hay estudios que no encuentran diferencias en ninguno de estos parámetros (Koike, Arguello, Kvajo, Karayiorgou, & Gogos, 2006; Pletnikov et al., 2008).

Uno de los potenciales objetivos moleculares que subyace a las alteraciones de en la neurotransmisión en la esquizofrenia es el gen *dtncp1*, el cual codifica a la proteína disbidina-1 que está involucrada en la neurotransmisión excitatoria regulando la exocitosis, la biogénesis de vesículas y el tráfico de D2R (Papaleo et al., 2012). Se ha comprobado que existe una disminución de disbidina-1 en pacientes esquizofrénicos y que esta podría contribuir a los cambios en la conectividad sináptica y en la señalización glutamatérgica alterada en la esquizofrenia (Weickert, Rothmond, Hyde, Kleinman, & Straub, 2008). En el plano conductual se ha encontrado hiperactividad locomotora en el *open field*, alteraciones en la memoria de trabajo y reducción en el contacto social en animales con manipulaciones en este gen (Cox et al., 2009; O'Tuathaigh, Kirby, Moran, & Waddington, 2010; Papaleo et al., 2012).

En el caso del gen *nrg1*, que interviene en el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso así como en la neurotransmisión tanto excitatoria como inhibitoria, los diferentes estudios con animales KO muestran muchas discrepancias entre ellos. Se ha encontrado mucha diversidad y falta de consistencia en los efectos, además de una escasez de estudios farmacológicos. Por este motivo, se requieren más investigaciones antes de poder evaluar la relevancia funcional de *nrg1* en los modelos animales (Jones, C.A., Watson, D.J.G., 2011).

El gen que codifica a la proteína de reelina se ha visto implicado en la formación sináptica y la plasticidad neuronal dentro del sistema nervioso central (SNC). El ratón KO para la reelina tiene un fenotipo conductual con algunos síntomas que se han descrito en la esquizofrenia, además de presentar un incremento del empaquetamiento neuronal y una densidad reducida de las espinas dendríticas en el CPf e Hp, lo que también se ha observado en cerebros de pacientes con esquizofrenia (W. S. Liu et al., 2001). Es significativo que dado que las reducciones de reelina ocurren en el Hp y CPf, áreas implicadas en los síntomas cognitivos de la esquizofrenia, sorprendentemente estos ratones no muestran déficits cognitivos (Krueger et al., 2006), de hecho presentan un comportamiento normal en tareas de aprendizaje inverso, control inhibitorio, una adquisición y retención en memoria espacial normales y una memoria de trabajo inalterada (Arguello & Gogos, 2010; Krueger et al., 2006). Por tanto, los

datos sugieren que aunque la reelina se ha visto implicada en la esquizofrenia todavía se requiere mayor investigación para utilizar estos ratones KO en la comprensión de este trastorno.

1.5.2 Modelos Farmacológicos.

Generalmente estos modelos se basan en la utilización de fármacos para inducir la sintomatología esquizofrénica, más concretamente los síntomas psicóticos. En la esquizofrenia, los fármacos más utilizados han sido la **anfetamina** (AMP) y la **feniclidina** (PCP).

Los primeros modelos farmacológicos desarrollados en la esquizofrenia han sido los relacionados con la disfunción de la DA, intentado imitar esta característica. Para ello se ha utilizado la **AMP**, ya que se ha descrito que la administración de la misma produce un cuadro psicótico que incluye alucinaciones auditivas y delirios, semejante a los síntomas positivos de la esquizofrenia, y porque actúa como agonista directo de los receptores dopaminérgicos. La administración crónica de AMP en roedores provoca una sensibilización persistente y una hiperlocomoción (Robert E Featherstone, Rizos, Kapur, & Fletcher, 2008; Robinson & Becker, 1986). Sin embargo, no se han observado déficits en las interacciones sociales (utilizado como modelo para los síntomas negativos en la esquizofrenia (Jones, C.A., Watson, D.J.G., 2011)).

En cuanto a las tareas cognitivas se ha demostrado que la AMP está relacionada con alteraciones en la CPF que derivan en déficits en aprendizaje inverso en tareas de desplazamiento de la atención y aumento de las omisiones en la tarea de reacción serial de 5 elecciones (Robert E Featherstone et al., 2008; Fletcher, Tenn, Rizos, Lovic, & Kapur, 2005; Fletcher, Tenn, Sinyard, Rizos, & Kapur, 2007). Las funciones cognitivas que parecen ser más dependientes del Hp parecen mostrarse inalteradas. De esta manera, no se han encontrado diferencias en la adquisición o retención de la memoria visual-espacial en la tarea del laberinto acuático de Morris (Robert E Featherstone et al., 2008; Russig, Durrer, Yee, Murphy, & Feldon, 2003). También se han observado déficits en el PPI, aunque son dependientes del tiempo y la dosis de la administración (R E Featherstone, Kapur, & Fletcher, 2007). En general, la AMP es capaz de imitar los síntomas positivos presentados en la esquizofrenia pero no da cuenta de los negativos ni de los cognitivos en su totalidad.

Los primeros hallazgos relacionados con la vía glutamatérgica en la esquizofrenia también fueron orientados a la sintomatología positiva observada tras la administración de antagonistas no competitivos de los receptores NMDA como el PCP.

Se ha encontrado que la administración de **PCP** provoca sensibilización locomotora sin resultar en una hiperlocomoción espontánea (Scalzo & Holson, 1992; X. Xu & Domino, 1994). Además reduce el número de interacciones sociales y tras la administración crónica disminuye el comportamiento social (Sams-Dodd, 1995, 1996). Sin embargo, en relación a la anhedonia, otro síntoma negativo asociado a la esquizofrenia entendido como una respuesta negativa hacia un estímulo placentero, no se han encontrado diferencias en la ingesta de sacarosa tras una administración subcrónica de PCP (Jenkins, Harte, & Reynolds, 2010).

La administración de PCP para imitar los síntomas cognitivos en la esquizofrenia ha demostrado algunas dificultades ya que se ha confirmado que el protocolo utilizado en la administración influye en el deterioro cognitivo. De este modo, se observó que la intermitencia en los tratamientos no es capaz de sostener los cambios en los síntomas cognitivos durante un periodo estable de tiempo. Aun así, se ha encontrado que el PCP afecta a cinco de los siete dominios cognitivos que se encuentran alterados en los pacientes esquizofrénicos. La administración crónica de PCP altera la memoria de trabajo, la atención, la velocidad de procesamiento, memoria y aprendizaje visual y el razonamiento y resolución de problemas (Amitai & Markou, 2009; Beninger et al., 2010; Grayson, Idris, & Neill, 2007; J D Jentsch, Tran, Le, Youngren, & Roth, 1997). Sin embargo, las dimensiones de cognición social y memoria verbal no son extrapolables a los modelos animales, por tanto no pueden ser medidas.

Los cambios neuroquímicos inducidos por la administración crónica de PCP correlacionan con aquellos encontrados en la esquizofrenia. Los resultados muestran una disminución de los niveles de DA en la CPf en ratas que fueron administradas crónicamente con PCP (J D Jentsch et al., 1997). La expresión de los receptores también se ha visto afectada por la administración de PCP, entre los distintos cambios en la expresión se ha observado una reducción de los D1R en el St lateral y medial (sin cambios en D2R o D4R), incrementos de receptores 5HT en la CPf (medial y dorsolateral) y una alteración GABAérgicas en el Hp y St (Beninger et al., 2010; Choi, Snigdha, Shahid, Neill, & Tarazi, 2009). A largo plazo los receptores NMDA también se ven reducidos en diferentes áreas como el núcleo accumbens (NAcc) core, Hp, Tálamo y cortex (Newell, Zavitsanou, & Huang, 2007).

1.5.3 Modelos del neurodesarrollo: prenatales, perinatales y neonatales

Los modelos del neurodesarrollo estipulan que hay un número de interacciones que se dan entre los genes y los factores ambientales, lo que les confiere un alto valor científico. Estas anomalías del desarrollo que se originan en el feto se pueden mantener a lo largo de la etapa perinatal y expresarse en la adolescencia o etapa adulta. A continuación se van a revisar

los principales modelos animales que se han desarrollado para el estudio de la esquizofrenia.

El acetato de **metilazoximetanol** (MAM) es un potente carcinógeno que se encuentra en muchas especies de plantas y provoca cambios neuropatológicos y conductuales que son vistos en la esquizofrenia (Moore, Jentsch, Ghajarnia, Geyer, & Grace, 2006). La administración MAM en ratas hembras entre el día de gestación (GD) 14 y 17 resulta en alteraciones del desarrollo de estructuras cerebrales. Aunque la mayoría de estudios muestra que los cambios generados por la administración de MAM dependen en gran medida del GD en el que se realiza el tratamiento, la cepa de la rata y la edad de la cría cuando se realiza el test. Parece ser que los efectos de MAM son más visibles en el GD 17.

Se ha encontrado que la administración de MAM en ratas gestantes reduce el tamaño de áreas corticales y límbicas (Moore et al., 2006). En este sentido, los análisis inmunohistoquímicos han mostrado una reducción neuronal en la región CA2 del Hp, sin embargo no se encontraron diferencias de volumen en los ventrículos, que es uno de los hallazgos más característico en la esquizofrenia (Matricon et al., 2010). Por otro lado, en la región piramidal CA3 del Hp se observó desorganización neuronal, densidad esporádica y heterotopia tras administrar MAM en la gestación, correlacionando con los resultados en pacientes esquizofrénicos (Moore et al., 2006). Específicamente, MAM reduce el grosor en el Hp, tálamo y algunas regiones corticales, además reduce el peso cerebral (Flagstad et al., 2004).

Los niveles del factor de crecimiento nervioso y el factor de crecimiento neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) también se encuentran reducidos en las crías adultas de madres administradas con MAM en el córtex parietal, lo que ha sido también demostrado en la clínica de la esquizofrenia (Fiore, Grace, Korf, Stampachiachiere, & Aloe, 2004; Shoval & Weizman, 2005).

Los síntomas positivos han sido evidenciados por un aumento de la respuesta locomotora en reacción a la AMP, e incrementos en la DA del NAcc pero no CPF consistente con la hiperactividad subcortical que explica los síntomas psicóticos (Flagstad et al., 2004). Sin embargo, en los síntomas cognitivos los resultados son menos consistentes ya que la mayoría han sido realizados en el GD 15 en vez del 17 (Jones, C.A., Watson, D.J.G., 2011).

Otro modelo desarrollado para el estudio de la esquizofrenia es el **aislamiento social** tras el destete. La deprivación social en crías después del destete se ha asociado a alteraciones en el desarrollo del cerebro y déficits conductuales en la etapa adulta

(Fone & Porkess, 2008; Lapiz et al., 2003). El síndrome del aislamiento social está caracterizado por una hiperlocomoción espontánea, aumento en la respuesta hacia la novedad (neofobia), déficits en el PPI, disfunción cognitiva y aumento de la ansiedad y la agresión (Einson & Morgan, 1977; Heidbreder et al., 2000; Marsden, King, & Fone, 2011; Weiss, Pryce, Jongen-Relo, Nanz-Bahr, & Feldon, 2004), correspondiéndose con la sintomatología esquizofrénica encontrada en el ámbito clínico.

La privación social también produce cambios a nivel de la neurotransmisión que son compartidos con las alteraciones observadas en la esquizofrenia. Tras el aislamiento social se encuentra una reducción en la densidad de los D1R en la CPf que sería indicativa de los déficits cognitivos en la esquizofrenia. Sin embargo, no se han observado diferencias en los D2R ni en el Hp, CPf o amígdala (Amg) (Malone, Kern, Chongue, Mackie, & Taylor, 2008). En el St, los D2R, parece que sufren un aumento en las ratas que han sido criadas en aislamiento (King, Seeman, Marsden, & Fone, 2009), lo que se ha documentado en modelos animales para los síntomas positivos de la esquizofrenia (Philip Seeman et al., 2006). El estudio de las vías glutamatergicas en este modelo para la esquizofrenia no ha recibido tanta atención. Además los datos obtenidos muestran inconsistencias con los resultados que se presentan desde la clínica.

Se han desarrollado un gran número de **modelos de lesiones neonatales** dentro la hipótesis del neurodesarrollo. Estos modelos se basan en imitar los síntomas de la esquizofrenia mediante la lesión de estructuras cerebrales, en cierto momento del desarrollo, implicadas en la neurobiología de la esquizofrenia. El procedimiento más utilizado es inyectar ácido iboténico bilateralmente hacia el día postnatal (PD) 7. La mayoría de la investigación en esta área se ha centrado en el Hp ventral (HpV) dado que esta región regula la DA subcortical. La mayoría de signos psicopatológicos han sido mostrados hacia el PD 56 sin mostrar diferencias en la etapa adolescente.

En las ratas neonatales lesionadas en el HpV se ha observado un incremento en la locomoción en respuesta a la novedad, en el test de natación forzada y ante un desafío farmacológico de salino (SAL) o AMP (Flores, Barbeau, Quirion, & Srivastava, 1996; Lipska, Jaskiw, & Weinberger, 1993), lo que resulta de un incremento de la función dopaminérgica en áreas mesolímbicas. En relación a los síntomas negativos también se ha mostrado alteraciones en las interacciones sociales y un aumento del comportamiento agresivo en animales con esta lesión (Becker, Grecksch, Bernstein, Hollt, & Bogerts, 1999; Sams-Dodd, Lipska, & Weinberger, 1997). Además, se han observado alteraciones en el aprendizaje espacial, memoria de trabajo y PPI, lo que indica que este modelo puede simular algunos de los síntomas cognitivos presentes en los pacientes con esquizofrenia (R A Chambers, Moore, McEvoy, & Levin, 1996;

Le Pen et al., 2000).

Los últimos modelos que se describen en este apartado son los que corresponden a la etiología de la esquizofrenia mediante la **MIA provocada por una infección vírica o bacteriana en la gestación**. Como en el caso de la evidencia clínica, expuesta anteriormente, se ha utilizado para reproducir la sintomatología esquizofrénica: **H2N2**, **lipopolisacárido (LPS)** y el **ácido poliinosínico-policitidílico (Poli I:C)**. Estos agentes son inyectados en las ratas gestantes y los efectos son medidos subsecuentemente en las crías. El **LPS** es un gran complejo lipídico-polisacárido liberado de la pared celular externa de bacterias Gram-negativas y que se une a los receptores tipo toll 4 (TLR4), siendo capaz de estimular respuestas inmunes, como la liberación de citoquinas maternas que provocarán cambios en el neurodesarrollo fetal (**Figura 5**). El **Poli I:C**, al igual que el LPS, también es un inmunoestimulante, sin embargo en este caso imita una infección vírica, debido a que su estructura, ARN de doble hélice, es análoga a la presente en los virus. Mientras que el LPS y el Poli I:C se administran por vía subcutánea (sc), intravenosa (iv) o intraperitoneal (ip), el H2N2 suele administrarse por vía nasal. Los distintos estudios varían en cuanto al GD y el número de dosis en la administración de estos agentes, lo que va a determinar en gran medida los efectos observados en las crías.

En la década de los 90, Cotter fue el primero en desarrollar este tipo de modelos utilizando el virus H2N2 en períodos equivalentes al segundo trimestre de gestación en ratas. Futuras investigaciones comenzaron a utilizar el **virus influenza subtipo 1** y varios puntos de tiempo en la administración. En estos estudios se han encontrado alteraciones en un amplio número de genes en las crías cuyas madres fueron infectadas en los GD 7, 9, 16 y 18. Además, muchas de las alteraciones en estos genes se han relacionado con las encontradas en casos de hipoxia, inflamación y esquizofrenia en humanos (Fatemi et al., 2012). También, se han encontrado reducciones de las áreas corticales, Hp y en los ventrículos de ratones que fueron infectados en su etapa embrionaria (Kneeland, Rachel E, Fatemi, 2014). Y por último, se ha documentado alteraciones conductuales y déficits en la neurotransmisión asociados a la esquizofrenia durante el periodo prenatal .

A diferencia del virus influenza, que es un patógeno vivo, el LPS o el Poli I:C imitan la activación inmune que acompaña a una infección viral o bacteriana. Por tanto estos dos compuestos son los más utilizados ya que permiten mayor control sobre el curso infeccioso y la exposición al inmunógeno, permitiendo más claramente las ventanas de vulnerabilidad (Boksa, 2010).

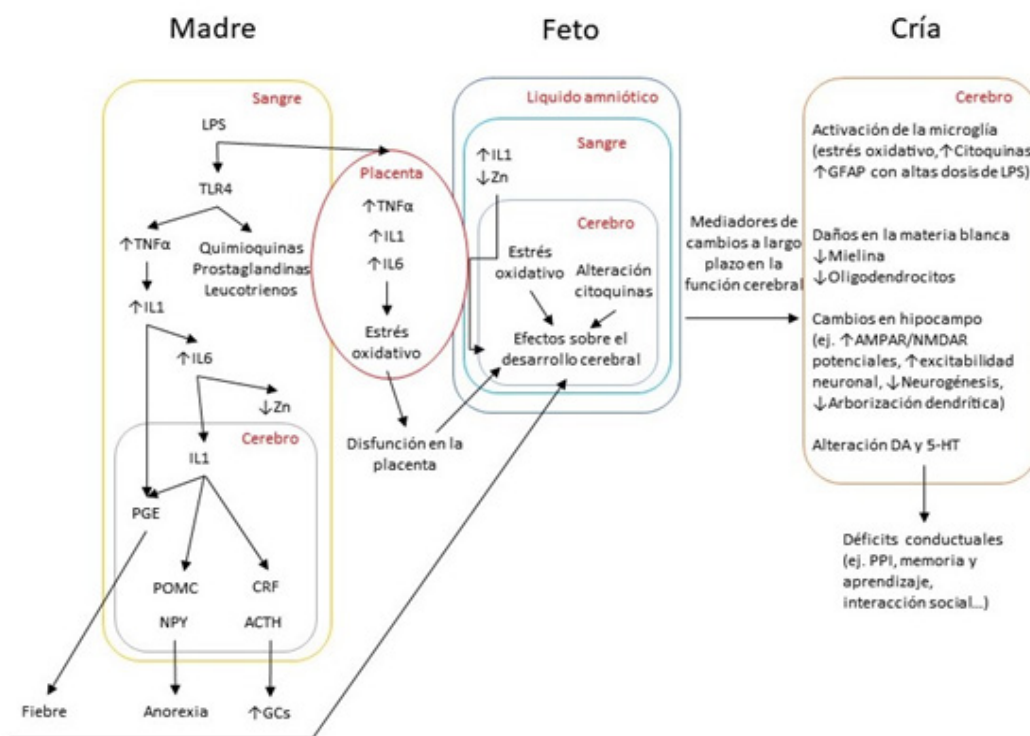


Figura 5.

Mecanismos que median la infección prenatal, a corto y largo plazo, en la función cerebral.

La unión de LPS a TLR4 induce la liberación de TNFα, IL1, IL6, quimioquinas, prostaglandinas y leucotrienos. IL6 interactúa con dianas cerebrales para inducir la síntesis de la PGE hipotalámica que produce la fiebre, junto con los neuropéptidos que median en la anorexia y aumentos en la secreción de glucocorticoides. El aumento de la producción de citoquinas también conduce a la disminución de los niveles plasmáticos de Zn en sangre materna y fetal. El LPS aumenta las citoquinas placentarias y el estrés oxidativo, factores que se sabe que contribuyen a la disfunción placentaria. A nivel del cerebro fetal, la exposición al LPS puede causar estrés oxidativo agudo y alterar la función de las citoquinas, afectando al desarrollo del cerebro fetal a largo plazo. La función cerebral, en la descendencia, presenta alteraciones que incluyen la activación microglial, el aumento del estrés oxidativo, el aumento de los niveles de citoquinas y GFAP, la lesión de la sustancia blanca y la hipomielinización. También se han documentado cambios estructurales y electrofisiológicos en el hipocampo y alteraciones en el metabolismo de las monoaminas. Todo ello da lugar a alteraciones observadas en la esquizofrenia.

Abreviaturas: AMPAR, receptor α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato; CRF, factor liberador de corticotropina; DA, dopamina; GCs, glucocorticoides; GFAP, proteína ácida fibrilar glial; 5-HT, serotonina; IL, interleuquina; LPS, lipopolisacárido; NMDAR, receptor N-metil-D-aspartato; NPY, Neuropéptido Y; PGE, prostaglandina E; POMC, pro-opiomelanocortina; PPI, inhibición del prepulso de la respuesta de sobresalto; TLR, receptor toll tipo 4; TNF, factor de necrosis tumoral; Zn, zinc.

La administración de LPS o Poli I:C en ratas gestantes aumenta los niveles de citoquinas de la madre en respuesta a la infección, concretamente interleuquina 1 β (IL1 β), interleuquina 6 (IL6) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), produciendo fiebre (Ashdown et al., 2006; M.-E. Fortier, Joober, Luheshi, & Boksa, 2004; Gayle et al., 2004).

Los efectos agudos de la activación pretanal inmune en respuesta a la infección se miden dentro las 24 h siguientes a la administración de LPS o Poli I:C. Los niveles de citoquinas suelen ser evaluados en la placenta, cerebro fetal o líquido amniótico.

Se han encontrado cambios agudos en los niveles de citoquinas en la placenta en respuesta a la infección materna. En concreto se han encontrado incrementos en TNF α , IL6 e IL1 β tras la administración de LPS o Poli I:C en el GD 16-18 en ratas gestantes (Ashdown et al., 2006; Urakubo, Jarskog, Lieberman, & Gilmore, 2001). Estos hallazgos son consistentes con la idea que las alteraciones de citoquinas en la placenta tienen efecto sobre el neurodesarrollo fetal (Y.-H. Chen et al., 2006; D.-X. Xu et al., 2006; C. Zhang, Li, Zhao, Wang, & Xu, 2007).

En cerebro fetal hay mayores discrepancias, mientras que unos autores relatan incrementos en los niveles de ARNm de TNF α , IL6 e IL1 β (Cai, Pan, Pang, Evans, & Rhodes, 2000; Jeffrey A Lieberman et al., 2008), otro estudio no encontró ninguna diferencia tras la administración de LPS en el GD 18 (Gayle et al., 2004). Por tanto, actualmente, no queda claro el mecanismo exacto por el cual la MIA afecta al cerebro fetal para llegar a generar déficits comportamentales en la etapa adulta. En cuanto a los efectos de Poli I:C en el cerebro fetal los cambios observados son complejos de evaluar. IL1 β decrece tras la administración en GD 9 pero si se realiza en el GD 17 los niveles se ven incrementados. En IL6 los niveles aumentaron tanto en el GD 9 como en el GD 17, sin embargo en TNF α solo se observaron cambios en el GD 9 (Meyer et al., 2006).

Parece que las alteraciones conductuales producidas por LPS pueden diferir dependiendo del GD en el que se aplica el tratamiento. Se han encontrado déficits en el aprendizaje espacial cuando la exposición a LPS ocurrió en el GD 9 (Lante et al., 2008), sin embargo estos cambios en el laberinto acuático de Morris no se han observado en el GD 17 (Golan, Lev, Hallak, Sorokin, & Huleihel, 2005). Del mismo modo, en el test de reconocimiento del objeto novedoso (NOR) los animales que fueron expuestos prenatalmente a LPS en el GD 17 mostraron un incremento en el reconocimiento del objeto novedoso (Golan et al., 2005), mientras que la administración de LPS en el GD 9 disminuyó el contacto con el mismo, indicando déficits en la memo-

ria (Coyle, Tran, Fung, Summers, & Rofe, 2009). En el estudio de Ling et al., 2009, la actividad locomotora aumentó cuando fue medida a PD 90 pero no fue estable a lo largo del tiempo, mostrando una disminución en el PD 480 (Ling et al., 2009).

Se han observado alteraciones en la exploración y un aumento de la ansiedad en animales expuestos prenatalmente a LPS, siendo estos cambios dependientes de la edad y el sexo, concretamente en las hembras de mediana edad (Wang et al., 2010). El número de interacciones sociales también se ha encontrado disminuido en las ratas tratadas prenatalmente con LPS (Hava, Vered, Yael, Mordechai, & Mahoud, 2006), incluso un estudio posterior realizado con crías en la etapa neonatal observó una reducción en el número y duración de las vocalizaciones en aquellas cuyas madres habían sido tratadas con LPS, además también mostraron deficiencias en la búsqueda del nido y en el aprendizaje asociativo hacia el olor maternal (Baharnoori, Bhardwaj, & Srivastava, 2012). En relación con la identificación y reconocimiento maternal, un estudio realizado con segunda generación de crías tratadas con LPS relacionó estas alteraciones neonatales con el desarrollo de ansiedad en la etapa adulta (Penteado et al., 2014). Estos resultados muestran que los déficits en interacción social producidos por LPS pueden jugar un papel importante desde etapas tempranas del desarrollo y además pueden desencadenar en alteraciones en la etapa adulta.

Distintos estudios también han mostrado déficits en el PPI tras la administración de LPS en la etapa gestacional con distintas dosis y vías (Borrell, Vela, Arevalo-Martin, Molina-Holgado, & Guaza, 2002; M. E. Fortier, Luheshi, & Boksa, 2007; Eva Romero et al., 2007). No obstante, parece haber discrepancia con los resultados encontrados en cuanto al sexo. Howland, Czakoff, & Zhang, 2012 no observó ninguna diferencia entre los sexos en la reducción del PPI, sin embargo otros estudios revelaron diferencias dependientes del sexo, mostrando en las hembras mejores resultados en el PPI en comparación con los machos, lo que podría ser explicado por el efecto protector de los estrógenos (Wischhof, Irrsack, Osorio, & Koch, 2015).

Los cambios morfológicos tras la administración prenatal de LPS muestran un detrimento en la densidad de la neurogénesis hipocampal (Cui, Ashdown, Luheshi, & Boksa, 2009), además de una disminución de la longitud dendrítica, arborización y densidad de las espinas dendríticas en el Hp y CPf (Baharnoori, Brake, & Srivastava, 2009). Además, se han encontrado incrementos de muerte celular en regiones de la materia blanca (Paintlia, Paintlia, Contreras, Singh, & Singh, 2008).

A nivel neuroquímico, parece haber una hipofunción en los receptores NMDA hipocampales, producida por la exposición prenatal a LPS (Escobar et al., 2011).

Otros estudios han encontrado que en crías cuyas madres fueron tratadas con LPS, los niveles de DA y 5HT estaban disminuidos en NAcc, CPf medial e Hp respectivamente. (Lin & Wang, 2014).

Con la administración de Poli I:C las alteraciones conductuales parecen indicar déficits en la memoria de trabajo, en NOR, en la interacción social y el PPI, disminuidos en todos casos (Meyer, Nyffeler, Yee, Knuesel, & Feldon, 2008; Ozawa et al., 2006; Smith, Li, Garbett, Mirnics, & Patterson, 2007). Distintos estudios refieren alteraciones morfológicas tras la administración prenatal de Poli I:C que incluyen una disminución en la neurogénesis hipocampal y un incremento del volumen ventricular (Q. Li et al., 2009; Meyer et al., 2006).

1.6 Relevancia clínica de los biomarcadores en la esquizofrenia

Los biomarcadores hacen referencia a cambios moleculares dados en los tejidos o fluidos del cuerpo y que pueden ser utilizados como indicadores clínicos. La importancia de los biomarcadores en la esquizofrenia viene dada por la naturaleza heterogénea del trastorno ya que se ha mostrado en múltiples estudios la diferencia en los cuadros sintomatológicos que se presenta entre los diferentes pacientes esquizofrénicos, teniendo más preponderancia unos síntomas sobre otros. Esto, en ocasiones, puede dar lugar a cierta confusión por parte de los clínicos en cuanto al diagnóstico de la enfermedad, llegando a diagnosticarse erróneamente ciertas psicopatologías a lo largo de la vida hasta dar con el trastorno en cuestión. Es obvio, que esta confusión deriva en graves consecuencias en el tratamiento y curso de la enfermedad. En el caso de la esquizofrenia, cobra importancia en los síntomas premórbidos, donde principalmente se presenta un cuadro de poca motivación, aislamiento social y síntomas atencionales, lo que en ocasiones podría confundirse con un diagnóstico de depresión (McGorry, Nelson, Goldstone, & Yung, 2010).

Generalmente, los biomarcadores son desarrollados con los siguientes propósitos:

- **Diagnóstico:** para clasificar el trastorno mediante los biomarcadores. Uno de los principales objetivos en el diagnóstico con biomarcadores sería la capacidad de discriminar la esquizofrenia de otros trastornos psiquiátricos.
- **Pronóstico:** El uso de los biomarcadores también puede ayudar en el pronóstico del trastorno ya que estos están presentes antes de la sintomatología, y se podrían utilizar para iniciar un tratamiento temprano que evitase el inicio de la esquizofrenia.
- **Teragnóstico:** Consiste en la mejor elección del tratamiento en función de

las características patológicas del paciente. Así se podría optimizar el tratamiento produciendo una mínima toxicidad con unos resultados más positivos en el curso del trastorno. Es lo que se podría denominar como tratamiento individualizado.

Parece ser que las personas con esquizofrenia muestran alteraciones en la expresión génica, factores epigenéticos, proteínas y en marcadores inflamatorios de sangre periférica, por tanto el estudio de los biomarcadores en sangre se presenta como una opción interesante para el diagnóstico temprano o incluso un tratamiento más adecuado (Chan et al., 2014; Hayashi-Takagi, Vawter, & Iwamoto, 2014; Pickard, 2015). En la **figura 6**, se muestra un resumen de los potenciales biomarcadores para la esquizofrenia hallados en sangre periférica.

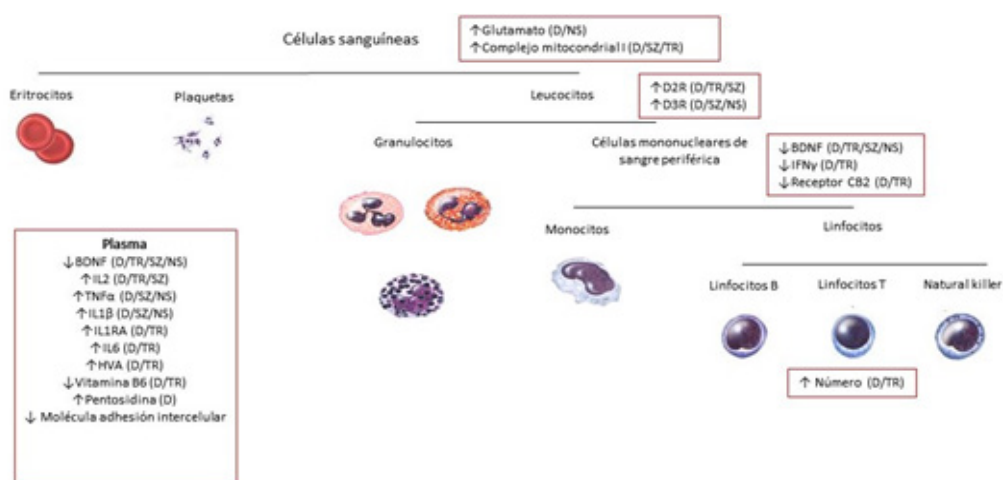


Figura 6.

Representación de los potenciales biomarcadores para la esquizofrenia.

Los biomarcadores han sido clasificados por el diagnóstico (D), por el tratamiento (TR) o por las correlaciones que mostraban con síntomas de esquizofrenia (SZ). Por último, también se muestran los que no han sido exclusivos de la esquizofrenia (NS). Adaptado de Lai et al., 2016.

Se ha comprobado que los **niveles de neurotrofinas** están alterados en la esquizofrenia, en concreto se ha documentado una disminución de los niveles de BDNF. En los análisis realizados en plasma no se han mostrado correlaciones entre los síntomas (positivos o negativos) y los niveles de BDNF (Fernandes et al., 2015), pero sí se han observado asociaciones con los síntomas cognitivos (Asevedo et al., 2013). Como marcador para el pronóstico, en estudios de neuroimagen, el BDNF correlacionó positivamente con N-acetil-aspartato, un indicador de la integridad neuronal y la actividad cerebral (Lang, Hellweg, Seifert, Schubert, & Gallinat, 2007). Pese a estos resultados optimistas, queda aún mucho camino para proponer al BDNF como bio-

marcador específico de la esquizofrenia, ya que algunos de estos resultados también han sido encontrados en el trastorno bipolar y el trastorno depresivo mayor.

Una amplia revisión sobre los **biomarcadores en plasma** para la esquizofrenia explica que más del 70% están relacionados con la respuesta inflamatoria (Chan et al., 2011). Los biomarcadores relacionados con la respuesta inmune incluyen a IL6, IL2, IL8, IL1 β y TNF α . Los niveles de ARNm de TNF α e IL1 β están incrementados en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en pacientes con esquizofrenia (L. Liu et al., 2010), mientras que los niveles de ARNm de Interferón gamma (IFN γ) parecen estar disminuidos (Freudenreich et al., 2010). También se han encontrado diferencias en el número de células, mostrando un aumento en los monocitos y linfocitos T en esquizofrénicos (Cazzullo et al., 1998; Drexhage et al., 2011).

En los síntomas de la esquizofrenia se observan correlaciones con los niveles de algunas **citoquinas**. En cuanto a la IL2 se han demostrado correlaciones positivas con los síntomas cognitivos, y negativas con los síntomas negativos. El factor de psicopatología general, recogido en la escala de síntomas positivos y negativos (PANSS) ha correlacionado positivamente con los niveles de ARNm de IL1 β y TNF α en PBMC (L. Liu et al., 2010). Estos efectos se han comprobado también por el uso de antipsicóticos y por cómo estos pueden modular la respuesta inflamatoria. Así, después del tratamiento de antipsicóticos, típicos y atípicos, se muestran niveles disminuidos de IL2, IL1RA y IL10 (de Witte et al., 2014; Y. K. Kim, Kim, & Lee, 2000; X. Y. Zhang et al., 2004). El recuento de células inmunes también presenta cambios después del tratamiento con antipsicóticos. El haloperidol, incrementa el número de células T CD3+ (molécula presente en todos los linfocitos T) y CD4+ (molécula que se expresa en los linfocitos T colaboradores), además de células secretoras de IL2 (X. Y. Zhang, Zhou, Cao, & Wu, 2006).

También se ha propuesto que ciertos **componentes de las vías dopaminérgicas y glutamatérgicas** podrían ser biomarcadores del trastorno esquizofrénico. Los niveles de ARNm de los D2R en linfocitos se muestran incrementados en pacientes esquizofrénicos, mientras que los D4R disminuyen en células T CD4+ (Boneberg et al., 2006). Sin embargo, estas alteraciones no parecen ser específicas de la esquizofrenia ya que fueron encontradas en otros trastornos psiquiátricos.

En cuanto a la sintomatología esquizofrénica existen estudios de biomarcadores que apoyan la idea de que los niveles altos de DA provocan estados psicóticos. En este sentido, se encontró que los síntomas positivos correlacionaban positivamente con los niveles de ARNm de los D2R en linfocitos (L. Liu et al., 2013). Además, la

severidad de los síntomas también correlacionó con los niveles de ARNm de los D3R y D5R en linfocitos (Kwak, Koo, Choi, & Sunwoo, 2001).

En las vías glutamatérgicas, la mayoría de los estudios se han centrado en los niveles de Glu, debido a los resultados provenientes desde la clínica que han documentado niveles altos de Glu en sangre de pacientes esquizofrénicos (J. Song, Viggiano, Monda, & De Luca, 2014). Sin embargo, estos aumentos de Glu también han sido encontrados en el trastorno depresivo mayor (J. S. Kim, Schmid-Burgk, Claus, & Kornhuber, 1982). La D-serina y la Glicina aumentaron en pacientes con esquizofrenia crónica (Ohnuma et al., 2008). Así, se han hallado niveles bajos de D-serina en los pacientes que son resistentes al tratamiento (Yamamori et al., 2014), a la vez que estos niveles correlacionan con la mejora de los síntomas positivos, pero no de los cognitivos (Ohnuma et al., 2008, 2012).

Otros estudios se han centrado en las moléculas que se encargan del **control homeostático de la glucosa**. Se ha propuesto que las proteínas de la vía glicolítica podrían ser un biomarcador potencial para el diagnóstico de los primeros estadios de la esquizofrenia (Herberth et al., 2011). Además esta vía, puede ser un predictor para aquellos pacientes que desarrollan síntomas extrapiramidales a consecuencia de del tratamiento de los antipsicóticos (Mas, Gasso, Parellada, Bernardo, & Lafuente, 2015).

En cuanto a los **marcadores epigenéticos periféricos** las inconsistencias entre los estudios no permiten proponerlos como biomarcadores potenciales. Aunque se han encontrado patrones de metilación y expresiones de miARN diferenciales entre los pacientes esquizofrénicos y los controles, urge la necesidad de un mayor número de investigaciones relacionadas con ellos (Lai et al., 2016).

Aunque el estudio de los biomarcadores en esquizofrenia es un área prometedora en cuanto al diagnóstico y pronóstico de este trastorno mental, en la actualidad no se puede concluir que ninguno de ellos sea idóneo para estos propósitos. Las dificultades que se encuentran son diversas, desde la heterogeneidad que se muestra entre los distintos pacientes hasta la similitud de estos resultados que son compartidos con otros trastornos psicológicos. Además, cabe esperar que el uso de modelos animales permita aislar el potencial biomarcador de ciertas poblaciones inmunológicas tanto para detectar el inicio o estimar el pronóstico de la enfermedad.

2. Trastornos adictivos

2.1 Consideraciones diagnósticas

Las modificaciones realizadas por el DSM-5 en relación a los trastornos por abuso de sustancias (TUS) principalmente han consistido en evitar cierta terminología y se han creado subcategorías para cada conjunto de drogas (ej: estimulantes, alucinógenas...) que contienen síntomas específicos para el diagnóstico más preciso. En esta nueva versión, los aspectos claves del TUS son comunes independientemente de la droga. Por tanto, para resumir, el diagnóstico según el DSM-5 para el TUS comprendería los siguientes síntomas, de los cuales deben presentarse al menos dos de ellos dentro de un periodo de 12 meses: Tolerancia, síntomas de abstinencia, uso de la droga por largos periodos de tiempo, incremento en la cantidad de droga, dificultad para restringir su uso, *craving* o fuerte deseo por consumir, invertir mucho tiempo en actividades relacionadas con el consumo, problemas interpersonales, sociales y laborales asociados al consumo; y un uso continuado del consumo a pesar de sus consecuencias negativas.

2.2 Adicción a la cocaína

La **cocaína** (COC) es un alcaloide con acción analgésica sobre el sistema nervioso periférico y estimulante sobre el SNC. Se obtiene de las hojas de dos especies de arbustos: *Erythroxylum coca* y *Erythroxylum novogranatense*. La proporción de alcaloides en la hoja de coca suele estar entre el 0.1 y el 0.8 % y su componente principal es la COC.

La COC ejerce su **acción sobre el sistema nervioso** a través de distintos mecanismos:

- En los terminales monoaminérgicos, donde inhibe la recaptación de DA, 5-HT y noradrenalina mediante el bloqueo competitivo de sus transportadores, lo que conlleva una mayor activación de los receptores postsinápticos de estos neurotransmisores (Amara & Kuhar, 1993).
- Presinápticamente, inhibiendo los DAT, localizados en los terminales nerviosos mesolímbicos y nigroestriatales, que se encargan de almacenar la DA del citoplasma previamente sintetizada y/o de la DA recaptada desde el espacio sináptico. Se ha sugerido que la COC provoca un rápido pero reversible aumento en la DA vesicular recaptada por este transportador (Brown, Hanson, & Fleckenstein, 2001).

- Como agonista en distintos sistemas de neurotransmisión debido a su afinidad con receptores serotoninérgicos, muscarínicos M1 y M2 y receptores sigma (Kilpatrick, Jones, & Tyers, 1989).
- Como anestésico local, bloqueando los canales de sodio (Na⁺) dependientes de voltaje.

Dependiendo de la **vía de administración** se va a determinar la rapidez en el comienzo de la acción, la concentración en sangre y la duración de los efectos euforizantes. En la administración iv y pulmonar el inicio de acción es más rápido y los efectos son menos duraderos, al contrario que en la administración por vía intranasal. El comienzo de los efectos psicoactivos de la COC tardan en producirse entre 8 s y 30 min y pueden mantenerse entre 5 y 90 min, dependiendo en gran parte de la vía de administración.

El **metabolismo** principal de la COC tiene lugar mediante una hidrólisis enzimática hepática rápida que produce los metabolitos inactivos benzoilecgonina (45%), metil-éster ecgonina (45%) y ecgonina; también se producen cantidades menores de norcocaína. En la vía de administración fumada se produce, además, metil-éster anhidroecgonina como metabolito. El consumo conjunto con alcohol da lugar a etilencocaína, cocaetileno o etilbenzoilecgonina, un potente estimulante con una vida media 2 o 3 veces más larga que la COC (Hart, Jatlow, Sevarino, & McCance-Katz, 2000).

2.3 Datos epidemiológicos

Los datos del European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction revelan que la **COC es la segunda droga ilegal más consumida en Europa** por detrás del cannabis, pero en cuanto a las drogas psicoestimulantes se sitúa en el primer lugar. Este número de consumidores potenciales (70%) se concentran en un reducido número de países, siendo España uno de ellos (European Monitoring Center for Drug and Drug Addiction, 2016).

En la **figura 7**, se muestra la prevalencia del **consumo de COC en España, siendo de la más alta de la Unión Europea en la población adulta** (15-34 años). La tendencia del consumo en nuestro país ha ido en aumento durante más de una década, superando el 3%, hasta el año 2008, donde parece situarse estable o tiende a disminuir (European Monitoring Center for Drug and Drug Addiction, 2016).

Entre hombres y mujeres existen diferencias en cuanto a la prevalencia del consumo, triplicándose el porcentaje en los primeros (6%) frente a las mujeres (2%). El rango de edad de mayor consumo en los hombres es el comprendido entre los 25-34 años, adelantándose en el caso de las mujeres de los 15-24 años (Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías, 2016).

Los datos de las admisiones a tratamiento ponen de manifiesto que la COC es la droga ilegal que muestra mayores porcentajes (36,5% del total) siendo la edad media de 35 años y considerando un estatus social medio, en situación de empleado y no precariedad familiar o social. En cuanto a los índices de mortalidad atribuidos a esta droga en Europa se elevan a más de 800 en 2015 y en España a 269 muertes en agudo en 2014 (Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías, 2016).

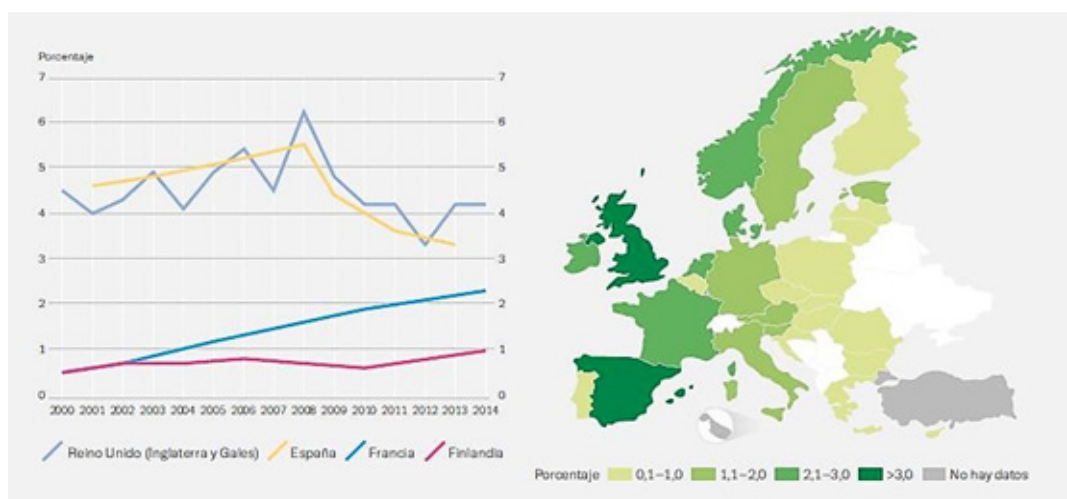


Figura 7.

Prevalencia del consumo de cocaína en el último año entre los adultos jóvenes (15-34) en la Unión Europea. European Monitoring Center for Drugs and Drug Addiction 2016.

El consumo habitual de COC, por vía nasal, puede asociarse a problemas cardiovasculares, neurológicos y psiquiátricos, así como a un mayor riesgo de accidentes y a la transmisión de enfermedades infecciosas en relaciones sexuales sin protección (Brugal et al., 2009), mientras que el consumo por vía parenteral y el de crack se asocian a riesgos sanitarios más altos, entre ellos problemas cardiovasculares y de salud mental. Tales riesgos se agravan generalmente con la marginación social y con algunos otros problemas específicos, como los propios del consumo por vía parenteral: transmisión de enfermedades infecciosas y sobredosis (Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías, 2016).

2.4 Bases neurobiológicas de la adicción

Los experimentos de Olds y Milner en animales de experimentación mostraron que en el cerebro existen **centros especializados responsables del reforzamiento positivo**. En estos estudios se demostró que la estimulación eléctrica de lugares específicos del cerebro es altamente reforzante, ya que observaron que las ratas emitían conductas operantes para recibir estimulación eléctrica en estos lugares del cerebro, dejando de emitir cualquier otro tipo de conducta (Olds & Milner, 1954). A partir de los años 60, los **estudios de autoadministración** demostraron que las drogas podían actuar como reforzadores positivos, lo cual contribuyó a la idea actual de que las drogas actúan sobre un sistema de recompensa especializado y organizado neuroanatómicamente, que es común para varias clases de reforzadores, incluidos los reforzadores naturales.

El **sistema mesocorticolímbico**, (**Figura 8**) está formado por una serie de núcleos interconectados entre sí de forma que permite una circulación relativamente fluida de información desde la porción ocupada por los núcleos del circuito límbico-estriado-pálido hacia los sistemas motores piramidal y extrapiramidal (Pennartz, Groenewegen, & Lopes da Silva, 1994; C. I. Wright, Beijer, & Groenewegen, 1996). La porción dopaminérgica se origina en el área tegmental ventral (VTA) y forma una primera vía que envía eferentes desde las áreas productoras de dopamina A8, A9 y A10 del VTA al shell (parte lateral) y al core (parte del centro) del NAcc, estructura que está situada en la parte ventral del St. El shell del NAcc envía eferencias GABAérgicas de retorno al VTA y hacia el tálamo dorsomedial y la zona dorsal de la CPf, pasando esta proyección por el pálido ventral (VP).

La CPf dorsal envía eferencias glutamatérgicas al core del NAcc y a la sustancia negra y, desde esta última, se envían eferencias dopaminérgicas de salida del sistema (área A9) hacia los sistemas motores. Una segunda vía de este sistema, parte también del VTA dirigiéndose hacia el NAcc core y el VP dorsolateral para confluir en una vía única de carácter GABAérgico que se proyecta a tres estructuras claramente diferenciadas: la sustancia negra, la región medial del núcleo subtalámico y el núcleo pedúnculo pontino. Esta última estructura converge con las otras dos vías de eferencias colinérgicas, en los sistemas piramidal y extrapiramidal (R C Pierce & Kalivas, 1997).

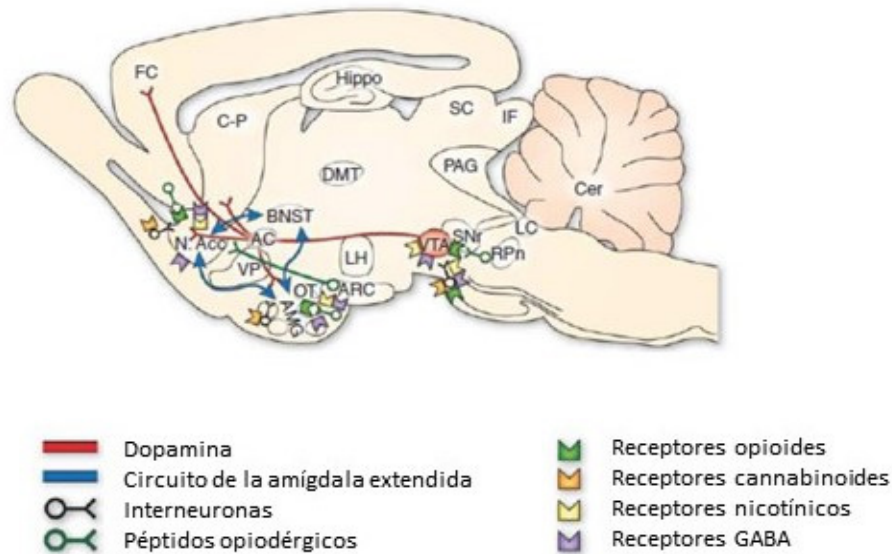


Figura 8.

Circuitos neuroquímicos en el refuerzo de las drogas. Adaptado de G. F. Koob & Volkow, 2010.

Diferentes estudios indican que la actividad neuronal del circuito mesocortico-límbico subyace al refuerzo producido por la COC (R Christopher Pierce & Kumanresan, 2006; Wise, 2004) y participa en la recaída (Kalivas & McFarland, 2003; Shaley, 2002). La hipótesis de estos estudios consiste en que la adicción a la COC es debida a neuroadaptaciones en los procesos de aprendizaje y memoria en el sistema dopaminérgico y glutamatérgico del sistema de recompensa (Wolf, Sun, Mangiavacchi, & Chao, 2004). Dichas neuroadaptaciones también son observadas en la plasticidad sináptica tras el consumo. Tanto la DA como el aprendizaje parece que incrementa la excitabilidad neuronal por una vía de mecanismos no sinápticos, más bien intrínseca (Buchta & Riegel, 2016).

Aunque las propiedades reforzantes de las drogas psicoestimulantes dependen en gran medida de la activación del sistema mesocorticolímbico, esta activación no parece ser crítica en los efectos reforzantes de otras drogas (Nestler, 2005). Específicas lesiones de DA en el NAcc no bloquean la autoadministración de alcohol o heroína. Parece ser que el VTA está más implicado en las acciones reforzantes de estas drogas. Por ejemplo, se ha encontrado que las inyecciones de opioides en este área aumentan el CPP.

En cuanto a los diferentes **estadios de la adicción** se han encontrado áreas específicas que pueden ser principalmente asociadas con estos. En la **fase aguda**, el núcleo central de la Amg (CeA) juega un importante papel en las propiedades

reforzantes de las drogas. En diferentes estudios se ha podido bloquear la autoadministración de COC mediante microinyecciones de antagonistas del D1R en este área (Caine, Heinrichs, Coffin, & Koob, 1995; McGregor & Roberts, 1993). Lesiones en CeA también muestran un bloqueo en la autoadministración oral de alcohol (Moller, Wiklund, Sommer, Thorsell, & Heilig, 1997). El bloqueo de los receptores de DA y ácido- γ -aminobutírico (GABA) en el VP bloquearon los efectos reforzantes del alcohol (Melendez, Rodd, McBride, & Murphy, 2004) y las lesiones en este área parecen ser efectivas en el bloqueo de la motivación para conseguir inyecciones intravenosas de COC o heroína (Hubner & Koob, 1990; Robledo & Koob, 1993). El St dorsal, en cambio, parece mostrar un papel más importante en la transición al **uso compulsivo de la droga** más que a los efectos reforzantes agudos (Everitt et al., 2008). Mientras que en los **periodos de abstinencia**, se muestra una disminución de la neurotransmisión serotoninérgica en el NAcc para la mayoría de drogas, además debido a la modulación de la respuesta de estrés ante la abstinencia, el eje hipotálamico-hipofisario-adrenal respondería con elevados niveles de adenocorticotropina, corticoesterona y factor de liberación de corticotropina en Amg durante esta fase (G. F. Koob, 2008; G. Koob & Kreek, 2007). Por último, los cambios asociados a la **recaída por claves o por droga**, después de un periodo de abstinencia, parecen relacionarse con la neurotransmisión glutamatérgica desde CPf al NAcc core, con la proyección dopaminérgica desde la VTA hasta el CPf medial y las proyecciones GABAérgicas desde el NAcc al VP (Kalivas & O'Brien, 2008a). Sin embargo, en la formación de hábitos que lleva a la búsqueda de droga parecen estar mediando los circuitos amígdalo-estriatales. En concreto parece que la transición del uso al abuso de COC estaría mediado por el desplazamiento que se ejerce sobre el aumento de DA dependiente desde la Amg basolateral hacia el CeA, que parece ser clave para mantener esta conducta (Murray et al., 2015).

2.5 Modelos animales en adicción

En las últimas dos décadas se han desarrollado exitosos modelos que emulan los fenotipos adictivos con animales. En este sentido, los manuales diagnósticos han sido de ayuda, ya que con una mejor definición y clasificación de los criterios para diagnosticar la adicción se han desarrollado modelos animales que pretenden explicar cuáles son los mecanismos que subyacen a los mismos. En una revisión realizada por Vanderschuren & Ahmed, 2013, se han identificado cuales son los modelos animales que se corresponden con la sintomatología descrita en el DSM.

En primer lugar, como medidor general de la adicción se ha propuesto la **escala da en el consumo** ya que la pérdida de control viene acompañada por un incremen-

to en el abuso de la sustancia (Kalivas & O'Brien, 2008b; Vanderschuren & Everitt, 2005). En el caso de la COC, se ha encontrado que las ratas que se autoadministraban la droga en régimen de acceso extendido (6h/día) incrementaban gradualmente su consumo en comparación con aquellas que seguían un régimen de acceso limitado a la droga (1h/día) (Ahmed & Koob, 1999).

En cuanto a los **déficits cognitivos** encontrados en la población adicta es importante resaltar que estos generan mayores consecuencias negativas en el proceso adictivo. Por un lado porque mantienen la conducta adictiva, como en el caso del control de impulsos, donde el refuerzo inmediato es preferido aun siendo menor que el demorado, pero también porque reducen el éxito de los programas de rehabilitación. En este sentido se ha comprobado que las ratas que han mostrado alta impulsividad parecen tener una mayor vulnerabilidad al consumo de alcohol, nicotina y COC en el paradigma de autoadministración (Diergaarde et al., 2008; Perry, Larson, German, Madden, & Carroll, 2005; Poulos, Le, & Parker, 1995).

La **resistencia a la extinción** es otra característica principal del proceso adictivo. En este sentido se ha observado que las ratas expuestas a periodos en los cuales son privadas a la droga después de un consumo prolongado, incrementan sus respuestas en este periodo de abstinencia (Belin, Balado, Piazza, & Deroche-Gamonet, 2009; Deroche-Gamonet, Belin, & Piazza, 2004).

Otra característica es la **motivación por la droga** que ha sido estudiada usando un programa de razón progresiva, donde los animales para conseguir la misma dosis tienen que presionar más veces la palanca donde se encuentra el reforzador. El estudio llevado a cabo por Richardson et al. 1996, comprobó que tras un periodo de autoadministración de COC obtenían mayores tasas de respuesta en el programa de razón progresiva (Richardson & Roberts, 1996).

En la población adicta también se ha encontrado **pérdida de interés en actividades que no están relacionadas con las drogas**, siendo otro de los síntomas claves en la adicción. Distintos estudios han mostrado que los animales preferían COC cuando el valor esperado del otro reforzador era bajo, sin embargo la revertían y preferían el otro reforzador (comida o agua con sacarosa) cuando el valor esperado aumentaba (Cantin et al., 2010; Lenoir, Serre, Cantin, & Ahmed, 2007). Este mismo estudio comprobó que incluso cuando las ratas estaban privadas de comida y se les ofrecía como reforzador alternativo, comida o agua con sacarosa, necesario para aumentar las calorías, seguían prefiriendo el consumo de COC (Cantin et al., 2010).

En último lugar, las **consecuencias negativas** de la adicción han sido estudiadas mediante el paradigma del castigo. Para ello se asocia el consumo o la búsqueda de droga con efectos adversos en los animales, ya sea la adulteración de la droga con sustancias amargas, elicitando una respuesta de enfermedad después de la ingesta de la droga o mediante shock eléctrico en las patas. Diversos estudios muestran que los animales llegan a ser insensibles al castigo por la preferencia de la droga. En ratas que tuvieron un consumo prolongado de COC los shocks eléctricos no suprimieron la búsqueda de la droga (Vanderschuren & Everitt, 2004).

3. Patología dual: esquizofrenia y adicción

3.1 Definición de patología dual

En términos clínicos, el **diagnóstico dual** ha sido definido como la comorbilidad entre un trastorno mental severo (aquellas que padecen síntomas de psicosis funcional) y un TUS. Concretamente la patología dual ha sido muy estudiada en la esquizofrenia ya que se ha observado un alta prevalencia de consumo de sustancias entre los pacientes que sufren este trastorno. De hecho, se ha encontrado que tienen un riesgo de consumo 4,6 veces mayor que otros que no presentan ningún trastorno mental (Dixon, 1999).

Considerando que la comorbilidad puede ser explicada por factores sociales, económicos y demográficos, las hipótesis que dan cuenta de esto han sido principalmente tres (**Figura 9**).

- En primer lugar se desarrolló la **hipótesis de la automedicación**, la cual argumenta que las personas que sufren esquizofrenia consumen drogas para aliviar los síntomas del trastorno o incluso de la medicación (Khantzian, 1997). Esta hipótesis se basa en el constructo psicológico del refuerzo negativo y en el hecho de que los pacientes incrementan la respuesta del consumo de sustancias para evitar este tipo de estímulos aversivos.

- La **hipótesis de la adicción como trastorno primario** no considera que un trastorno sea dependiente del otro. Más bien, sostiene que la esquizofrenia y el TUS surgen de una patofisiología común que proviene de la alteración de los mismos circuitos neuronales (R Andrew Chambers, Krystal, & Self, 2001). Esta hipótesis está soportada por dos principales ideas. La primera es, que la neuropatología que subyace a la esquizofrenia abarca alteraciones en los circuitos que regulan el refuerzo positivo, la motivación por incentivos y la inhibición conductual. Y la segunda, que los resultados obtenidos en los modelos animales apoyan al supuesto principal.

- Por último, se ha desarrollado la **hipótesis de diátesis-estrés** para explicar la patología dual. Esta hipótesis explica que la esquizofrenia es activada porque la vulnerabilidad genética para este trastorno es exacerbada por el consumo de sustancias (Caspi et al., 2005).

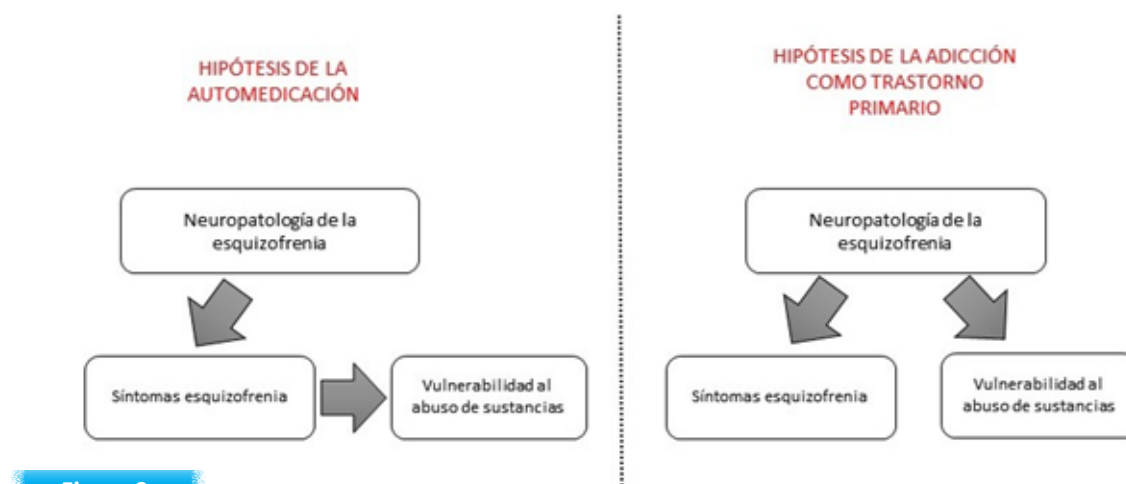


Figura 9.

Principales hipótesis de la patología dual en la esquizofrenia

3.2 Epidemiología en patología dual

Los datos epidemiológicos de patología dual en esquizofrenia son relativamente recientes, no se han obtenido en años anteriores a la década de los 60. Esto es debido a dos motivos principales, el primero es que el consumo de ciertas sustancias podía enmascarar al trastorno esquizofrénico y la segunda, por la poca concienciación de los profesionales clínicos en cuanto a la existencia de la comorbilidad psiquiátrica.

La **prevalencia en la comorbilidad entre esquizofrenia y TUS se sitúa en torno a un 50%** aunque la prevalencia de periodo, en los últimos estudios parece situarse en un 80%. La nicotina es claramente la droga más utilizada en estos pacientes, situándose entre un 70 y 90% comparado en el 26% de la población general (Buckley, 1998; Dervaux & Laqueille, 2008). Los porcentajes para el alcohol se encuentran entre un 20 y 60%, los pacientes esquizofrénicos parecen consumir esta sustancia por mejorar los síntomas positivos, en concreto las alucinaciones. El consumo de cannabis se ha relacionado con la fase temprana de la esquizofrenia y los primeros cuadros psicóticos y el abuso de esta sustancia en los pacientes duales parece ser de entre un 12 a un 42%. Por último, los psicoestimulantes, parecen mostrar menor prevalencia en las personas con esquizofrenia, aunque en el caso de la COC se sitúa entre un 15 a un 50% y en el de la AMP entre un 2 y un 15%. Por lo general, los pacientes

que presentan TUS junto con esquizofrenia parecen consumir más de una sustancia (Buckley, 1998; DeQuardo, Carpenter, & Tandon, 1994).

El diagnóstico dual conlleva efectos negativos sobre la salud y sobre el curso del trastorno psiquiátrico. De hecho, las personas que presentan esquizofrenia y TUS exhiben una mayor severidad de los síntomas, requieren más hospitalizaciones, recaen más en el trastorno, no responden bien al tratamiento e incluso tienen más riesgo de conductas suicidas en comparación con aquellos que solamente presentan esquizofrenia (Dixon, 1999; Hunt, Bergen, & Bashir, 2002; Schmidt, Hesse, & Lykke, 2011; Westermeyer, 2006).

Por lo tanto, parece que las personas que sufren esquizofrenia son más propensas a presentar TUS, que en la población normal de presentar esquizofrenia, considerándose el consumo un factor de riesgo en el trastorno. Aunque este riesgo parece diferir entre distintos subgrupos. Por ejemplo, en el caso del género se ha encontrado que los hombres presentan con mayor frecuencia el diagnóstico dual en comparación con las mujeres (Cantor-Graae, Nordstrom, & McNeil, 2001). También parece que en el diagnóstico dual influye la historia familiar en cuanto al consumo de sustancias. Este mismo estudio, mostró que las personas esquizofrénicas que han tenido casos de TUS en su familia presentarán una mayor probabilidad de manifestar patología dual (Cantor-Graae et al., 2001).

3.3 Circuitos neuronales implicados en esquizofrenia y adicción

La hipótesis de que la adicción es también un trastorno primario, como lo es la esquizofrenia en el diagnóstico dual, ha contribuido a la realización de estudios para comprobar los circuitos neuronales implicados en ambos trastornos.

Uno de los hechos más relevantes es la evidencia de la **hiperactividad dopaminérgica en el NAcc**, relacionada tanto con los síntomas positivos de la esquizofrenia como con la conducta adictiva. Esta activación del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico también se observa en procesos de estrés, pudiendo ser este el nexo entre los dos trastornos. En este sentido, se ha encontrado que el estrés es capaz de exacerbar los síntomas positivos mientras que en la adicción estimula el *craving* e induce a la recaída (Stewart, 2000). Por otro lado, la proteína G inhibitoria también parece estar alterada en ambos trastornos. Una de las muchas alteraciones bioquímicas inducidas por el consumo de drogas es la disminución de la proteína G inhibitoria en el NAcc. Dicha alteración también ha sido encontrada en muestras cerebrales postmortem de

pacientes esquizofrénicos (Sumiyoshi, Stockmeier, Overholser, Thompson, & Meltzer, 1995; Yang, Kitamura, Nishino, Shirakawa, & Nakai, 1998).

Aunque esta hiperactividad dopaminérgica es compartida por ambos trastornos, se debe considerar que la neuropatología entraña un amplio entramado de redes neurales con los inputs de la CPf y el Hp. Así, posibles alteraciones en los inputs de la CPf y el Hp pueden producir cambios que afecten a los marcadores de la señal de DA en el St ventral. Por tanto, los cambios en la **densidad de los D2R en el St** también podrían evidenciar un circuito común para ambos trastornos (De Vries, Schoffmeier, Binnekade, & Vanderschuren, 1999; Self, Barnhart, Lehman, & Nestler, 1996). En este sentido, se ha mostrado una mayor densidad de los D2R en pacientes esquizofrénicos que no tienen una historia de consumo de sustancias ni tratamientos farmacológicos (P Seeman, Niznik, Guan, Booth, & Ulpian, 1989). Por otro lado, los agonistas de los D2R parecen aumentar la conducta de búsqueda de droga, aunque los agonistas de los D1R lo previenen (Self et al., 1996). Por tanto un mayor ratio D2/D1 o una disrupción entre ellos, podría indicar una mayor vulnerabilidad a la adicción de drogas.

Las alteraciones asociadas a las **lesiones hipocampales** que subyacen a la esquizofrenia y que sensibilizan la respuesta de DA en el NAcc, también imitan la sensibilización del sistema que acontece en el consumo de sustancias y que incrementa la vulnerabilidad a la adicción (Self, 1998; White & Kalivas, 1998).

Por último, la pérdida de inhibición latente (capacidad de ignorar los estímulos irrelevantes para la tarea en cuestión) en la esquizofrenia parece estar asociada a las alteraciones que se presentan en el Hp de estos pacientes. Estudios realizados con animales, muestran una interrupción en el efecto de la inhibición latente provocada por las lesiones producidas en el Hp y la cual es restaurada con el tratamiento con haloperidol (Schmajuk, Christiansen, & Cox, 2000). Estas alteraciones en la inhibición latente también han sido manifestadas en los procesos de aprendizaje relacionados con los refuerzos. En este sentido, los resultados revelan una alta resistencia a la extinción y una reducción en la evitación de los estímulos asociados en el condicionamiento de miedo en los animales que fueron sometidos a lesiones en el Hp (Clark, Feldon, & Rawlins, 1992).

Estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia que tienen las alteraciones en la actividad dopaminérgica y en el Hp en relación con la esquizofrenia y cómo estas podrían aumentar la eficacia de los reforzadores, ya sean naturales o con drogas de abuso.

3.4 Modelos animales en patología dual

En la actualidad no hay ningún modelo específico que permita estudiar la patología dual en los animales de laboratorio. Más bien, la estrategia que se ha seguido hasta ahora, ha sido utilizar los modelos animales existentes, de este modo se pueden crear **fenotipos esquizofrénicos** para después medir el consumo de sustancias. A pesar de tener disponibles un amplio número de modelos para cada trastorno por individual, como se ha expuesto anteriormente, el estudio de la patología dual en animales no está muy extendido. Sin embargo, debido a la alta comorbilidad que se ha encontrado entre la esquizofrenia y el TUS, sería interesante dar respuesta a la pregunta de si la utilización de modelos para la esquizofrenia puede aportar resultados concluyentes en el estudio del TUS, generando modelos de patología dual.

En primer lugar, los **modelos genéticos** para la patología dual en la esquizofrenia se han centrado en la selección de aquellos genes que se han visto alterados en este trastorno mental, utilizando los animales transgénicos desarrollados para ello y de este modo han estudiado las implicaciones en el abuso de sustancias. Un estudio que utilizó ratones de la línea *disc1 L1000P*, la cual está asociada a la esquizofrenia por los déficits conductuales a los que da lugar, mostró un aumento de la locomoción inducida por AMP en los animales con el fenotipo esquizofrénico (Lipina et al., 2010). En el caso del *dtmbp1* también se observaron estos aumentos en la locomoción por AMP, pero únicamente al ser realizado con inyecciones diarias durante 5 días (Bhardwaj et al., 2009). Por último, en ratones mutantes para el gen *nrg1* se muestra que los machos presentan mayor sensibilización a los efectos agudos del tetrahidrocannabinol (Boucher et al., 2007), sin embargo estos resultados no pueden extrapolarse a las hembras con dicha mutación (Long, Chesworth, Arnold, & Karl, 2010).

En cuanto a los **modelos farmacológicos**, como se describió anteriormente, se utilizan drogas o fármacos que actúan en las vías dopaminérgicas o en las glutamatergias para generar la sintomatología esquizofrénica. Pese a que la administración AMP parece imitar los síntomas positivos de la esquizofrenia, actualmente se prefiere la utilización de PCP o MK-801 por simular la complejidad de los síntomas esquizofrénicos mejor que la AMP, ya que no solo desarrolla síntomas positivos y negativos, además parece que produce alteraciones cognitivas que están presentes en los pacientes esquizofrénicos (Seillier & Giuffrida, 2009). Sin embargo, este tipo de modelos no están muy extendidos en el estudio de la patología dual de la esquizofrenia, principalmente porque los fármacos o drogas inductores de los síntomas esquizofrénicos son potenciales drogas de abuso.

Aun así, diversos estudios realizados con un tratamiento sub-crónico de PCP han encontrado acentuada la actividad locomotora inducida por un desafío de AMP (Balla, Sershen, Serra, Koneru, & Javitt, 2003; J David Jentsch, Taylor, Ph, Roth, & Ph, 1996). Por otro lado, el tratamiento sub-crónico de MK-801 hace que los animales presenten una mayor facilitación en la adquisición y escalada del consumo de COC (Allen et al., 2015).

Los modelos animales del neurodesarrollo más utilizados para medir los efectos reforzantes de las drogas han sido: la lesión neonatal en HpV, los modelos de MIA mediante LPS y Poli I:C y la administración de MAM.

Los modelos de **lesión neonatal en el HpV** (NVHL) en patología dual se han centrado principalmente en el estudio de los psicoestimulantes aunque un reciente estudio también ha estudiado los efectos de este modelo en el consumo de alcohol. En un primer estudio, se encontró que las ratas que habían sido lesionadas en el HpV emitieron más respuestas en las fases de adquisición y mantenimiento en la autoadministración de COC, además tardaron más tiempo en alcanzar el criterio de extinción, en comparación con las ratas *sham* (aquellas en las que la lesión fue simulada) (R Andrew Chambers & Self, 2002). En la misma línea, el estudio realizado por Karlsson, Kircher, Shaham, & O'Donnell, 2013, muestra una mayor dificultad de las ratas NVHL para extinguir la conducta de autoadministración pero además, en este caso, presentaron un aumento de respuesta en la recaída asociada a las claves en comparación con el grupo control. Otro estudio realizado con otro psicoestimulante, metanfetamina, muestra que las ratas con este tipo de lesiones presentan una adquisición en la conducta de autoadministración más rápida que las ratas *sham*, también emitieron más presiones de palanca y obtuvieron un punto de ruptura más alto que los controles en el programa de razón progresiva. Esto parece indicar que la droga, los psicoestimulantes en este caso, tiene un alto valor motivacional para estos animales que simulan un fenotipo esquizofrénico (Brady, McCallum, Glick, & O'Donnell, 2008). Por último, un estudio realizado con alcohol muestra que los animales NVHL consumen más alcohol que las *sham*, además demuestran que el grado de inhibición latente en estos animales parece ser un predictor del consumo (Khokhar & Todd, 2017).

Aunque el modelo NVHL se ha propuesto como un buen modelo para modelar la patofisiología del trastorno esquizofrénico, no parece dar cuenta de la etiología del mismo, ya que ningún paciente con esquizofrenia presenta ningún tipo de lesión en el HpV (Ng, McGirr, Wong, & Roder, 2013). Por el contrario, los modelos de activación inmune tienen una validez mayor en lo que a la etiología de la esquizofrenia se

refiere, por este motivo se postulan como los más idóneos para simular la sintomatología esquizofrénica en animales.

Estudios realizados con la **administración prenatal de LPS** muestran que las crías cuyas madres sufrieron dicha activación inmune manifiestan una mayor preferencia por el consumo de alcohol en comparación con las controles (X. Liu et al., 2004). Otro estudio realizado con LPS mostró en estas crías aumentos en la hiperlocomoción inducida con AMP, característico de la hiperdopaminergia relacionada con la esquizofrenia, sin embargo no fue capaz de confirmar la sensibilización conductual que es característica del proceso adictivo (Zager, Mennecier, & Palermo-Neto, 2012). Por último, los **estudios realizados con Poli I:C** revelan diferencias en la preferencia a la AMP durante la recaída en el paradigma de CPP, aunque no se encontró ninguna diferencia en la fase de adquisición entre los tratamientos (Richtand et al., 2012). Sin embargo, otro estudio más reciente, realizado con el mismo agente infeccioso, sí encontró diferencias en la adquisición del CPP inducido por AMP, además, este grupo de animales tratados con Poli I:C mostró mayor sensibilización a la AMP y aumentos en la sensibilidad cruzada en COC (Borcoi et al., 2015).

En cuanto a la **administración de MAM** los estudios parecen mostrar ciertas contradicciones. En primer lugar, se han mostrado diferencias en la locomoción inducida por AMP en las crías de las madres que fueron tratadas con MAM en el GD 17, sin embargo estas diferencias solo se presentan en la etapa adulta y no en la prepuberal (Moore et al., 2006). Además, este modelo no parece ser sensible a todos los psicoestimulantes, ya que otro estudio no encontró diferencias entre los tratamientos en la locomoción en respuesta a la COC, incluso probando con varias dosis (5, 10 y 20 mg/kg). En este mismo estudio se realizaron distintos experimentos para estudiar el efecto reforzante de la COC en las ratas tratadas con MAM. El primero de ellos consistió en la autoadministración de COC con una dosis muy baja (0.1 mg/kg por infusión), mientras que en el siguiente experimento se sometió a los animales a un protocolo de autoadministración de COC con una dosis más elevada (0.25 mg/kg por infusión) seguido de distintas fases: curva dosis-respuesta, razón progresiva, extinción y recaída inducida por la droga. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos en ninguno de los experimentos ni sus fases (Robert E Featherstone et al., 2009).

Por último, los modelos relacionados con **experiencias traumáticas en etapas tempranas del desarrollo** también han sido propuestos para el estudio de la patología dual. Como se ha descrito anteriormente, tanto la **deprivación materna** (MD) como el **aislamiento neonatal** (NI) producen la misma sintomatología esquizofré-

nica que ha sido encontrada en otros modelos desarrollados para este trastorno. De este modo, se ha comprobado que aumenta el comportamiento impulsivo, muestran poca resistencia ante situaciones estresantes y alteraciones en el PPI (Ellenbroek, van den Kroonenberg, & Cools, 1998; Marco, Adriani, Llorente, Laviola, & Viveros, 2009).

Distintos estudios muestran que la MD y el NI facilitan la autoadministración de alcohol, estimulantes y opiáceos (Neisewander, Peartree, & Pentkowski, 2012; Pautassi, Nizhnikov, Fabio, & Spear, 2012; Tesone-Coelho et al., 2015). Otro estudio encontró alterado el consumo de alcohol en los distintos sexos tras MD, pero únicamente después de una exposición estresante (Peñasco, Mela, López-moreno, Viveros, & Marco, 2015). También se han encontrado diferencias sexuales en estos estudios. Mientras que los machos parecen ser más sensibles al consumo de alcohol tras la MD o NI (Gustafsson, Ploj, & Nylander, 2005; Roman, Hyytia, & Nylander, 2003; Roman, Ploj, & Nylander, 2004), en las hembras se ha mostrado una mayor variabilidad en el consumo de estimulantes en estos modelos (Kosten, Sanchez, Zhang, & Kehoe, 2004; Kosten, Zhang, & Kehoe, 2006; Moffett et al., 2006).

Planteamiento de la investigación



La esquizofrenia debido a su temprana aparición, cronicidad y severidad de los síntomas, es uno de los trastornos mentales más devastadores socialmente. Por otro lado, existen abundantes datos que señalan que en pacientes con algún trastorno del espectro esquizofrénico se da un consumo de sustancias psicoactivas mayor que en la población no esquizofrénica, lo que en muchas ocasiones empeora el curso del trastorno y dificulta la adhesión al tratamiento, ya sea de tipo farmacológico o psicológico.

En esta comorbilidad psiquiátrica entre la esquizofrenia y el abuso de sustancias se han encontrado diferencias de género, mostrando un mayor consumo de drogas entre los hombres que sufren esquizofrenia en comparación con las mujeres que padecen este trastorno.

Estos datos sin embargo proceden de estudios epidemiológicos en seres humanos en los que es imposible determinar de una manera clara si la presencia del trastorno esquizofrénico es la causa de que se dé un mayor consumo de drogas o si por el contrario, existe una vulnerabilidad común a ambos trastornos. Por otro lado, tampoco nos permiten los datos en humanos discernir claramente si el mayor consumo de drogas en pacientes esquizofrénicos responde a un intento de automedicación o si por el contrario se da como consecuencia de las alteraciones en los sistemas neuroquímicos del refuerzo que ocurren en la esquizofrenia.

Dado que en pacientes esquizofrénicos hay alteraciones en la neurotransmisión dopaminérgica y glutamatérgica en áreas clave del sistema mesocorticolímbico y que algunas de estas alteraciones se han podido observar también en diferentes modelos de activación inmune prenatal (que son los que generan un cuadro más parecido a la patología esquizofrénica en humanos) se puede sugerir desde un punto de vista teórico que tales cambios neuroquímicos tendrían como consecuencia un aumento del valor reforzante de drogas de abuso como la COC

Por tanto, la principal hipótesis de esta tesis es que la activación inmune a nivel prenatal en ratas, que genera un conjunto de alteraciones psicobiológicas compatibles con la patología esquizofrénica, también tendrá como consecuencia un aumento en el consumo y valor reforzante de la COC. Para poder validar esta hipótesis es necesario contar con un modelo animal adecuado que permita estudiar la comorbilidad psiquiátrica entre la esquizofrenia y la adicción. Al estudio de las variables críticas para la inducción de este modelo hemos dedicado gran parte del trabajo experimental de la presente tesis doctoral.

Los objetivos específicos que nos hemos propuesto para poder validar nuestra hipótesis han sido los siguientes:

- Capítulo 1

1. Determinar si en un modelo de activación inmune prenatal mediante la inyección de la endotoxina bacteriana LPS durante la gestación (propuesto por Borrel et al. 2002) se dan déficits de inhibición por prepulso de la respuesta de sobresalto como índice del establecimiento de la sintomatología que sería compatible con la sintomatología esquizofrénica.

2. Observar, utilizando la metodología de autoadministración intravenosa de drogas, si hay diferencias en el patrón de consumo de COC entre los animales con fenotipo “esquizofrénico”, provocado por la MIA, y sujetos controles.

3. Estudiar si las posibles diferencias que pudiéramos encontrar eran específicas de la COC o si se pudieran tratar por otro lado de una alteración más general en el valor de los reforzadores. Para ello realizamos un experimento similar al anterior con comida en lugar de COC como reforzador.

- Capítulo 2

1. Ante la falta de resultados consistentes en el capítulo anterior, probar nuevos parámetros de activación inmune aumentando la dosis de LPS y realizando inyecciones diarias en lugar de alternas.

2. Comprobar si estas manipulaciones tenían como consecuencia la aparición de los déficits de inhibición por prepulso que permiten confirmar el fenotipo esquizofrénico y que se esperan en función de los datos publicados por otros grupos.

3. Estudiar mediante citometría de flujo la aparición de alteraciones en células del sistema inmunológico que se han documentado en la esquizofrenia y que nos pudieran servir como una validación adicional del modelo. Estudiar posibles biomarcadores inmunológicos de la esquizofrenia no conocidos hasta la fecha, usando el modelo de activación inmune prenatal.

4. Comparar el consumo y las capacidades reforzantes de la COC entre los animales controles y aquellos con activación inmunológica prenatal.

- Capítulo 3

1. Probar otro modelo de activación inmunológica prenatal y realizar un estudio de diferentes dimensiones sintomáticas de la esquizofrenia (síntomas positivos –in-

hibición por prepulso-, negativos –déficits en la interacción social- y cognitivos –deterioro en la memoria de trabajo medida en el laberinto en T), para ello utilizamos el modelo animal de activación inmune prenatal descrito por Fortier et al., 2007.

2. Realizar una valoración de la respuesta inmune materna en respuesta al agente infeccioso mediante la medición de la citoquina proinflamatoria $TNF\alpha$.

3. Identificar posibles características impulsivas en los animales con fenotipo esquizofrénico dado que la impulsividad es un rasgo endofenotípico de predisposición a la adicción y que también parece estar aumentado en la población esquizofrénica.

4. Evaluar el consumo y los efectos reforzantes de la COC en este modelo.

5. Valorar las posibles diferencias sexuales en relación a la aparición de síntomas de tipo esquizofrénico a consecuencia de la activación inmunológica prenatal y en el consumo de psicoestimulantes inducido por dicha activación.

Materiales y Métodos



Ethics Statement

In all cases we tried to minimize animal suffering and to reduce the number of animals employed in our experiments. All procedures performed on experimental animals follow to the regulations approved by the Bioethics Committee of UNED and the European Union guidelines on Laboratory Animal Care (Directive 2010/63/EU).

Chapter I. Rattus Norvegicus Wistar

I. Animals

The experiments described here were performed on the 8–10 week-old offspring of Wistar rats obtained from Charles River (France). All animals were kept in a temperature and humidity controlled environment (23 °C/50–60%), with artificial lighting (12 h/12 h light/dark cycle, lights on at 8 am), and ad libitum access to food (commercial diet for rodents A04: Panlab, Barcelona, Spain) and tap water. The animals were housed in transparent plexiglas cages (48.3 cm length x 26.7 cm width x 20.3 cm height).

2. Experimental design

Female rats were mated with males (2 females per male) one week after arrival to the animal facility. Vaginal smears were taken daily from breeder females and pregnancy was determined by the presence of sperm in the vaginal smear (=day 0 of pregnancy). LPS (Lipopolysaccharide from *Escherichia coli*, Sigma 129K 4089) was subcutaneously (s.c.) administered to the pregnant rats at a dose of 1 mg/kg on alternate days during pregnancy (Borrell, Vela, Arevalo-Martin, Molina-Holgado, & Guaza, 2002). LPS was dissolved in saline solution (0.9% Sodium chloride (NaCl) in water) and administered in a volume of 1.5 ml/kg. The control group consisted on pregnant rats submitted to the same treatment schedule with saline instead of LPS.

The litters were culled so that there were no more than 12 pups per dam. Only the male offspring was used in the experiment described in this chapter. Litters were left undisturbed until postnatal day (PD) 21 when they were weaned in groups of 2–3. All rats in a given cage were from the same litter and therefore the same treatment.

- **Study 1:**

We used the offspring of 6 dams (SAL n= 2/LPS n= 4). On PD 90 rats (SAL n= 8/LPS n= 21) were subjected to the PPI test and on PD 110 they underwent either food (SAL n= 4/LPS n= 7), or COC self-administration (SAL n= 4/LPS n= 9). All behavioural tests were carried out during the light cycle, between 9 am and 5 pm.

- **Study 2:**

This study was aimed at increasing the sample size of Study 1 which was a pilot experiment. All the behavioural studies were carried out in the same way as in the study 1. Data are presented separately however due to the differences in the results obtained between both experiments.

Female pregnant rats (SAL n= 4/LPS n= 3) were exposed to the same protocol of MIA as in Study1. PPI was performed in the male offspring (SAL n= 24/LPS n= 19) on PD 90 and the COC self-administration experiment began on PD 110 (SAL n= 6/LPS n= 6).

- **Study 3:**

The main goal of this study was to test whether the age at which PPI testing took place might explain the inconsistent results obtained in the two previous studies. For this reason, we just focused on obtaining measurements of PPI. To attain such goal we submitted our rats to the PPI test at the same age as in Study 1 and 2 (PD 90) but we also took other measure 30 days later (PD 120).

In this study we used 8 female pregnant rats (SAL n= 5/LPS n= 3) and their respective offspring (SAL n= 25/LPS n= 16).

3. Model validation

3.1 Weight

Maternal body weight was measured before each injection.

3.2 Temperature

Ear temperature was measured twice on each injection day: right before the injection and one hour later.

4. Prepulse inhibition of the acoustic startle response

4.1 Introduction to phenomenon

Pronounced sensorimotor gating abnormalities have been reported in schizophrenic patients (Braff et al., 1978; Kumari, Soni, & Sharma, 1999). A well-established sensorimotor gating paradigm is the prepulse inhibition (PPI) of the startle response. PPI refers to the reduction in startle reactivity toward an intense pulse stimulus when it is shortly preceded by a weak prepulse stimulus (Hoffman & Ison, 1980). It is thought that the prepulse response activates an inhibitory process that attenuates or “gates” the startle response. Because identical stimulus parameters can be used for animal and human studies, it is considered that animal models of PPI disruption represent a promising way to study the neural mechanisms underlying sensorimotor gating dysfunction (Swerdlow, Braff, Taaid, & Geyer, 1994; Swerdlow & Geyer, 1998) and as a screening test for potential antipsychotics (Depoortere, Perrault, & Sanger, 1997; Swerdlow et al., 1994). In fact, antipsychotics normalize PPI deficits in schizophrenic patients (Kumari et al., 1999; Weike, Bauer, & Hamm, 2000).

The neural circuit that mediates auditory PPI includes three midbrain structures: the inferior colliculus, deeper layers of the superior colliculus and the intermediate layers of the superior colliculus, and the pedunculopontine tegmental nucleus. Thus, top-down regulations via descending axonal projections from forebrain structures must be mediating auditory PPI. It has been reported that the structure above described receive direct axonal projections from the auditory cortex, amygdala, and lateral globus pallidus (Li, Du, Li, Wu, & Wu, 2009).

4.2 PPI procedure

PPI of the acoustic startle was measured in a non-restrictive Plexiglas cage (28 × 15 × 17 cm) that encloses the sensor's platform (Cibertec, Madrid). If the animal moves up or down, a transient force is developed on the platform and measured at its peak, being equivalent in amplitude to the startle response (Romero et al., 2007).

Rats were placed in the startle chamber and each test session started with a 5-min acclimation period consisting of background broad-band noise at 70 decibels (dB) (which continued throughout the session), 52 startle trials were followed with three conditions: (1) a 115-dB, 40-ms noise burst presented alone; (2) this same burst preceded by a 20-ms duration prepulse either 30 or 120 ms before either 8 or 16 dB above background noise, yielding four types of prepulse trials (30_8, 30_16, 120_8, 120_16); and (3) no-stimulus trials.

Five pulse-alone trials were presented at the beginning and at the end of each session to stabilize startle response and to calculate the habituation of such response, but were not used for the calculation of PPI. In between these blocks there were 42 mixed trials presented in a pseudorandom order: 12 pulse alone trials; 24 prepulse trials (six of each type); and six no-stimulus trials. The duration of the sessions was of around 15 min.

Prepulse inhibition is expressed as % PPI and it was calculated using the following formula: $1 - [\text{startle amplitude on prepulse+pulse trial} / \text{mean startle amplitude on pulse alone trials}] \times 100$.

5. Cocaine self-administration

5.1 Introduction to the intravenous self-administration methodology

The self-administration methodology as it is currently known was implemented by James Weeks in 1962, although the first experimental studies suggesting drugs as natural enhancers in animals date back to the previous decade, from Nichols et al in 1956. Weeks was the first author to permanently implant catheters into the jugular vein of laboratory rats to which he connected an operant conditioning box and an infusion pump that automatically dispensed morphine injections, verifying that the animals were injecting this drug (Weeks, 1962). With this technique, the problems associated with the oral route of administration were overcome: neither the taste of the drug solutions did interfere nor the time lapsed in between the ingestion and the subjective effects leading to the reinforcement process. This procedure was applied in other laboratories, to other species of animals and using different drugs, such as AMP and COC, obtaining similar results (Pickens & Thompson, 1968; Thompson & Schuster, 1964). In this way, the great influence that drugs exert on behaviour could be experimentally studied.

With regard to the duration of the self-administration sessions, the criterion depends on the researcher. In our experiments we scheduled two hour sessions since most of the studies conducted with COC self-administration use this length.

In general, the behaviour of the animal during the first sessions is quite disorganized and when the sessions progress, the animals begin to regulate their drug intake and the number of injections that they self-administer stabilizes (Roberts, Gabriele, & Zimmer, 2013). Thus, when animals initiate a session, several injections are self-administered in the first few minutes but then they are progressively spaced over the session. In the case of COC, the animals self-administer the drug with very similar

time intervals. This regularity could be due to the metabolism of the drug, so that the subsequent lever press will not occur until the concentration of COC in blood reaches a minimum level (Carelli & Deadwyler, 1996; Pickens & Thompson, 1968).

The dose seems to be the most important variable when it comes to regulating drug self-administration. The lower doses tend to increase the number of self-administered injections and the high doses tend to decrease them. When the animals have been subjected to several sessions, usually after each injection, there is a time interval in which the animal does not self-administer more drugs and this time interval is directly related to the dose of the drug being self-administered. The higher the dose, the longer the pause and as a result, the animal self-administers fewer injections during the session. It has been suggested that the post-reinforcement pause may be due to a generalized behavioural disturbance because the animal stops responding for a while. On the other hand, it is known that aversive drug effects may also limit the rate of self-administration, for this reason it is quite important to perform dose-finding studies prior to the real self-administration experiments (Yokel & Pickens, 1974).

In our COC self-administration we used 12 operant conditioning boxes (Coulbourn Instruments; USA). In each box (**Figure 10**) two levers were placed on both sides of one of the walls 14 cm apart. The levers were designed to record every response that occurred when at least 3 g of force was applied to them. The infusion of COC (cocaine hydrochloride, Alcaliber SA, Madrid, Spain) and its vehicle (saline serum 0.9%) was performed by an automatic infusion pump (Harvard Instruments, USA) located outside the operant conditioning box. The pump was connected via a polyvinyl tube (Tygon, USA) to a single-channel rotary pivot (Instech Laboratories, Plymouth Meeting, PA, USA) that was connected to another tubing that ran inside a metal spring (Alice King Chatman, USA). During the self-administration sessions, this spring (A) was attached to the connector previously placed in the skull of the animal (C) and the tube running through it was inserted into the catheter (B) implanted in the jugular vein. Data recording and control of boxes and pump was performed using an IBM computer compatible with the interface and the Med-PC program (Med Associates; USA).



Figure 10.

Conditioning Skinner box

5.2 Cocaine self-administration procedure

Cocaine self-administration experiments were performed on rats that had undergone the behavioural testing described above. Some animals were lost during the course of the experiments due to catheter failure, infection or loss of the head implant.

The surgical procedure was initiated with the induction of anaesthesia by an i.p injection of ketamine (40 mg/kg; Imalgene, Merial) and diazepam (10 mg/kg; Valium, Roche) to surgically implant permanent catheters in the right jugular vein. First, a small cut was made in the skin of the animal's neck to reach the vascular package and isolate the jugular vein. Subsequently, a small incision was made in the vein and the catheter was inserted, which was fixed to the vein itself and to the pectoral and maxillofacial muscles by sutures. Once attached, the catheter was driven subcutaneously through the animal's back at the level of the mid-scapular area, making it impossible for it to reach or damage it. Finally, the area was sutured if the position of the catheter was found to be correct and that there was no loss or blockage after infusing a bolus of saline.

In the same intervention four stainless steel screws were implanted in the skull and secured with dental cement. A plastic central screw was placed in the middle of the area delimited by the four stainless steel screws. The metallic spring located in the conditioning boxes was attached to this plastic screw so that the animal was secured during the self-administration sessions.

Rats were kept at least 7 days in recovery before the start of the experiments and were given a saline solution with Heparin (100 IU/ml, Chiesi) and Gentamycin (1 mg/ml, Schering -Plough), in order to avoid occlusion of the catheter and possible infections.

During the sessions, the injection pump delivered COC for 4 s whenever the active lever was pressed – i.e. fixed-ratio 1 schedule of reinforcement– (0.75 mg/kg i.v.), followed by a 3 s timeout period and activation of a visual cue placed over the active lever. Inactive lever presses were counted but had no programmed consequences. The infusion volume was 100 μ l on average and was slightly modified according to the weight of the rat to adjust the dose. Animals were allowed to self-administer COC in daily 2 h sessions performed 7 days a week during 28 days. We consider the first 7 days as the acquisition phase and the remaining 21 days as a maintenance phase.

6. Food self-administration

These experiments were performed on 4 SAL and 7 LPS rats in a different set of six operant chambers (Med. Associates, Vermont, USA). The acquisition phase comprised 7 daily 30 min sessions, where the animals learned to press the active lever for a food pellet (TestDiet, Mlab rodent tablet 45 mg, Cambridge, UK) fixed ratio 1 schedule of reinforcement. After this FR1 phase, the response requirement was set to 5 (FR5) for 6 additional days.

Following the final day acquisition phase, rats were subjected to 6 days of progressive ratio schedule of reinforcement. The response requirement for each subsequent reinforcer was determined by the equation used by Richardson and Roberts (1996): ratio 5 $[5 \times e (R \times 0.2)] - 5$, where e is the mathematical constant and R is equal to the reinforcer number. Under this schedule the response requirement for food delivery was increased using the following progression: 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, 268, 328, 402, 492, 603, 737, 901, 1102, 1347, 1646, 2012 (Richardson and Roberts, 1996). The progression continued until the tested rat failed to complete the ratio requirements within a 30 min period. The breaking point was defined as the number of rewards self-administered prior to failure to meet the ratio requirements.

After 3 stabilization days (FR1), rats underwent 7 days extinction sessions during which active presses no longer produced food pellets. The pellet dispenser was activated by lever presses, but it was empty.

7. Data Analysis

All data were analysed using the IBM SPSS statistical software package (version 24 for Windows). Outliers were identified by SPSS using the interquartile range criterion (statistical dispersion measure, difference between upper and lower quartiles) and a p value of ≤ 0.05 was considered to represent a statistically significant difference. Square roots transformations were applied when appropriate to correct the skewness in the distribution of the data and the lack of homogeneity of variances.

The increment in body weight was calculated in each injection day taking as a reference of the weight of the previous day. Temperature increments were calculated as the difference between the basal temperature and that obtained one hour after each injection. Body weight and temperature increments were analysed by analysis of variance (ANOVA) (fixed between-group factor, Treatment [SAL or LPS]; fixed within subject repeated measures factors, injection).

PPI was analysed using Student's t -test for unrelated sample, using the percentage of PPI for each type of trial as a dependent variable and the Treatment as independent variable.

Cocaine self-administration and food self-administration were analysed with ANOVA (fixed between-group factor, Treatment [SAL or LPS]; fixed within subject repeated measures factors, either COC or food daily lever presses during self-administration sessions). Effect sizes are reported when appropriate.

In the case of the Student's t tests, the effect size is estimated using Cohen's d (the range of values being 0.2 = small effect, 0.5 = moderate effect, 0.8 = large effect: (Cohen, 1988)). The partial η^2 was used as an index of the effect size in ANOVAs (the range of values being 0.02 = small effect, 0.13 = moderate effect, 0.26 = large effect: (Miles, J., Shevlin, 2001)).

Chapter II. Rattus Norvegicus Lewis

I. Animals

This study was carried out on the offspring of 8–10 week-old Lewis rats obtained from Charles River (France). All animals were kept at the same conditions above explained.

2. Experimental design

14 pregnant rats were mated as stated in Chapter 1.

In this case, LPS (Lipopolysaccharide from *Escherichia coli*, Sigma 129K 4089) was subcutaneously (s.c.) administered to pregnant rats (LPS n= 7) at a dose of 2 mg/kg (1.5 ml/kg) daily during pregnancy. Control rats (SAL n= 7) were injected with saline (1.5 ml/kg).

The litters (SAL n= 7 /LPS n= 7) were culled if necessary (according to the same criteria used in Chapter 1) and only the male offspring was used for this study. Rats were subjected to PPI test on PD 120 and on PD 130 and divided in two groups: one of them was used for COC self-administration experiments and the other was sacrificed for flow cytometry. All behavioural tests were carried out during the light cycle, between 9 am and 5 pm.

3. Model validation

3.1 Weight

Maternal body weight was measured daily before each injection.

4. Inhibition prepulse

We used the same startle chamber and PPI protocol as described in Chapter 1. In this case, the number of animal was: SAL= 37 and LPS= 22.

5. Cocaine self-administration

Rats (SAL n= 9/LPS n= 16) underwent surgery and recovery as described in Chapter 1, however, in this case animals were not food-restricted.

The Coulbourn boxes were used in this experiment. In this study we changed the dose of COC (0.5 mg/kg) and the protocol. Animals were allowed to self-administer

COC in 2 h daily sessions 7 days a week during approximately 7 weeks. The protocol was divided into several phases: 23 days of acquisition at 0.5 mg/kg dose with fixed-ratio 1 schedule of reinforcement, a dose–response curve (one day per each dose of 1.5/1/0.25/0.125 mg/kg), three stabilization sessions at the 0.5 mg/kg dose, 6 days of progressive ratio schedule, other three stabilization session, 6 extinction sessions (where the drug was substituted with saline and the visual cue was not present) and cue-induced reinstatement (where the cue was activated but the COC was not available).

6. Flow Cytometry

6.1 Introduction

Flow cytometry is a technique that allows the analysis of different parameters of individual cells within a heterogeneous cell population in suspension.

Basically a flow cytometer operates by passing the suspended particles in alignment and one by one in front of a laser and capturing the light by means of different detectors. To do this, cells are first aligned in the fluidic system, which is composed of a central channel and a cover. The sample passes through the channel while between the channel and the cover a fluid that circulates at a higher speed is passed causing a drag effect on the fluid of the central channel. This favours that the particles align in a row a phenomenon called "hydrodynamic approach" (Rahman, 2006).

Each particle then passes through one or more light beams (usually lasers). Information on cell properties can be obtained from the scattered light and, in the case of particles labelled by fluorochromes, with emission fluorescence.

Frontally dispersed light (up to 20 ° dispersion from the laser axis) is recorded by a lens in what is known as Forward Scatter Chanel (FSC) or front scatter channel. The intensity of the light recorded by the FSC maintains an inverse correlation with the size of the recorded particle, this allows to differentiate the cells from other particles or to classify them by size. The light scattered sideways (approximately 90 ° dispersion from the laser axis) is recorded by the Side Scatter Channel (SSC) or lateral scattering channel, and reports on the granular content of each particle giving an idea of its structural complexity. Combined information from FSC and SSC is used to differentiate cellular subtypes within a heterogeneous population (**Figure 11**).

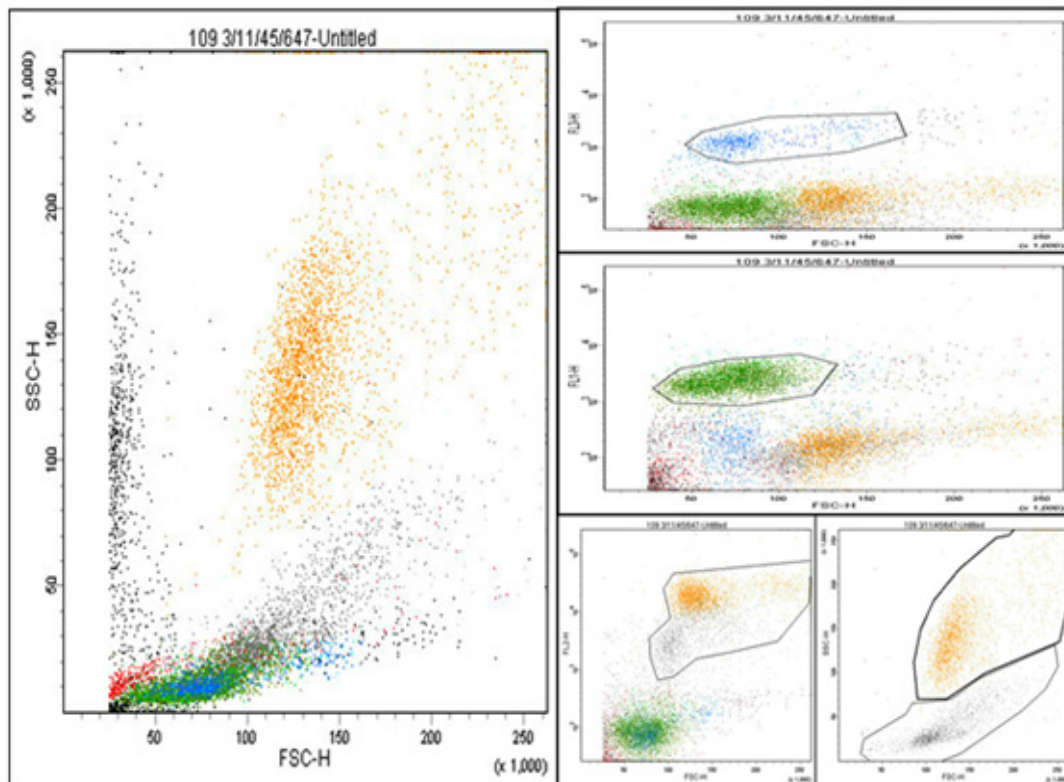


Figure 11.

A) Representative graphs of leukocytes separated by complexity and size. B) Representative graph of the B lymphocytes separated by the intensity of the fluorescence corresponding to labelled antibody. C) Representative graph of the T lymphocytes separated by the intensity of the fluorescence corresponding to labelled antibody. D1) Representative graph of the granulocytes (orange) and monocytes (grey) separated by the intensity of the fluorescence corresponding to each labelled antibody. D2) Representative graph of the granulocytes (orange) and monocytes (grey) restricted the positive cells in graph 11.D1 and separated by their physical properties of size and complexity.

For the detection of light from fluorochromes, flow cytometers use different fluorescence channels. The specificity of the detection is controlled by optical filters, which block the light of a certain wavelength while letting the rest pass. When these filters are arranged at an angle of 45° with respect to the axis of the light beam, they are called dichroic mirrors and have the capacity to reflect the blocked light at a 90° angle, allowing the rest to pass without causing any deviation. Thus, it is possible to detect multiple signals from a single light beam provided that the type of dichroic mirrors and their position order are properly selected.

6.2 Blood cell analysis and cell count

On GD 130 animals (SAL n= 12/LPS n= 9) were decapitated and the peripheral blood was removed and stored in EDTA tubes. The blood was centrifuged at 500g for 5min at 4°C and the plasma was separated. 1.5 ml of blood was transferred to a new tube and 10 ml of 1X lysis buffer was added (Biolegend) and allowed to react with the sample for 23 min to be centrifuged again at 500g for 5 min (4°C). Three washes with PBS were performed and after the last wash the pellet was resuspended in 400 µl of complete RPMI medium (Sigma-Aldrich Co). The entire procedure is carried out at 4°C.

For the cell count, an improved Neubauer chamber was used, an instrument consisting of a slide with two slightly depressed zones (0.1 mm) with a grid marked at the bottom. In this area the sample is deposited and covered with a coverslip, leaving a known volume of the sample underneath. By counting the cells of the grids one can, extrapolate the number of cells per volume unit. The grid consists of 9 main squares of 1 mm² each. The central square is generally used for counting red blood cells or platelets, and the four corner squares, which contain larger divisions, are used to count white blood cells (Strober, 2001).

6.3 Cell labelling

In order to study the populations of monocytes, granulocytes, and T and B lymphocytes, as well as expression on the surface of D3, D5 and CB2 receptors, flow cytometry was performed on the samples obtained as described above.

To do this, a sample volume containing 1×10^6 cells was incubated with the primary antibody corresponding to each receptor (**Table 1**) for 30 min. Two washes were then performed with phosphate buffer saline (PBS) and incubated with a cocktail of antibodies labelled with different fluorochromes (**Table 1**) for another 30 min. After washing with PBS, the cells were fixed with FACSlysing solution (BD Biosciences) and analysed on a BD flow cytometer FACSCalibur (Becton Dickinson) at the Center for Electron Microscopy and Cytometry of the Complutense University of Madrid.

Antigen	Target cell	Fluorophore	Synthesize	Isotype	Concentration	Commercial firm
CD3 (rat)	T Lymphocytes	FITC	Mouse	IgG	2.5µg/ml	Becton Dickinson
CD11b/c (rat)	B Lymphocytes	PE	Mouse	IgG	2.5µg/ml	Becton Dickinson
CD45RA (rat)	Monocytes and granulocytes	PE-Cy™5	Mouse	IgG	1.25µg/ml	Becton Dickinson
CB2 Receptor			Rabbit	IgG	10µg/ml	Thermo Scientific
D3 receptor			Rabbit	IgG	15µg/ml	Abcam
D5 receptor			Rabbit	IgG	15µg/ml	Abcam
IgG (rabbit)		Alexa Fluor®647	Goat	IgG	30µg/ml	Life Technologies

Tabla 1.

Antibodies used in this study

For each sample, three tubes were tested, one for evaluating D3, D5 and CB2 receptor (corresponding primary antibody: **Table 1**), and another control tube with no primary antibody to which the labelled secondary antibody (**Table 1**) could bind, but with three antibodies that identify the cell populations, in order to discard the possible extra signal due to the non-specific binding of the secondary antibody. This control is called the "second layer" since the labelled secondary antibody is added without its primer (**Figure 12**).

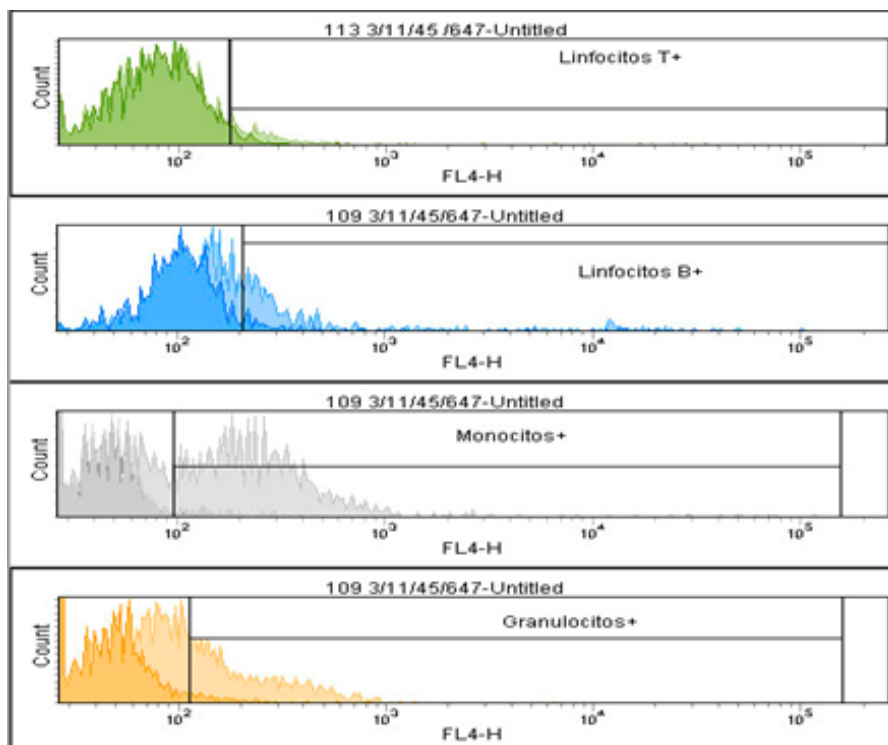


Figure 12.

Histogram of fluorescence intensity for D3 receptor. Dark colours represents the second layer and light colours the cells incubated with the primary antibody. Positive cells were gated adjusting the threshold to match the highest fluorescence of the second layer control.

7. Data Analysis

All data were analysed using the IBM SPSS statistical software package (version 24 for Windows). Outliers were identified by SPSS using the interquartile range criterion and a value of $p \leq 0.05$ was considered to represent a statistically significant difference. Square roots transformations were applied when appropriate to correct the skewness in the distribution of the data and the lack of homogeneity of variances.

The increment in body weight was calculated for each day of injection taking the weight of the previous injection day as a reference. Body weight increment was analysed by ANOVA (fixed between-group factor, Treatment [SAL or LPS]; fixed within subject repeated measures factors, day injection).

PPI test was analysed with Student's t-test for unrelated sample. Each PPI parameter was considered as a dependent variable, and taking Treatment as independent variable.

All phases in COC self-administration were analysed with ANOVA (fixed between-group factor, Treatment [SAL or LPS]; fixed within subject repeated measures factors, daily COC self-administration sessions), except cue-induced reinstatement where a Student's t-test was performed using active or inactive lever presses as dependent variable and treatment as independent variable. Effect sizes are reported when appropriate.

Flow cytometry data was analysed with Student's t-test for unrelated samples for each cell population and receptors (D3, D5 and CB2), where cell population or receptors were considered as the dependent variable and treatment as the independent variable.

In the case of the Student's t tests, the effect size is estimated using Cohen's d (the range of values being 0.2 = small effect, 0.5 = moderate effect, 0.8 = large effect: (Cohen, 1988)). The partial η^2 was used as an index of the effect size in ANOVAs (the range of values being 0.02 = small effect, 0.13 = moderate effect, 0.26 = large effect: (Miles, J., Shevlin, 2001)).

Chapter III. *Rattus Norvegicus* Sprague Dawley

I. Animals

Experiments were carried out on the 8–10 week-old offspring of Sprague–Dawley rats obtained from Charles River (France). The animals were kept in the same conditions as those described in Chapter 1. The artificial light cycle was 12 h/12 h, lights off at 8 am).

2. Experimental design

32 females were mated with 16 males as previously described. Pregnant females were handled the last three days before they received the injections.

On GD 15 and 16, pregnant rats were administered intraperitoneal injections of either saline (SAL, 1 ml/kg) or LPS (from *Escherichia coli* 0111:B4 [Sigma-Aldrich], 100 µg/ml/kg) dissolved in 0.9% NaCl (Fortier et al., 2007).

The pregnant rats were divided into two groups, the animals in the first group (SAL n= 7/LPS n= 6) continued their pregnancy to full term after the injections on GD 15 and 16 (either SAL or LPS) and the others (SAL n= 7/LPS n= 7) were sacrificed 3 and a half hours after injection on GD 15. This latter group was used to confirm the maternal immune response induced by the LPS (Fortier, Luheshi, & Boksa, 2007). The several litters (SAL: 7 litters; LPS: 6 litters) were included in each experimental group in order to minimize litter effects and 2–3 days after of birth, the pups were mixed so that each dam had half a litter of LPS treated pups and half a litter of SAL-treated pups. The litters were culled so that there were no more than 12 pups per dam and a difference between the number of females and male of no more than 2. At PD 21 they were weaned and distributed into groups of 2–3 according to sex and treatment.

3. Model validation

3.1 Weight

Body weight was measured daily.

3.2 Temperature

Female rats were accustomed to a rectal probe (RTC1-termoregulator, Cibertec, Madrid, Spain) used for thermal readings, before breeding. The rectal temperature

was measured thrice on each of the two injection days: 1 h before the injection, at the moment of the injection and 2 h later.

3.3 Cytokine ELISA determination

Pregnant rats were lightly anesthetized with isoflurane 3.5 h after LPS or saline injections on GD 15 and the peritoneal cavity was exposed via crescent incision. Maternal trunk blood was collected in heparinized tubes and centrifuged for 10 min at 4 °C (4000 ×g) to isolate the plasma. Embryos were removed and placed in a chilled Petri dish, and the fluid from 2 to 3 individual amniotic sacs, the placentas and the fetal brains were collected, as well as the maternal hippocampus. All samples were stored at -70 °C until further analysis.

Lysates were prepared from each tissue homogenized in RIPA buffer (10 µl/mg of tissue) that was supplemented with protease and phosphatase inhibitors (cOmplete™ EDTA-free protease inhibitor tablets and PhosStop™ phosphatase inhibitors: Roche). Commercial ELISA (RayBiotech) kits were used to measure the TNFα protein (RTA00) in maternal serum, amniotic fluid, placenta, fetal brain and maternal hippocampus according to the manufacturer's protocol. Each assay was run with known standards (provided with the kit) to quantify TNFα in each sample in pg per ml. The minimum detectable amount was 15 pg/ml in all the kits used, with intra-assay variations <10% and inter-assay variations <12% well. The optic density was determined by measuring absorbance at 450 nm with a Microplate Reader (DigiScan Reader V3.0 and DigiWIN software Program; ASYS Hitech GmbH, Austria).

4. Behavioural studies of schizophrenia-like symptoms

Male and female offspring were handled for three days (3 min each day) before behavioural testing. Each rat was subjected to the following tests between PD 60-72: T-maze, open field and social interaction tests (♂ SAL n= 37/♀ SAL n= 40/♂ LPS n= 30/♀ LPS n= 28). The large number of animals per group is due to the fact that we included all the animals tested, even those that were removed from the self-administration experiments and those used in preliminary COC dose-finding pilot experiments. The animals underwent the T-maze and the open field-social interaction tests in a counterbalanced order. All behavioural tests were carried out during the dark cycle, between 9 am and 7 pm.

4.1 T-maze

Working memory was tested in a T-maze made of black plastic and consisting of two arms (50×16 cm), a start alley (30×16 cm) and a central partition (50×16 cm), all with a guillotine door (Deacon & Rawlins, 2006). Testing was performed in the dark and at the beginning of the test, the rats were placed in the start box for 30 s. The guillotine door was then opened and the rat was left free to explore the maze. Once the rat chose one arm (i.e. both the forepaws and hindpaws passed the threshold of the arm) the guillotine door was lowered so that the rat was confined there for 10 s. Finally, the rat was returned to the start box for another 30 s before the second trial began. If rats spent more than 2 min to choose one arm the trial was terminated and the animal discarded. The trials were recorded using a video camera in dark mode and a trained observer scored whether the rats alternated arms between trials.

4.2 Social interaction and open field

The testing arena consisted of a black polyvinylchloride cage measuring $45 \times 45 \times 45$ cm. The rats were habituated individually in the dark for 5 min before testing and 1 h later, the social interaction test began where two rats of the same sex and treatment, raised in different cages, were placed in an arena for 10 min in the dark. Sessions were video recorded and the behaviour of the rats was scored using dedicated software (CPP-OF-V.19; Tiselius, Madrid). We counted the time spent in the central part of the arena as our dependent measure during habituation (open field test). In the social interaction test, the latency, duration and frequency of boxing, grooming, sniffing and chasing behaviours were analysed.

4.3 PPI

PPI was tested between PD 72-77 in the same animals that were assessed in the behavioural tests described above. Each session began with a 7 min acclimatization period in the presence of white noise (65 dB), which continued throughout the session. Six orienting pulse only trials were then carried out (120 dB for 30 ms), followed by 10 pulse only trials (120 dB for 30ms), five null trials with no stimulus, and five prepulse+pulse trials at each of the three different prepulse intensities and in a pseudorandom order with an average intertrial interval of 17 s (range: 9–29 s). The prepulse + pulse trials consisted of a 30 ms prepulse (at 69, 73 and 77 dB), followed by a 70 ms delay and then a startle pulse (120 dB, 30 ms). The testing session lasted 15 min (Fortier et al., 2007).

Prepulse inhibition is expressed as the % PPI and it was calculated using the following formula: $1 - [\text{startle amplitude on prepulse+pulse trial} / \text{mean startle amplitude on pulse alone trials}] \times 100$.

Because we found no significant differences using these protocols, we decided to include five different trials on a second subset of animals (following the work of (Wischhof, Irrsack, Dietz, & Koch, 2015)) having a 120 ms interstimulus interval (ISI) and a prepulse intensity of 12 dB over the background noise.

5. Impulsivity

Impulsive behaviour was measured in the delay discounting paradigm (Mar & Robbins, 2007). In this test, the animal has to choose between a small reinforcer (typically one food pellet) that is delivered right after the operant response or a larger reinforcer (four food pellets) delivered after a delay (manipulated over the session or across the sessions depending of the experiment). Impulsive individuals are those that prefer a small but immediate reward instead of a larger but delayed reward.

One week before the experiments, 16 SAL ($\text{♂ } n=4/\text{♀ } n=5$) and 17 LPS ($\text{♂ } n=3/\text{♀ } n=3$) rats were subjected to dietary restriction, their weight measured daily until the end of experiment and maintained between 95% and 90% of the free feeding weight. To accustom them to the food pellet (TestDiet, Mlab rodent tablet 45 mg, Cambridge, UK) we sprinkled some of them, three per rat, in the home cage one day prior the beginning of the actual training phase.

Six operant chambers (Med associates, USA) were used for this protocol which comprises two different phases: one a training phase and test task. Every trial starts with the light home and the cue light (over the lever) turning on. If the rat pressed the lever a reward (small or large, depend on the trial) was delivered. Otherwise, if the rat failed to press the lever within 30 s the cue light was turned off for 5 s.

In training phase, the animals are trained to press either the left or right lever for a food pellet reward. The rats were exposed to this phase until they reached 30 rewarded trials in a session.

The main test phase consisted of five 12-trial blocks, where the two first were forced-choice trials that were followed by 10 free-choice trials. Pressing one lever was always associated with immediate delivery of a single food pellet, while pressing the other lever was always associated with the delivery of four reward pellets, but only

after a specific delay assigned to each 12-trial block (0, 5, 10, 20 or 40 s). Rats were first trained in a delay 0 condition (no delay for either the small or large reward) until they showed a clear preference for the large reward and then they were submitted to the main phase of the protocol. Rats underwent this training until their performance stabilized (no significant difference in their preference for the large rewards across 3 days blocks).

6. Cocaine self-administration

Cocaine self-administration experiments began around PD 90 and they were performed on 16 SAL (♂ n= 9/♀ n= 7) and 17 LPS (♂ n= 8/♀ n= 9) rats that had undergone the behavioural testing described above (T maze, social interaction and PPI). Some animals were lost during the course of the experiments due to catheter failure, infection or loss of the head implant.

The rats were prepared surgically by placing an intravenous catheter in the jugular vein under isoflurane anaesthesia (5% for induction, 1.5–2% for maintenance). Buprenorphine (0.05 mg/kg s.c.) was injected presurgically to ensure adequate analgesia and a polyvinylchloride tube (0.064 interior diameter) was implanted in the right jugular vein, approximately at the level of the atrium. The catheter was passed subcutaneously, exiting in the mid scapular region and then passing through a spring tether system (Alice King, Chatham, CA, USA) mounted to the rat's skull with dental cement. The animals were given at least 7 days to recover from surgery, with meloxicam added to their drinking water (MetacamTM- Norvet, 15 drops of a 1.5 g/ml solution per 500 ml of water). The catheters were flushed daily with 0.5 ml of an antibiotic solution (gentamicin, 40 mg/ml) dissolved in heparinized saline to prevent infection and to maintain catheter patency.

Separate mother solutions of COC were prepared for males and females to account for the difference in body weight between both sexes and to prevent big discrepancies in the volume injected that could create confounds in the analysis of potential sex differences in self-administration behaviour.

Animals were allowed to self-administer COC in daily 2 h sessions performed 7 days a week during 5 weeks, except for the first day when the animals underwent two consecutive 2 h sessions to facilitate the acquisition of the self-administration behaviour. The protocol was divided into several phases: 18 days of acquisition at 0.5 mg/kg dose and fixed ratio 1 schedule of reinforcement, a dose–response curve (comprised of three-day blocks each at a dose of 1.5/1/0.25/0.125 mg/kg in a

Latin-square design), three stabilization sessions at the 0.5 mg/kg dose, and 10–12 extinction sessions (where the drug was substituted for saline and the visual cue was not activated during the procedure) and cue-induced reinstatement (where the cue was activated but the COC was not available).

7. Data Analysis

All data were analysed using the IBM SPSS statistical software package (version 24 for Windows). Outliers were identified by SPSS using the interquartile range criterion and a value of $p \leq 0.05$ was considered to represent a statistically significant difference. Square roots transformations were applied when appropriate to correct the skewness in the distribution of the data and the lack of homogeneity of variances.

The mean body weight increment for each of the two injection days was analysed using a Student's t-test. Temperature changes were analysed with a mixed ANOVA, using the treatment (SAL/LPS) as the between subjects factor and the measurement time as the within subjects factor. The body weight increment between days 16 and 18 was analysed using an independent samples Student's t-test. Cytokine concentrations were expressed as the percentage increase relative to the saline group and they were analysed with a Student's t-test for unrelated samples for each sample type.

The T-maze data was analysed with a Pearson's Chi-squared binomial test for each group. The open field data was analysed with a two way ANOVA (with sex – male or female - and treatment as the between subject factors) and the social interaction test with separate multivariate analyses of variance (MANOVA), using each behaviour as the dependent variable, and taking Sex and Treatment as the between subject factors. The same analysis was applied to the PPI data.

All phases in cocaine self-administration were analysed with a mixed ANOVA (fixed between-group factor, Treatment [SAL or LPS] and Sex [Male or Female]; fixed within subject repeated measures factors, daily COC self-administration sessions) except cue-induced reinstatement where a Student's t-test was performed using active or inactive lever presses as dependent variable and treatment as independent variable. Effect sizes are reported when appropriate.

Impulsive behavior was analysed using a mixed ANOVA (fixed between-group factor, Treatment [SAL or LPS] and Sex [Male or Female]; fixed within subject repeated measures factors, preference for the large reward in each delay). For this analysis we used the last block of three days of training where the performance was stable.

In the case of the Student's *t* tests, the effect size is estimated from Cohen's *d* (the range of values being 0.2 = small effect, 0.5 = moderate effect, 0.8 = large effect: (Cohen, 1988)). The partial η^2 was used as an index of the effect size in ANOVAs (the range of values being 0.02 = small effect, 0.13 = moderate effect, 0.26 = large effect: (Miles, J., Shevlin, 2001)) and the φ statistic was used to measure effect sizes in χ^2 tests (0.2 = small effect, 0.4 = moderate effect, 0.6 = large effect: (Rea, L.M., Parker, 2014)).

Resultados



Chapter I. Rattus Novergicus Wistar

• Study I

In this first study we aimed at using the prenatal immune activation model published by Borrell in order to examine COC self-administration behavior in LPS- and saline-exposed animals. We first induced MIA on pregnant rats with LPS and measured body weight and temperature on the day of the injections to check for somatic indexes indicative of the effects exerted by LPS.

When the offspring reached PD 90, we submitted them to PPI testing to evaluate sensory-motor gating deficits (a proxy for schizophrenia-like symptoms). On PD 110 one cohort of animals underwent COC self-administration and another other cohort food self-administration (**Figure 13**).

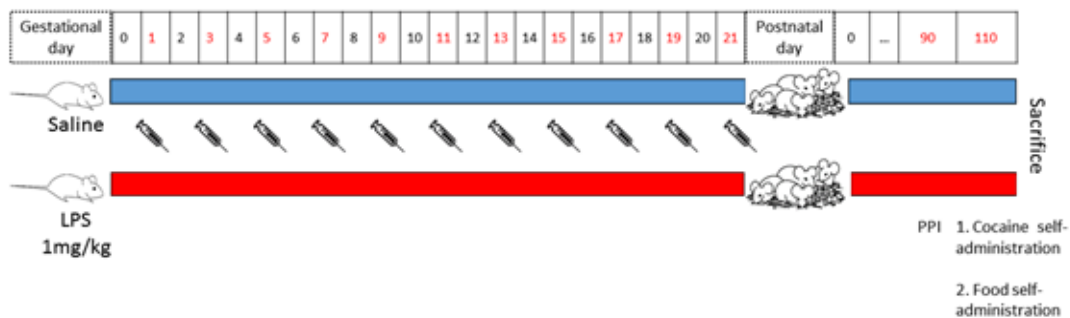


Figure 13.

Chapter 1 experimental design. Study 1 and 2. Alternate LPS or Sal injections were administered to dam and their offspring was subjected to PPI test on PD 90 and cocaine or food self-administration on PD 110.

1. LPS administration on alternate gestational days neither decreases body weight nor increases temperature of pregnant rats.

The statistical analysis of body weight indicated an effect of Gestational day ($F_{(1,4)} = 8.381$, $p < 0.05$; partial $\eta^2 = 0.677$), suggesting that the weight dam was increasing along pregnancy. No effects were found due to Treatment ($F_{(1,4)} = 0.133$, $p = 0.733$) or Treatment * Gestational day interaction ($F_{(1,4)} = 1.630$, $p = 0.253$) (**Figure 14-A**). The results obtained for temperature increment were not statistically significant (no effect of Treatment ($F_{(1,3)} = 0.340$, $p = 0.601$), Gestational day ($F_{(1,3)} = 1.454$, $p = 0.205$) or Treatment * Gestational day interaction ($F_{(1,3)} = 0.685$, $p = 0.729$) (**Figure 14-B**).

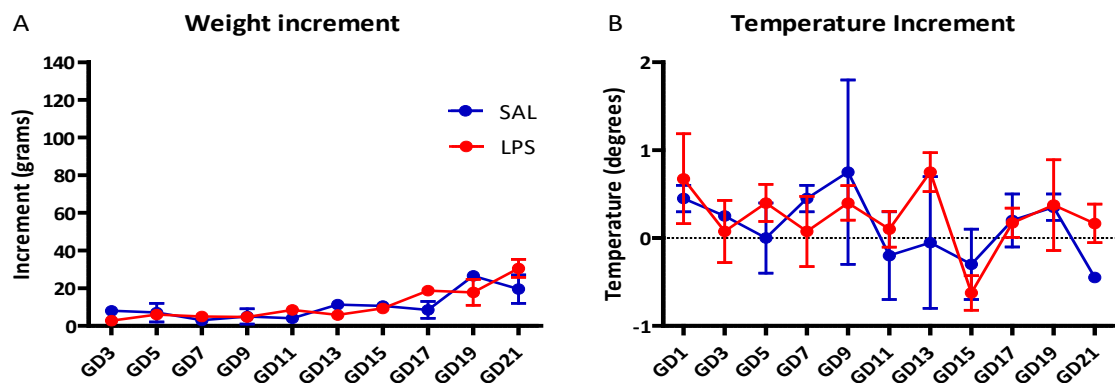


Figure 14.

A) The body weight of the dams showed a progressive increase along the pregnancy. We did not find any difference due to treatment or Treatment * Gestational day interaction. **B)** There was no effect on the body temperature of the dams.

2. LPS administration to pregnant rats diminished startle response in their offspring.

The percentage PPI was evaluated on PD 90. LPS-exposed animals showed a lower percentage of PPI than their saline-treated controls. The Student's t test showed significant effect of the Treatment on PPI120_16 trials ($t_{8,201} = 2.353$, $p < 0.05$; Cohen's $d = 1.16$) and PPI30_16 ($t_{22} = 2.375$, $p < 0.05$; Cohen's $d = 0.97$). (See **figure 15-A and 15-C**). We did not find any difference in the 8db trials, PPI120_8 ($t_6 = 1.780$, $p = 0.125$) or PPI30_8 ($t_{11} = -0.348$, $p = 0.734$) where overall the PPI percentage was lower (see **figure 15-B and 15-D**).

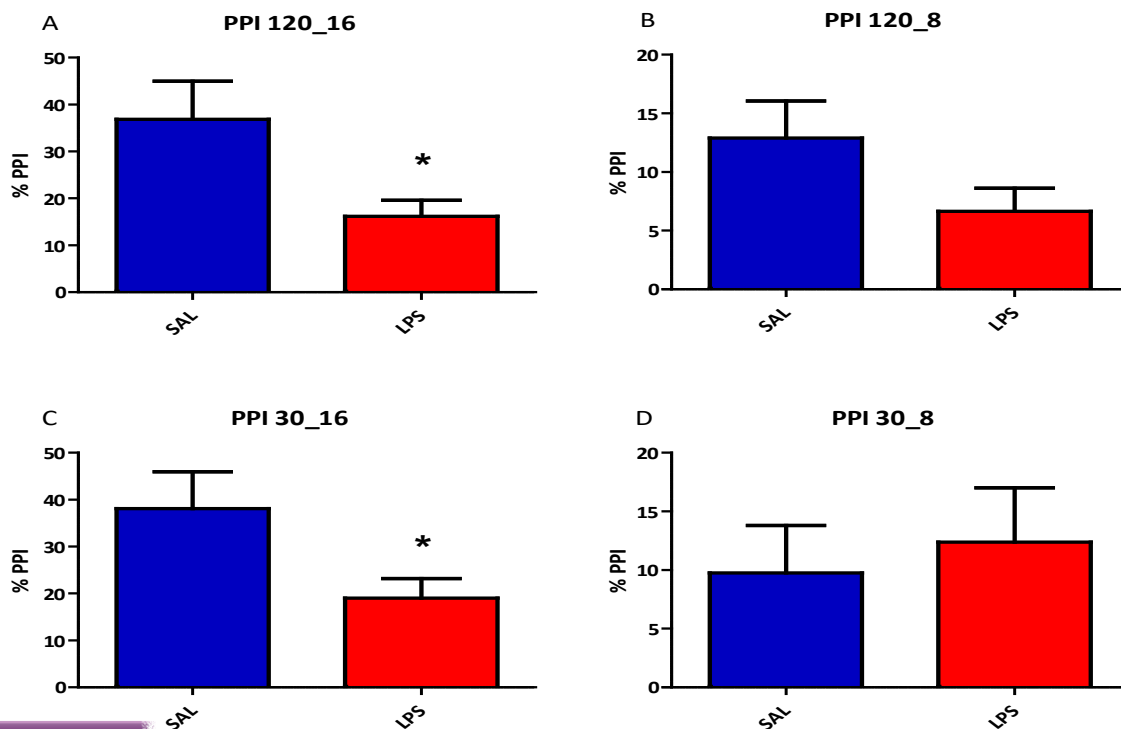


Figure 15.

Percentage of prepulse inhibition in the offspring of rats exposed to SAL or LPS. A treatment effect was observed in PPI120_16 and PPI30_16 trials, where LPS rats showed lower PPI than the Saline group: * $p < 0.05$. No significant effects of Treatment were found in the remaining conditions.

3. LPS offspring showed a higher cocaine intake during the acquisition of cocaine self-administration.

The repeated measures ANOVA did not reveal a significant effect of the Sessions factor ($F_{(1,12)} = 2.398$, $p = 0.069$) or Sessions * Treatment interaction ($F_{(1,12)} = 1.747$, $p = 0.162$) during the acquisition phase. There were significant differences however due to the between subjects factor Treatment ($F_{(1,12)} = 7.832$, $p < 0.05$; partial $\eta^2 = 0.416$) suggesting that LPS-treated animals had a higher COC intake (**Figure 16-A**). Due to the relatively high rate of experimental death in the self-administration paradigm, we could not perform the statistical analysis for the maintenance phase but the tendency seems to be the same as in the acquisition phase (**Figure 16-B**).

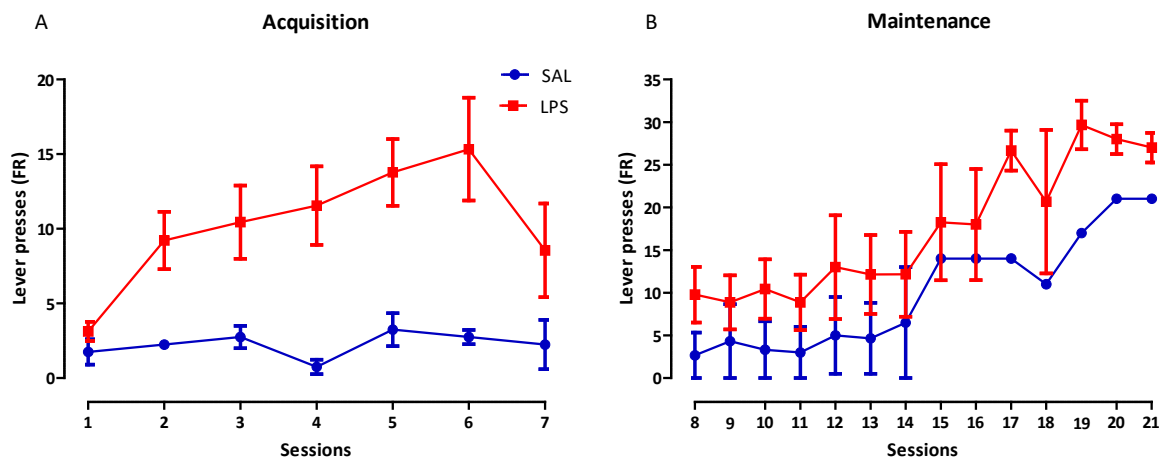


Figure 16.

Cocaine self-administration. A) Acquisition phase. The figure shows the number of active lever presses in the acquisition phase under a FR1 schedule. Significant differences due to Treatment factors were found in cocaine self-administration at a dose of 0.75 mg/kg. **B)** Maintenance phase. Number of active lever presses on each day.

4. LPS offspring did not show altered food-reinforced instrumental responding.

All groups progressively increased their food self-administration behaviour (significant effect of the Sessions factor ($F_{(1,10)} = 9.489$, $p < 0.0001$; partial $\eta^2 = 0.513$) and significant *Difference* contrast found from the eighth session onwards with exception ninth and fifteenth sessions ($p < 0.05$) (this contrast compares one level of a variable and the previous one in a repeated-measures design) However, there were no significant effects of Treatment ($F_{(1,10)} = 0.291$, $p = 0.602$) or Treatment * Session interactions ($F_{(1,10)} = 0.578$, $p = 0.888$).

When we analysed the data during the fixed-ratio 5 schedule phase, we found the same effect as in the fixed-ratio 1 schedule phase. The statistical analysis showed a significant effect of the Sessions factor ($F_{(1,10)} = 6.102$, $p < 0.005$; partial $\eta^2 = 0.404$) but no significant effects of Treatment factor ($F_{(1,10)} = 3.223$, $p = 0.106$) or Treatment * Sessions interaction were found ($F_{(1,10)} = 1.174$, $p = 0.338$).

There were no differences during the progressive ratio schedule which seems to indicate that the LPS rats do not show a greater motivation for natural reinforcers. We did not find significant effect of the Sessions factor ($F_{(1,10)} = 2.030$, $p = 0.168$), Treatment ($F_{(1,10)} = 1.378$, $p = 0.271$) or Treatment * Sessions interaction ($F_{(1,10)} = 1.313$, $p = 0.293$).

In the last phase (extinction) the animals progressively extinguished their previously acquired self-administration behaviour. We found significant effect of the Extinction Sessions factor ($F_{(1,10)} = 14.020, p < 0.0001$; partial $\eta^2 = 0.609$) and significant effect of the *Difference* contrast in the first session; $p < 0.05$. See **figure 17 A-D**.

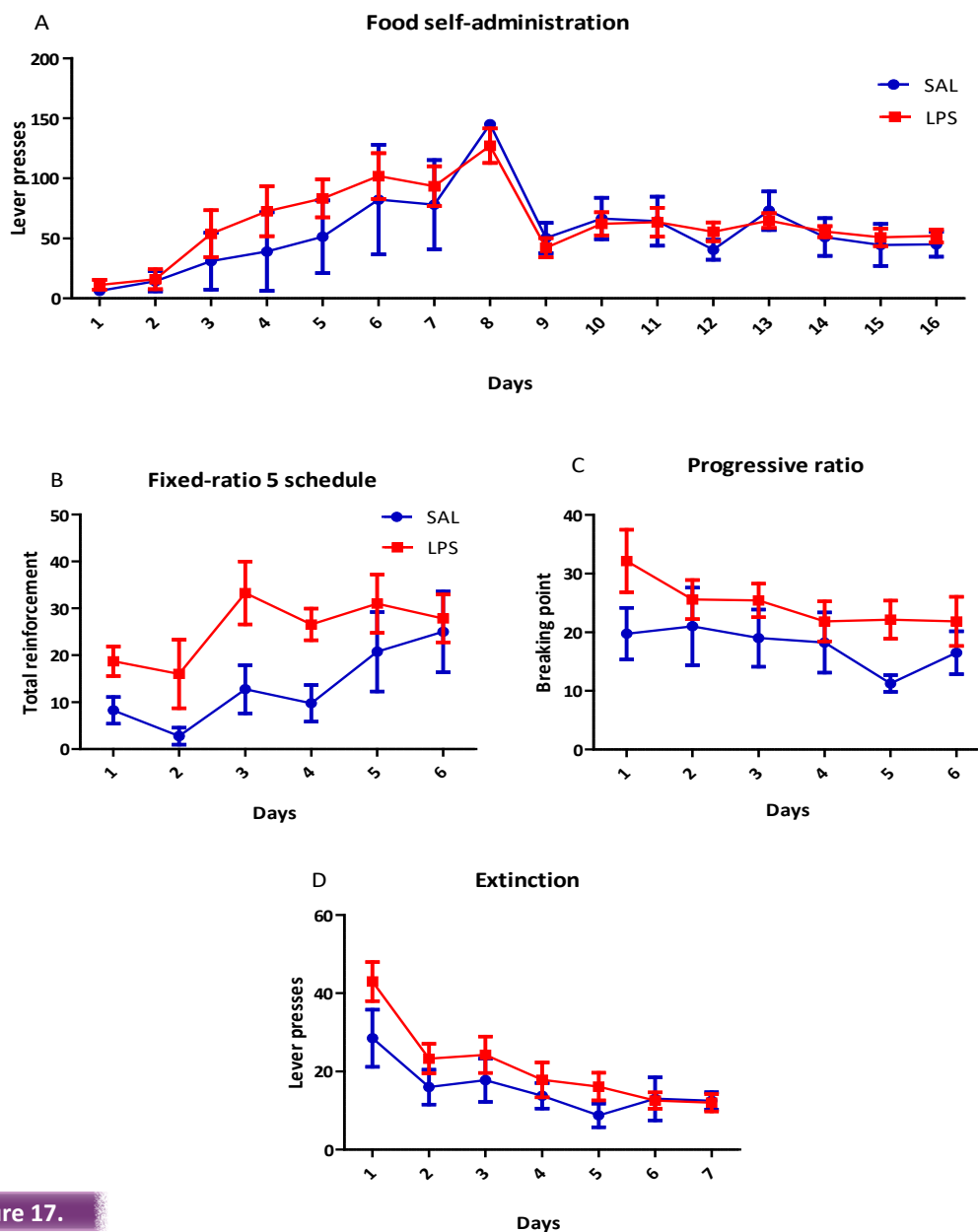


Figure 17.

Food self-administration. A) The figure shows the number of active lever presses in the acquisition phase under a FR1 schedule. Significant differences were found in Sessions factor, but not differences were found in food self-administration due to Treatment or Sessions * Treatment interaction. **B)** Total reinforcement under FR5 schedule on each day. There was no effect on Sessions, Treatment or interaction. **C)** Breaking points in the progressive ratio schedule. We did not find any significant difference in this phase. **D)** Number of active lever presses during extinction. Animals progressively decreased their seeking behavior over the extinction sessions but no significant effect of Treatment was seen.

- **Study 2**

The aims of this study were to replicate the results found in PPI test and to increase the sample size in the COC self-administration experiment. We used the same protocols as in study 1 (**Figure 13**).

I. LPS administration on alternate gestational days neither decreases body weight nor increases temperature of pregnant rats.

As in Study 1, we did not find group differences among treatments. The repeated measures design did not reveal significant effects of Treatment ($F_{(1,3)} = 0.140$, $p = 0.733$) or the Treatment * Gestational day interaction ($F_{(1,3)} = 1.460$, $p = 0.223$), but we find a significant difference in the Gestational day factor ($F_{(1,3)} = 19.266$, $p < 0.05$; partial $\eta^2 = 0.865$). (**Figure 18-A**). No effects were observed for temperature increments either: Treatment ($F_{(1,4)} = 3.345$, $p = 0.141$), Gestational day factor ($F_{(1,4)} = 1.464$, $p = 0.290$) or the Treatment * Gestational day interaction ($F_{(1,4)} = 0.476$, $p = 0.614$) (**Figure 18-B**).

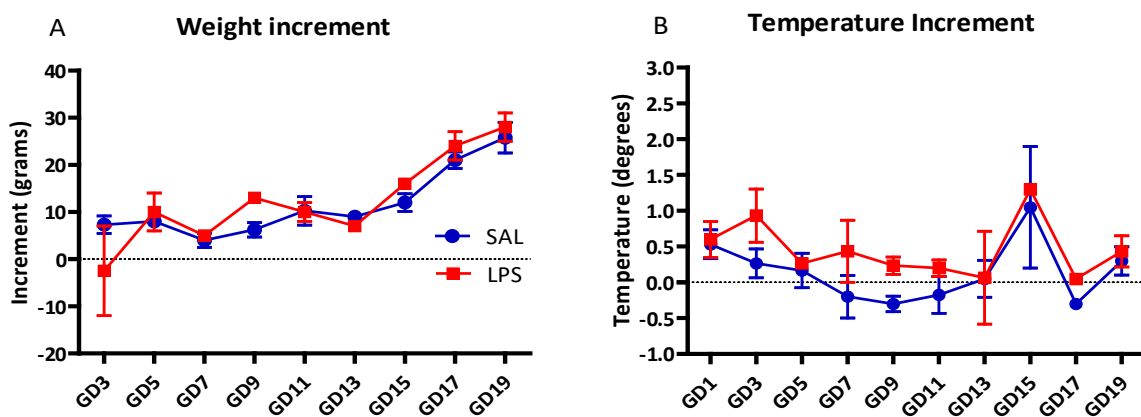


Figure 18.

A) The body weight of the dams showed a significant increase along the pregnancy. We did not find any difference due to Treatment or interaction. **B)** There were no significant effects on the body temperature of the dams.

2. Prenatal immune activation did not change PPI in adulthood.

When we replicated the PPI test in this study, the effect found in the study 1 was no longer evident. The statistical analysis did not reveal any difference among treatment or PPI interval type: PPI120_16 ($t_{30} = 0.165$, $p = 0.870$); PPI120_8 ($t_{18} = 0.085$, $p = 0.093$); PPI30_16 ($t_{28} = -0.497$, $p = 0.623$) and PPI30_8 ($t_{13} = 0.704$, $p = 0.494$). We even found the opposite tendency in this study, whereby LPS-treated rats had more prepulse inhibition than the control group (**Figure 19, A-D**).

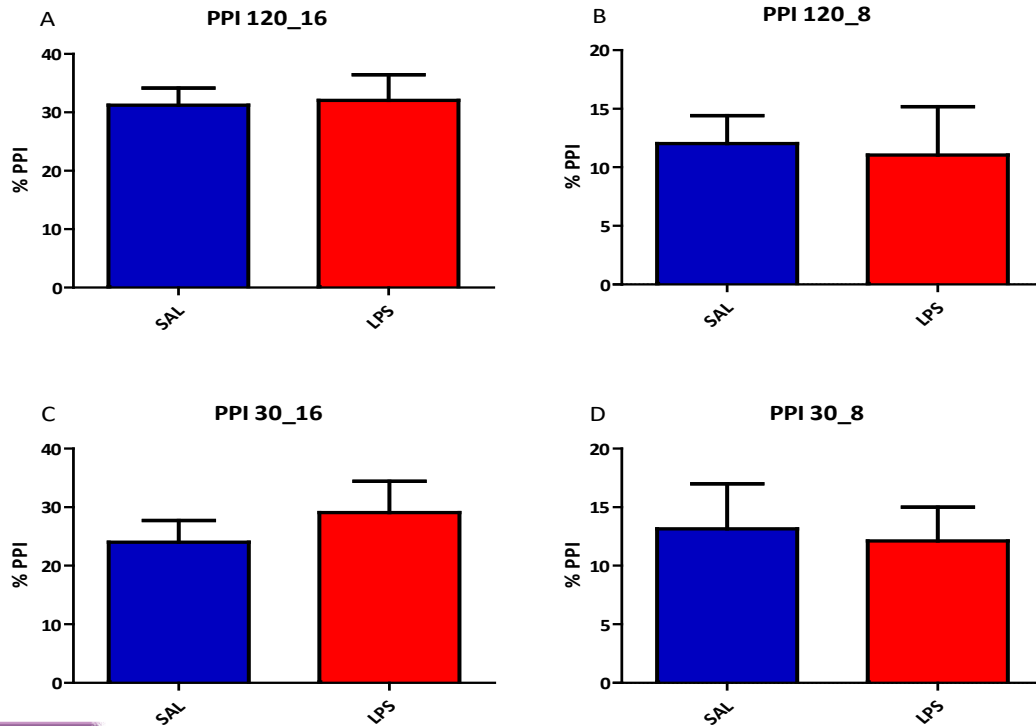


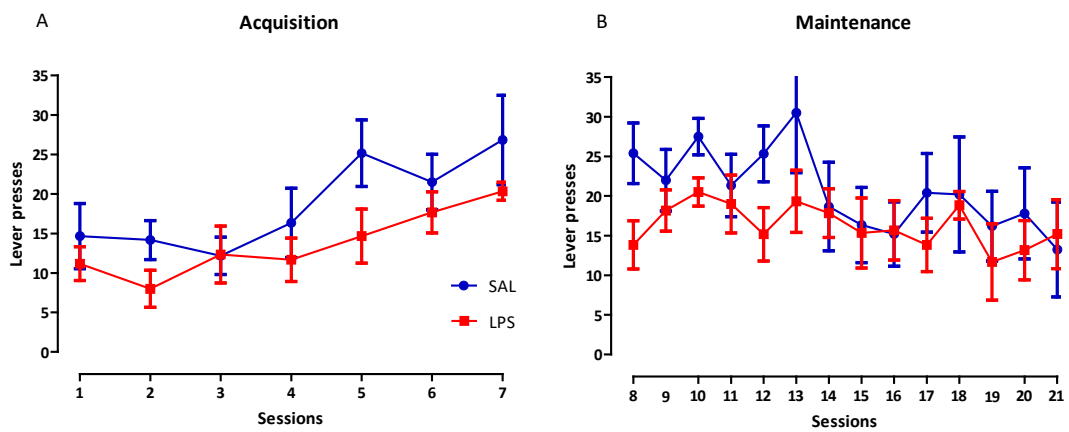
Figure 19.

Percentage of prepulse inhibition in the offspring of rats exposed to SAL or LPS. No significant effects of the Treatment were found in any of the conditions tested.

3. Prenatal immune activation did not induce a potentiation of cocaine self-administration.

In the replication study we obtained a significant effect of the Sessions factor ($F_{(1,11)} = 6.153$, $p < 0.0001$; partial $\eta^2 = 0.381$) during the acquisition phase and a significant *Difference* contrast was found in the last session (**Figure 20-A**). However, differences due to Treatment ($F_{(1,11)} = 2.012$, $p = 0.186$) or Treatment * Session interaction ($F_{(1,11)} = 1.053$, $p = 0.401$) were not observed.

In the maintenance phase we did not find differences due to the Sessions factor ($F_{(1,11)} = 1.940$, $p = 0.138$) or the Treatment * Session interactions ($F_{(1,11)} = 0.734$, $p = 0.554$) but there were differences due to the Treatment between groups ($F_{(1,11)} = 5.716$, $p < 0.05$; partial $\eta^2 = 0.388$). Contrary to study 1, in the most of the sessions, the LPS offspring seems show a lower COC self-administration pattern than control group (**Figure 20-B**).

**Figure 20.**

Cocaine self-administration. A) The figure shows the number of active lever presses in the acquisition phase under a FR1 schedule. Significant differences were found due to the Sessions factor, but not differences were found in cocaine self-administration due to Treatment or Sessions * Treatment interaction. **B)** Number of active lever presses during the maintenance phase. No significant effects were found in this phase.

• Study 3

Due to divergent results found in study 1 and 2 in PPI we asked whether the age at which testing is performed might affect the strength or the stability of the effects induced by the treatment. Therefore, we used the same PPI protocol and we measured it at the same postnatal day (PD 90) and also 30 days later (PD 120). See **figure 21**.

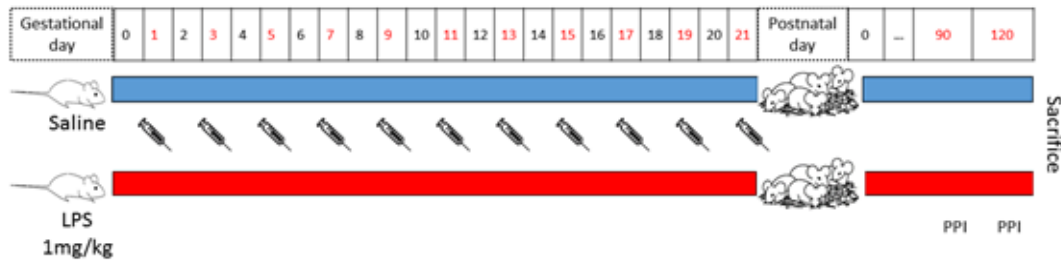


Figure 21.

Chapter 1 experimental design. Study 3. Alternate LPS or Sal injections were administrated to dams and their offspring was subjected to PPI test on PD 90 and PD 120.

1. LPS administration did not induce any change in body weight or body temperature in pregnant rats.

We measured the body weight and temperature on each injection day in the pregnant rats. No effects of the Sessions ($F_{(1,6)} = 0.959$, $p = 0.467$) or Treatment factors ($F_{(1,6)} = 0.816$, $p = 0.401$) or Treatment * Session interaction ($F_{(1,6)} = 0.834$, $p = 0.552$) were found in body weight (**Figure 22-A**). We did not find significant differences due to the Sessions ($F_{(1,6)} = 0.876$, $p = 0.543$) or Treatment factors ($F_{(1,6)} = 0.245$, $p = 0.639$) or Treatment * Session interaction ($F_{(1,6)} = 1.803$, $p = 0.381$) in core body temperature either (**Figure 22-B**).

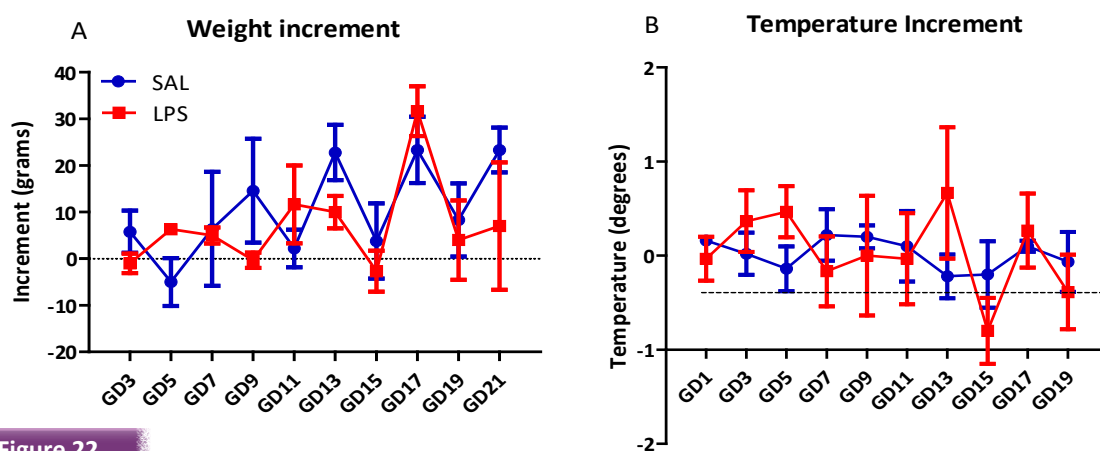


Figure 22.

A) Body weight did not significantly differ between LPS or SAL exposed dams. **B)** The body temperature of the dams did not show significant difference due to our manipulations.

2. Potentiated PPI in the offspring of LPS treated dams at PD 90 but not at PD 120.

We obtained a significant effect of Treatment at PD 90 for the PPI_{30_16} trials ($t_{21} = -2.798$, $p < 0.05$; Cohen's $d = 0.113$). As in study 2, LPS-treated offspring showed a stronger PPI than the saline group (**Figure 23-C**). No other effects were found in the remaining trial types (**Figure 23 A-B-D**): PPI_{120_16} ($t_{31} = -0.879$, $p = 0.386$); PPI_{120_8} ($t_{9,127} = -1.556$, $p = 0.154$) and PPI_{30_8} ($t_{11} = -0.177$, $p = 0.862$).

Because of these diverging results at PD 90 we wanted to test if the age at which PPI is performed might affect the ability of the prenatal treatment to influence sensory-motor gating. To do so, we measured PPI at PD 120 finding no significant effect of LPS administration in any of the trial types (**Figure 24**): PPI_{120_16} ($t_{31} = -0.544$, $p = 0.591$); PPI_{120_8} ($t_{19} = 1.062$, $p = 0.302$); PPI_{30_16} ($t_{31} = 1.263$, $p = 0.216$) and PPI_{30_8} ($t_{18} = -1.328$, $p = 0.201$).

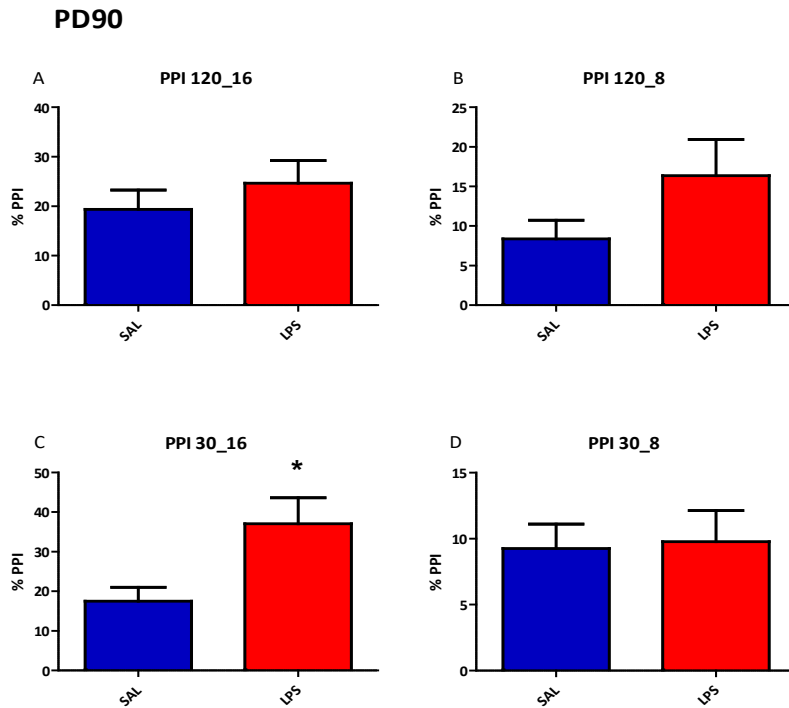


Figure 23.

Percentage of prepulse inhibition in LPS or SAL-exposed offspring. A treatment effect was observed in the PPI30_16 condition, whereby LPS rats showed a stronger PPI than the Saline group: * $p < 0.05$. No significant effects of Treatment were found in the others conditions.

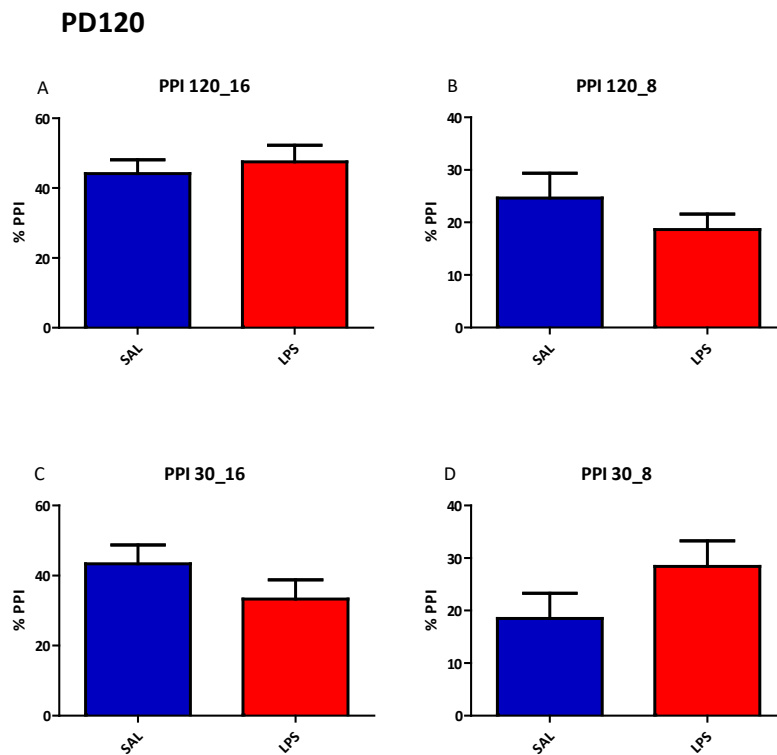


Figure 24.

Percentage of prepulse inhibition in the offspring of LPS or SAL-treated dams. No significant effects of Treatment were found in any conditions.

Conclusions

In this first chapter our goal was to study COC self-administration and food-reinforced behaviour in a prenatal immune activation model of schizophrenia in rats.

In Study 1, despite having a low number of animals, we reproduced the known effects of prenatal LPS on PPI (namely a reduction of PPI in LPS-exposed animals). Interestingly, these animals also showed higher COC self-administration than their saline-exposed controls during the acquisition. However, when we tried to replicate this effect and increase the sample size of the groups, the effect was no longer evident. In this case, the animals even showed opposite results in both PPI and self-administration of COC in relation to the first study.

These diverging results drove us to carry out a third study where PPI was tested at two different time points (PD 90 and PD 120). In this third study we had a sufficient amount of rats per group however the results obtained in the PPI seemed to follow the trend observed in Study 2, where LPS-exposed rats showed an increased prepulse inhibition at PD 90 while no effects were found at PD 120.

Chapter 2. *Rattus Novergicus Lewis*

The results obtained in the first chapter led us to conclude that the effects induced by the prenatal immune alteration might not be strong or stable enough. Therefore, we decided to introduce changes in some parameters, such as dose, administration regime or the strain of the rats. Given that we obtained some positive results when introducing such changes we decided to run the self-administration experiment and we also introduced some modifications in order to obtain more information about the mechanisms that might be acting during cocaine-induced reinforcement in LPS-exposed rats as compared to their controls.

We increased the dose of LPS from 1 mg/kg to 2 mg/kg and injected this dose daily to pregnant dams rather than on alternate days, using the same protocol described in Romero et al., (2007). See **figure 25**.

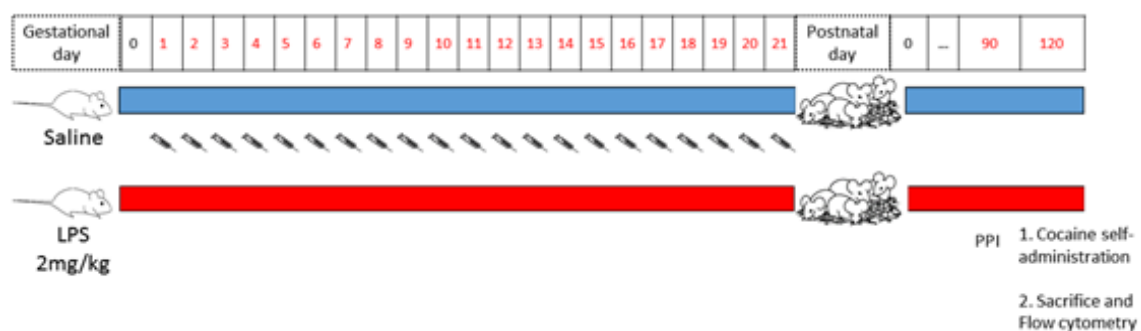


Figure 25.

Chapter 2 experimental design. Daily LPS or Sal injections were administrated to dam and their offspring were subjected to PPI test on PD 120 and cocaine self-administration on PD 130. After the PPI test another group was used for flow cytometry after sacrifice.

Second, we used a different strain of rats, in this case Lewis instead of Wistar. We found in pilot experiments that Lewis rats showed a more robust and stable PPI than Wistar. There is some evidence in the literature that the Wistar strain shows quite a variable PPI that even depends on the supplier (Goepfrich, Gluch, Friemel, & Schneider, 2013; Swerdlow et al., 2000).

We did not change the parameters of the PPI test but we did change the self-administration protocol (we increased the number of self-administration sessions, introduced a progressive ratio schedule phase and performed a dose-response curve; in addition, we included extinction phase followed by a cue-induced drug seeking test).

Given the sensory-motor deficit induced by the treatment, we decided to look for possible peripheral biomarkers that could be indicative of these (see introduction). To attain such a goal, we used flow cytometry to study surface markers (D3, D5 and CB2 receptors) in different immune cells (lymphocytes, granulocytes and monocytes).

1. Daily LPS administration had no effects on the body weight of the dams.

No significant differences were found between the treatments ($F_{(1,13)} = 0.584, p = 0.459$) or due to the Treatment * gestational day interaction ($F_{(1,13)} = 1.331, p = 0.165$) in the increment of body weight across gestation. However, the statistical analyses do show a significant effect for the Gestational day factor ($F_{(1,13)} = 5.525, p < 0.0001$; partial $\eta^2 = 0.315$) and a significant *Difference* contrast was found on GD 18 ($p < 0.05$, this contrast tests if there is a significant difference between one level of a variable and the previous one in a repeated-measures design). See **figure 26**.

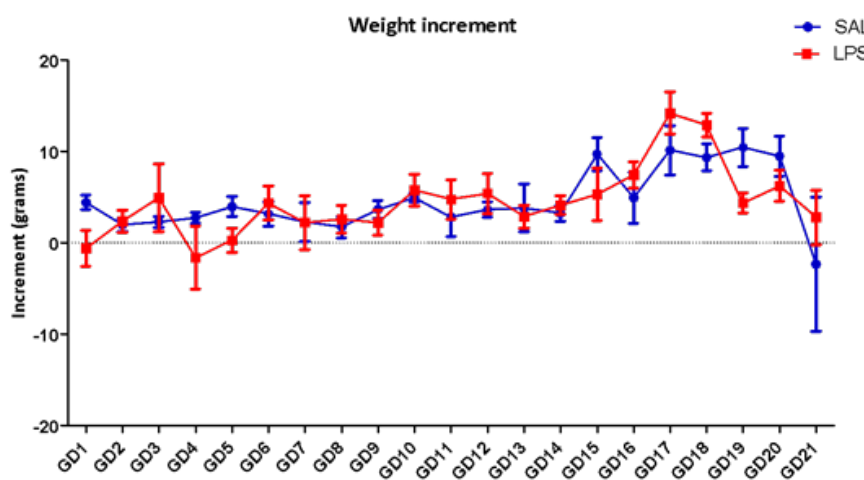


Figure 26.

The body weight of the dams did not show any significant modification along the pregnancy. No effects due to the Treatment or the Treatment * Gestational Day interaction were found.

2. LPS-exposed offspring showed a diminished PPI as compared to control rats in I20_16 trials.

When tested at P90, LPS rats showed a significantly diminished PPI in PPI120_16 trials ($t_{60} = 2.721, p < 0.05$; Cohen's $d = 0.069$). Conversely, in the PPI120_8 trials the opposite result was found whereby LPS-exposed rats displayed a higher PPI percentage ($t_{46.97} = -4.528, p < 0.001$; Cohen's $d = 0.116$) See **figure 27 A-B**.

No significant effects were found in 30_16 ($t_{61} = -0.431, p = 0.668$) or 30_8 trials ($t_{58} = 0.845, p = 0.402$) (**Figure 27 C-D**).

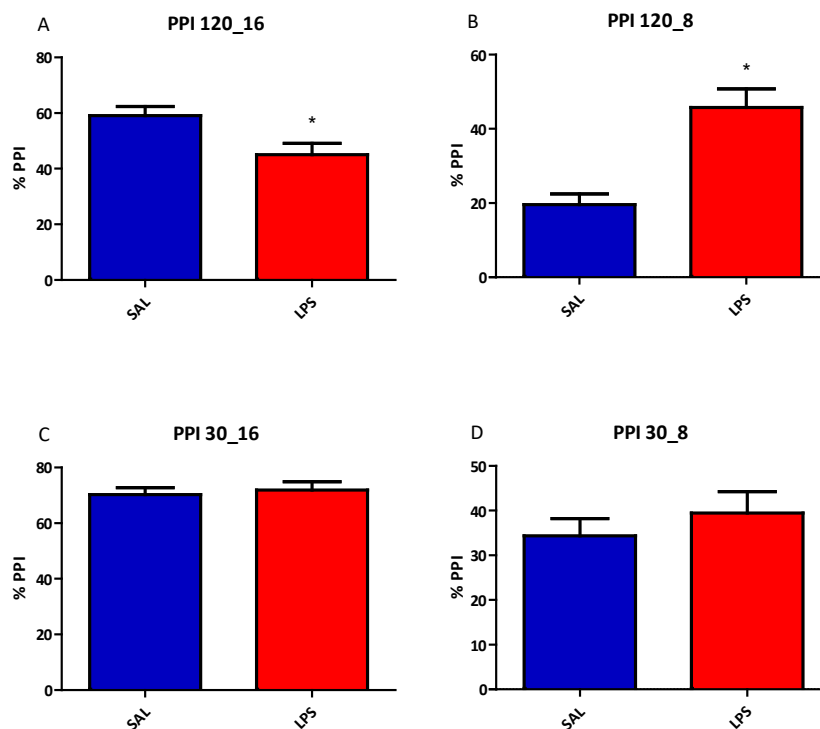


Figure 27.

Percentage of prepulse inhibition in SAL or LPS-exposed offspring. There was a significant effect of the Treatment in the PPI12_8 trials whereby LPS rats showed a more robust PPI than SAL controls: * $p < 0.05$. No significant effects of the Treatment were found in the others conditions tested.

3. LPS-exposed offspring did not show an increased intake of cocaine, motivation for its consumption or cue-induced drug seeking as compared to saline-exposed controls

Rats progressively increased their COC intake over sessions as suggested by the significant effect of the Sessions factor ($F_{(1,23)} = 7.358$, $p < 0.0001$; partial $\eta^2 = 0.251$). We found a significant *Difference* contrast from the eighth session onwards ($p < 0.05$). However, there were no significant effects of the Treatment ($F_{(1,23)} = 0.005$, $p = 0.942$) or the Treatment * Session interaction ($F_{(1,23)} = 1.071$, $p = 0.375$) (**Figure 28**).

In the dose response curve we did not find significant differences of the Sessions ($F_{(1,20)} = 0.333$, $p = 0.855$), Treatment ($F_{(1,20)} = 0.019$, $p = 0.892$) or their interaction ($F_{(1,20)} = 0.673$, $p = 0.612$) (**Figure 29-A**). No significant differences of the Sessions ($F_{(1,8)} = 0.530$, $p = 0.703$), Treatment ($F_{(1,18)} = 1.940$, $p = 0.182$) factors or the Treatment * Session interaction ($F_{(1,18)} = 0.153$, $p = 0.954$) (**Figure 29-B**) were found in the progressive ratio schedule.

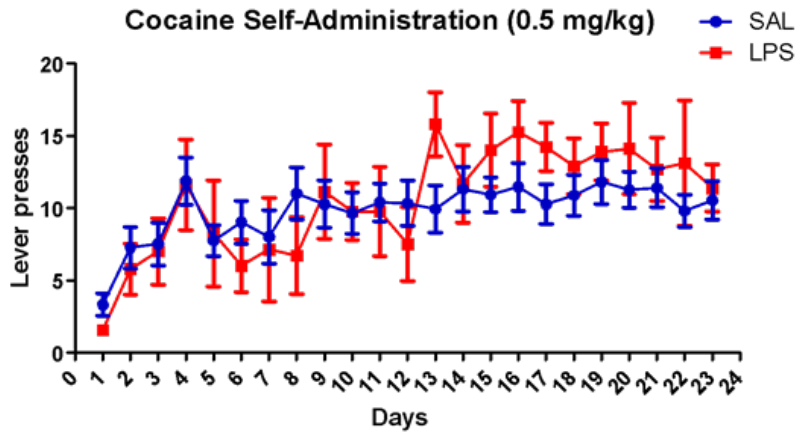


Figure 28.

Cocaine self-administration. The figure shows the number of active lever presses in the acquisition phase under a FR1 schedule (0.5 mg/kg dose). Significant differences were found due to the Sessions factor, but not other differences were found in cocaine self-administration behaviour due to Treatment or the Session * Treatment interaction.

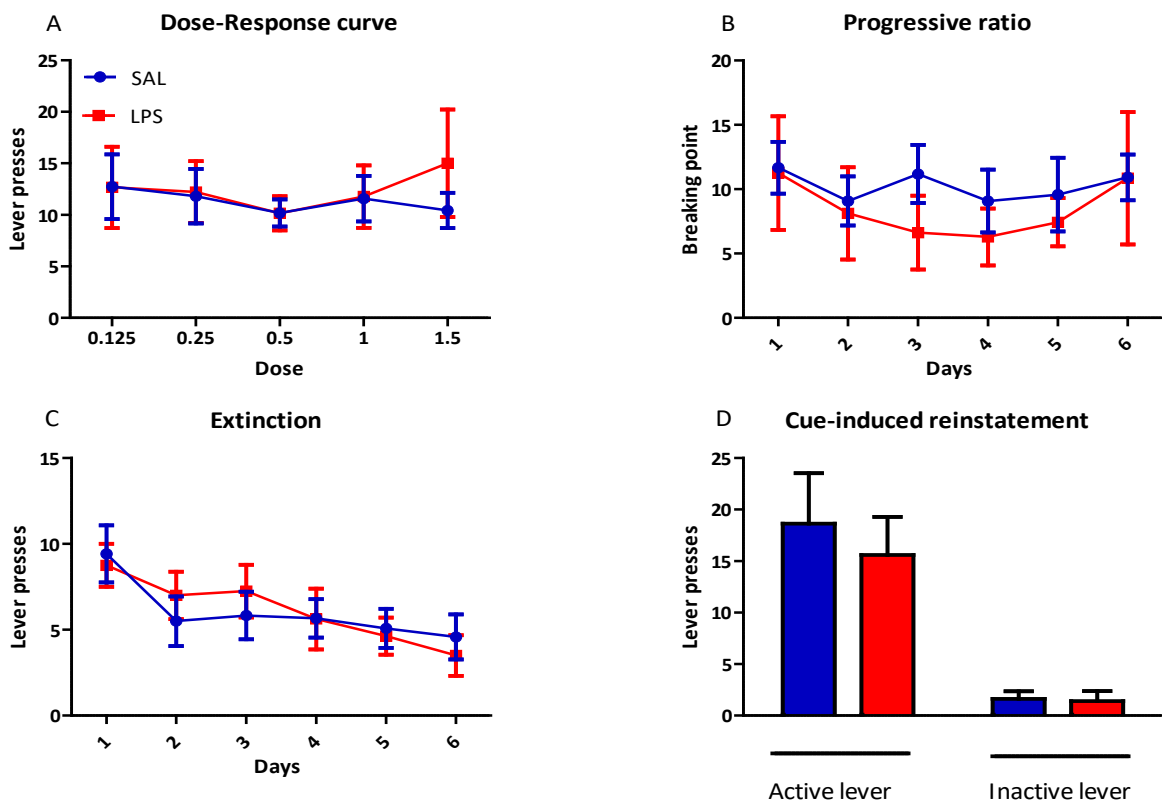


Figure 29.

A) Average number of active lever presses per dose. There was no effect of Sessions, Treatment or their interaction. **B)** Breaking points in the progressive ratio schedule. We did not find any significant effect. **C)** Number of active lever presses during extinction. Animals progressively decreased their seeking behavior over the extinction sessions but no significant effects of Treatment or Sessions x Treatment interaction were seen. **D)** Number of active and inactive lever presses in the cue-induced reinstatement. No difference were found due to the Treatment.

During extinction rats decreased their lever pressing behaviour as highlighted by the significant effect of the Sessions factor ($F_{(1,19)} = 6.774$, $p < 0.0001$; partial $\eta^2 = 0.273$). No effects were found due to the Treatment factor ($F_{(1,19)} = 0.005$, $p = 0.945$) or Treatment * Session interaction ($F_{(1,19)} = 0.674$, $p = 0.596$) (**Figure 29-C**).

Student's t-test was performed to analyse cue-induced drug seeking behaviour. The statistical analysis did not show significant differences between the Treatments in active lever presses ($t_{14} = 0.391$, $p = 0.702$) or inactive lever presses ($t_{13} = -0.457$, $p = 0.655$) (**Figure 29-D**).

4. Fewer D3-expressing granulocytes in LPS-exposed offspring.

First, we wanted to check whether the schizophrenia-like phenotype produced by MIA had an effect on blood cell populations. Statistical analyses did not reveal differences between treatments in any studied population: Lymphocytes B ($t_{19} = 0.634$, $p = 0.534$); Lymphocytes T ($t_{19} = -0.059$, $p = 0.953$); Monocytes ($t_{19} = 1.072$, $p = 0.297$) and Granulocytes ($t_{11.368} = -0.482$, $p = 0.639$) (**Figure 30 A-D**).

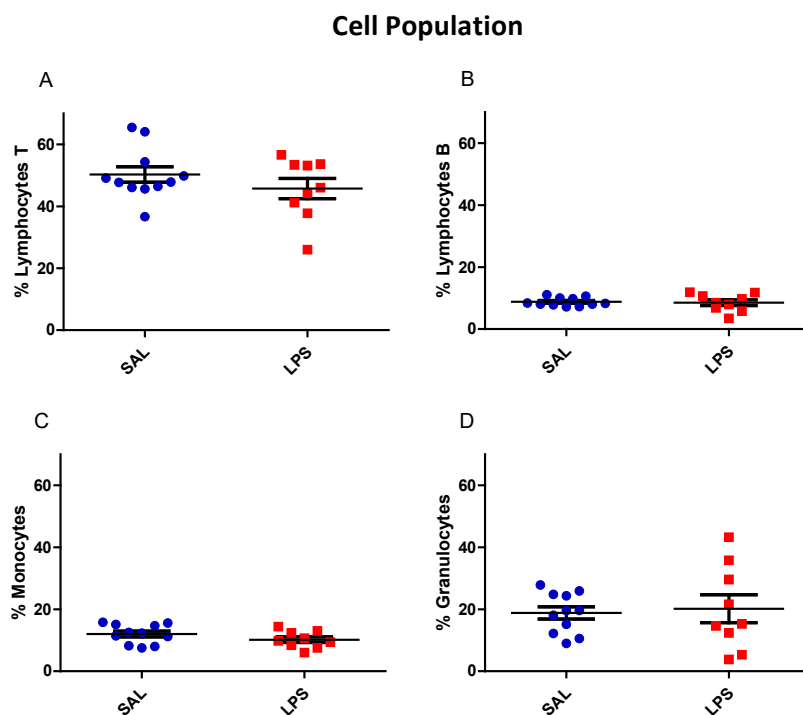


Figure 30.

A) Percentage of T lymphocytes in the SAL or LPS-exposed offspring. **B)** Percentage of B lymphocytes in SAL or LPS-exposed offspring. **C)** Percentage of monocytes. **D)** Percentage of granulocytes. The statistical analysis did not show significant effects of the Treatment in any case.

Regarding the labelling performed for the CB2 receptors in the different populations of immune cells, we did not find any significant differences between the treatments. However, there seems to be a trend in both types of lymphocytes in LPS offspring. Analyses performed for CB2 receptors on T lymphocytes show a trend for up-regulation in LPS-exposed rats ($t_{18} = -2.039$, $p = 0.056$) as was also the case for B lymphocytes ($t_{18} = -1.982$, $p = 0.063$) (**Figure 31 A-D**).

We did not find any significant difference in monocytes ($t_{18} = 0.368$, $p = 0.717$) or granulocytes ($t_{18} = 1.264$, $p = 0.223$) (**Figure 31 B-C**).

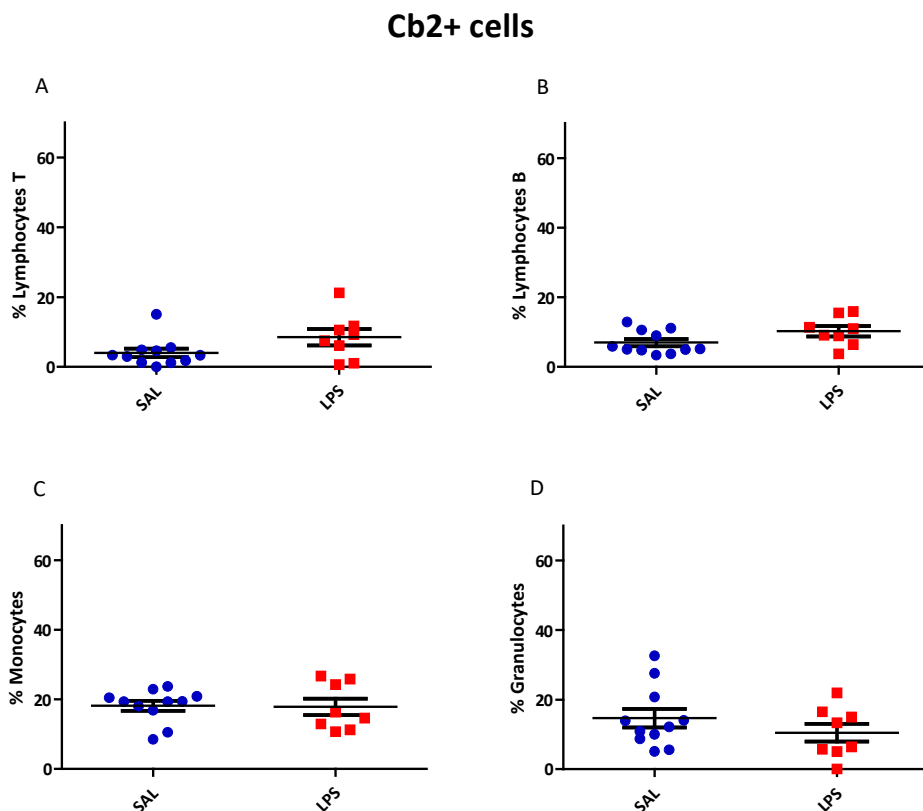


Figure 31.

A) Percentage of CB2-positive T lymphocytes in SAL or LPS-exposed offspring. **B)** Percentage of CB2-positive B lymphocytes in SAL or LPS rats. **C)** Percentage of CB2-positive monocytes. **D)** Percentage of CB2-positive granulocytes. The statistical analysis showed no significant effects.

We did find however a statistically significant lower number of D3 receptor-expressing granulocytes in the blood in LPS-exposed offspring ($t_{60} = 2.721$, $p < 0.05$; Cohen's $d = 1.121$) where there seems to be a decrease of this receptor in the offspring that were exposed to LPS during gestation (**Figure 32-D**). No differences were found between the treatments in the rest of populations for this receptor: T lymphocytes ($t_{19} = 0.745$, $p = 0.465$); B lymphocytes ($t_{19} = 0.409$, $p = 0.687$) or monocytes ($t_{19} = 1.537$, $p = 0.141$) (**Figure 32 A-B-C**).

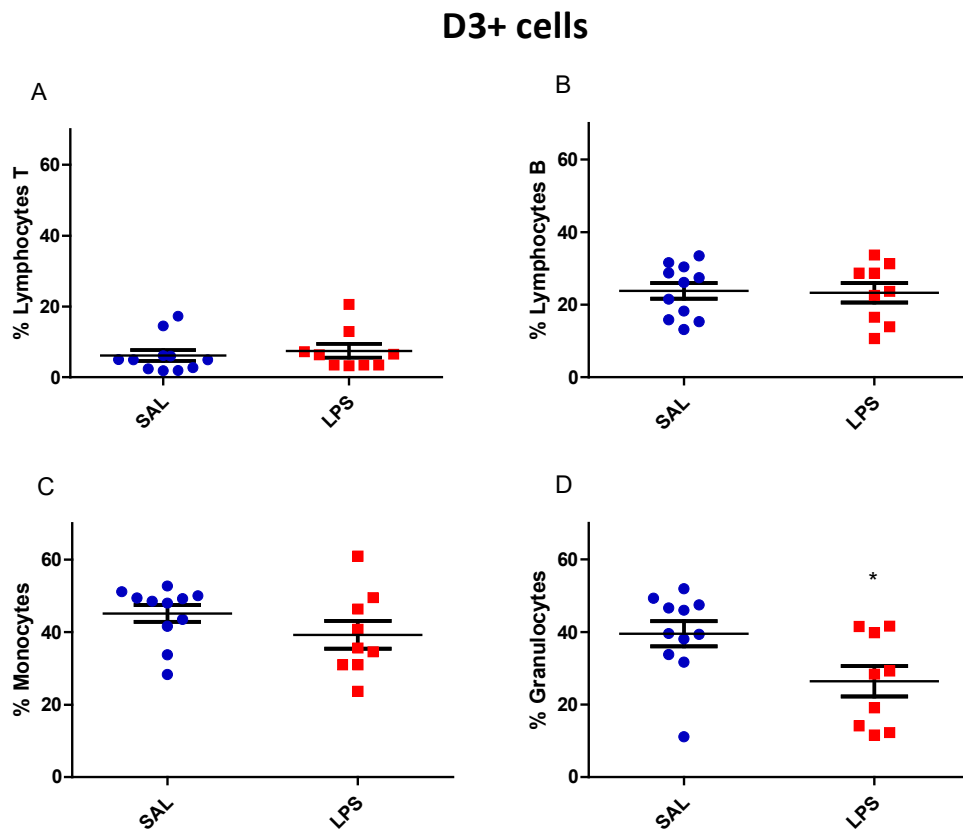


Figure 32.

A) Percentage of D3-positive T lymphocytes in SAL or LPS-exposed offspring. **B)** Percentage of D3-positive B lymphocytes. **C)** Percentage of D3-positive monocytes. **D)** Percentage of D3-positive granulocytes. We find a significant effect of the Treatment where LPS rats showed a fewer expression D3 receptor-expressing in granulocytes:

* $p < 0.05$.

Finally, no differences were found between treatments for D5 receptor-expressing cells in any of the populations studied: T lymphocytes ($t_{18} = -1.559$, $p = 0.136$); B lymphocytes ($t_{19} = -0.801$, $p = 0.433$); monocytes ($t_{10,235} = 0.665$, $p = 0.521$) or granulocytes ($t_{19} = 1.657$, $p = 0.114$) (**Figure 33 A-D**).

D5+ cells

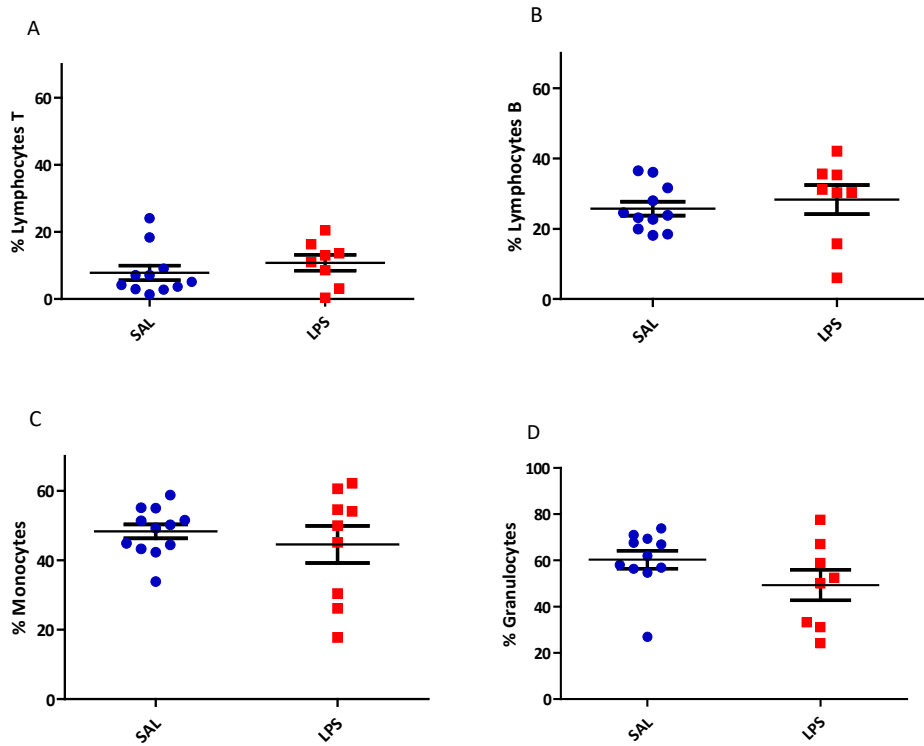


Figure 33.

A) Percentage of D5-positive T lymphocytes in SAL or LPS-exposed offspring. **B)** Percentage of D5-positive B lymphocytes. **C)** Percentage of D5-positive monocytes. **D)** Percentage of D5-positive granulocytes.

Conclusions

While the modification in the prenatal treatment regime introduced in this chapter had no effect on the parameters measured in the pregnant rats (such as body weight or temperature) we found a significant effect of the prenatal immune alteration in PPI percentage that, for one trial type, was in the expected direction. The change of strain (which reduced the frequency of prepulse facilitation events), together with a higher sample size might explain the change in trend in our results. As regards COC self-administration, no differences were observed between the groups in any of the phases.

Finally, data obtained from flow cytometry showed a fewer of D3 receptor-expressing granulocytes from blood samples of the offspring exposed to LPS as compared to their saline-exposed controls. Although not statistically significant, an interesting trend for CB2 receptor-expressing lymphocytes to be more abundant in LPS-exposed rats was found. Further studies should clarify the functional importance of these alterations and whether they are sensitive and accurate enough to be considered as biomarkers of a disorder of the schizophrenic spectrum.

Chapter 3. *Rattus Norvegicus* Sprague

Given the lack of differences in the COC self-administration and the lack a strong PPI deficit in LPS-rats (the effect was only evident in one the trial type while an opposite effect was found in other trial type) we decided to introduce some modifications in this last chapter.

Firstly, we decided to employ the model of MIA used by the Boksa group (Fortier et al., 2007) that has been widely contrasted. In this case, LPS administration was performed intraperitoneally on GD 15 and GD 16. We also wanted to further validate the model in our hands by analysing the cytokine response after acute LPS on GD 15 (**Figure 34**) and by examining some behavioural characteristics of the offspring such as social interaction and anxiety-like behavior in an open field (reminiscent of negative symptoms), working memory (cognitive symptoms) and the usual PPI deficit (positive symptoms) along with other traits that are also altered in schizophrenics such as impulse control (impulsive choice in a delay-discounting task). See **figure 38**.

We also decided to use the Sprague-Dawley strain because Lewis dams normally have fewer pups compared to this rat strain.

For the sake of consistency, we also used the PPI parameters described by Fortier et al., 2007.

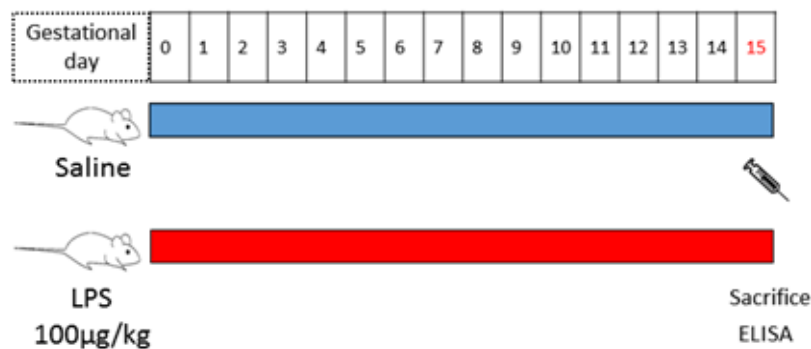


Figure 34.

Experimental design used in chapter 3. Maternal immune activation model validation. After first LPS or SAL injection on GD 15, rats were sacrificed and samples were extracted for the ELISA assay.

I. LPS administration increased TNF α levels in pregnant rats.

We assayed TNF α concentrations 3.5 h after endotoxin exposure in the maternal plasma, placenta, fetal brain, the chorioamniotic membrane and maternal hippocampus. Administering pregnant dams with LPS increased the levels of TNF α in the maternal plasma ($t_{5.636} = -3.119$, $p < 0.05$; Cohen's $d = 5.20$) but no effect was observed in the other tissues analysed: hippocampus ($t_{7.493} = 0.127$, $p = 0.902$); fetal brain ($t_{12} = 0.572$, $p = 0.578$); placenta ($t_{10} = -0.239$, $p = 0.816$) or amniotic fluid ($t_{12} = 0.115$, $p = 0.910$). See **figure 35**.

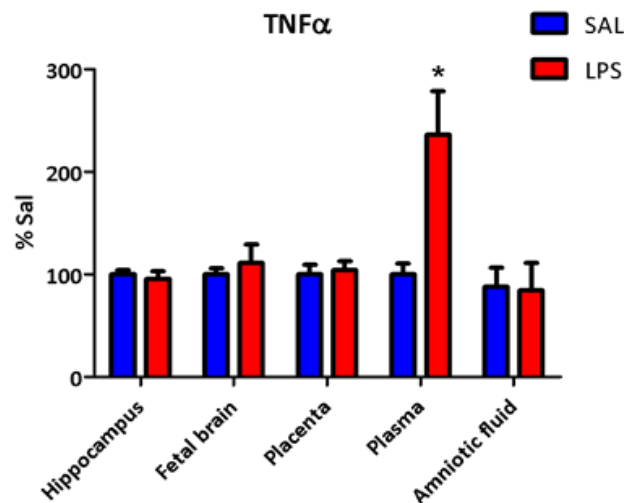


Figure 35.

Effects of LPS treatment on TNF α concentrations. LPS significantly increased the TNF α protein in the maternal plasma compared to SAL rats: * $p < 0.05$ compared to SAL animals.

2. Maternal body weight and temperature are decreased by LPS administration.

On GD 16, the increase in body weight was significantly different between pregnant female rats exposed to SAL or LPS, with dams exposed to LPS augmenting their weight less from the previous day than SAL controls ($t_{11} = 2.425$, $p < 0.05$; Cohen's $d = 1.9$: **Figure 36-A**). Indeed, there was also a trend in dams exposed to LPS to increase their body weight less between GD 15 and GD 18 than the control dams ($t_{11} = 2.178$, $p = 0.052$).

Furthermore, the statistical analysis revealed a significant effect of the first LPS injection on body temperature, as reflected by the significant Treatment * Measurement Time interaction ($F_{(2,20)} = 16.391$, $p < 0.0001$; partial $\eta^2 = 0.621$), which upon further analysis revealed a significant Treatment effect 2 h after injection ($t_{10} = 9.100$,

$p < 0.0001$; Cohen's $d = 7.004$). Dam that received LPS had a lower core body temperature than the SAL controls at this time point (**Figure 37-A**) and this effect tended to persist until the first measurement on GD 16, 1 h before the next injection ($t_{11} = 2.132$, $p = 0.056$). No significant effect of LPS injection was found on GD 16 ($F_{(2,20)} = 2.280$, $p = 0.128$).

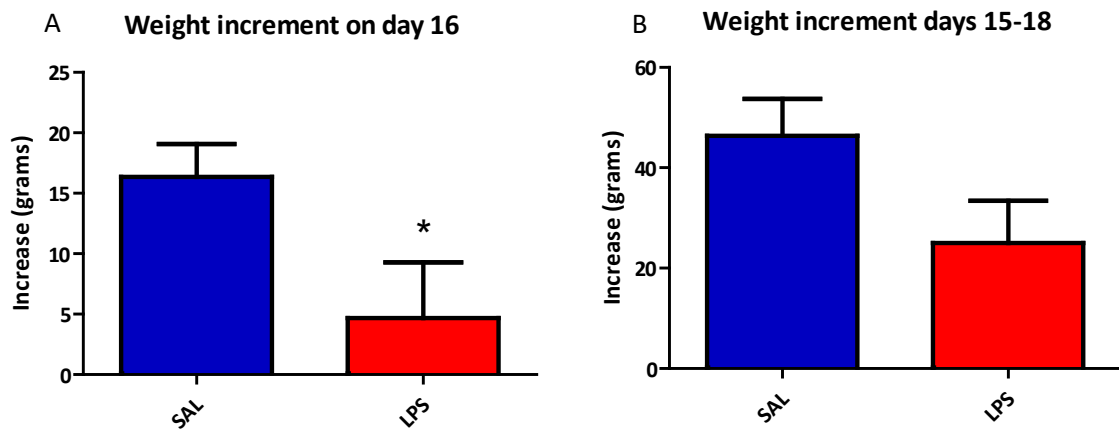


Figure 36.

A) The figure shows the increase in body weight of pregnant female rats between GD 15 and GD 16. **B)** Or between GD 15 and GD 18. Blue bars and red bars represent the average increase in grams. Rats exposed to LPS showed a significantly smaller gain in body weight than the control SAL group on GD 16, and a similar trend was observed between GD 15 and GD 18: * $p < 0.05$ compared to SAL rats.

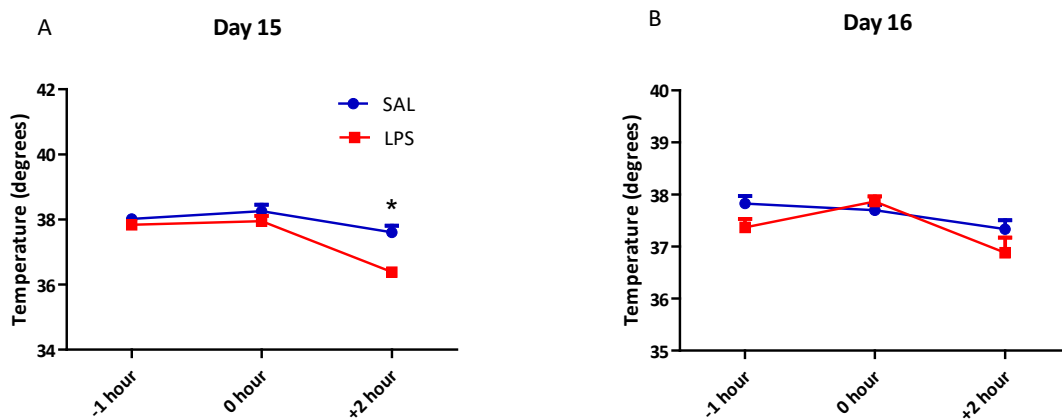


Figure 37.

Core body temperature of pregnant LPS and SAL rats on GD 15 and GD 16 1 h before injection, at the moment injection and 2 h after injection. Blue circles and red circles represent the average temperature in °C. The rats that received LPS had a significantly lower temperature on GD 15, 2 h after injection, than the SAL animals. We did not find any differences on GD 16: * $p < 0.05$ compared to SAL animals.

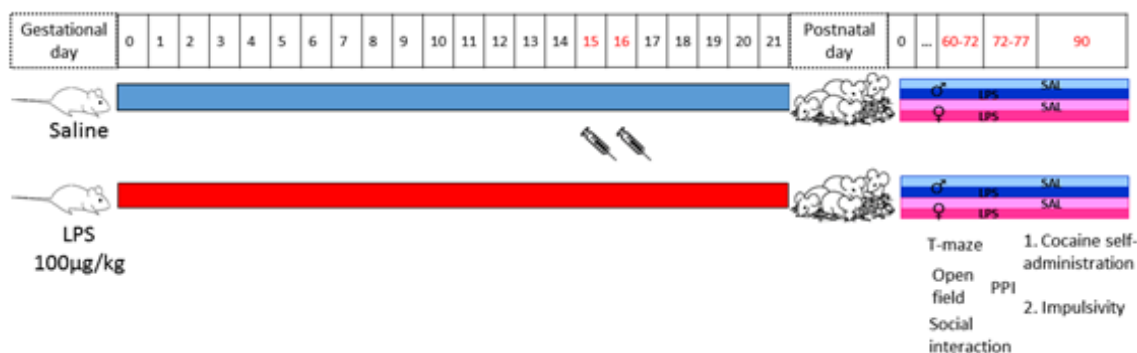


Figure 38.

Chapter 3 experimental design. Behavioural test. Dams received two injections (SAL or LPS) on GD 15 and GD 16. Their offspring were subjected to a number of behavioural tests.

3. Higher anxiety-like behaviour in the open field in females as compared to males.

Two-way ANOVA revealed that open field activity differed in function of the sex of the animals (**Figure 39**), whereby males spent more time in the central zone of the arena than females, reflected by the small but significant effect of Sex ($F_{(11,25)} = 7.862, p < 0.05; \text{partial } \eta^2 = 0.059$). By contrast, no significant effect of Treatment ($F_{(11,25)} = 1.059, p = 0.305$) or the Sex * Treatment interaction ($F_{(11,25)} = 1.227, p = 0.270$) were found.

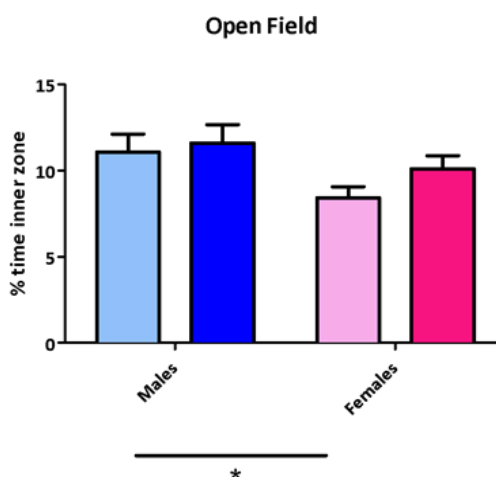


Figure 39.

Average time that the animals spent in the central zone of the arena. There are significant sex differences, with males spending more time in the central zone: * Significant main effect of Sex (p < 0.05).

4. LPS treated offspring did not show social interaction deficits.

When all the variables measured in the social interaction test were considered, the MANOVA performed showed no significant effect on any of the variables analysed (**Figure 40 A-C**). Latency: Sex ($F_{(1,63)} = 0.831$, $p = 0.366$), Treatment ($F_{(1,63)} = 0.027$, $p = 0.869$) or their interaction ($F_{(1,63)} = 2.038$, $p = 0.159$). Duration: Sex ($F_{(1,63)} = 0.545$, $p = 0.463$), Treatment ($F_{(1,63)} = 0.826$, $p = 0.367$) or Treatment * Sex interaction ($F_{(1,63)} = 1.964$, $p = 0.166$). Frequency: Sex ($F_{(1,63)} = 0.067$, $p = 0.796$), Treatment ($F_{(1,63)} = 0.054$, $p = 0.816$) or their interaction ($F_{(1,63)} = 0.675$, $p = 0.415$). See **table 2** for a more detailed analysis.

	Chasing			Boxing		
	Latency	Frequency	Duration	Latency	Frequency	Duration
SAL Male	137.07±31.32	5.86±1.69	6.62±1.47	95.48±42.69	0.93±0.49	0.74±0.38
LPS Male	76.32±31.28	3.68±1.63	2.89±1.43	65.10±41.33	0.62±0.47	0.32±0.37
SAL Female	33±41.71	3.66±2.18	2.70±1.90	32.58±55.11	0.66±0.63	0.44±0.50
LPS Female	66.18±37.73	6.72±1.97	6.39±1.72	124.81±49.85	0.45±0.57	0.28±0.45

	Grooming			Sniffing		
	Latency	Frequency	Duration	Latency	Frequency	Duration
SAL Male	119.12±38.83	2.53±1.09	3.34±1.05	21.34±5.92	25.13±3.65	26.04±4.56
LPS Male	167.74±37.60	2.69±0.99	3.10±1.02	11.64±5.74	25.68±3.54	24.27±4.42
SAL Female	37.83±50.13	5.11±1.32	4.41±1.36	18.84±7.65	26±4.72	26.36±5.89
LPS Female	167.82±45.35	3.81±1.20	3.23±1.23	25.07±6.92	27.90±4.27	35.16±5.33

Table 2.

The table shows the mean ± SEM of the latency to first occurrence, frequency and duration of the rat's typical social behaviors: chasing, boxing and sniffing. No significant differences due to Treatment or Sex were observed in any of variables scored.

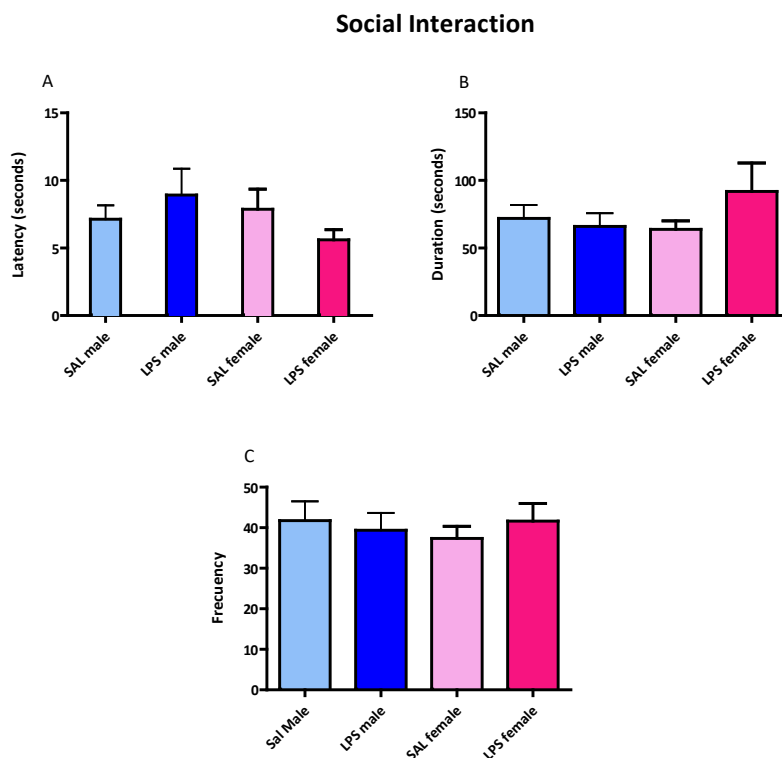


Figure 40.

A) Latency: Time to establish the first interaction. B) Duration: Time total interactions. C) Frequency: Total number interactions. We did not find any significant differences.

5. Working memory deficits in LPS-exposed offspring.

We studied spontaneous alternation and the statistical analysis showed that the male rats that received saline displayed above chance alternation (alternation in 73% of the animals in the group $\chi_1^2 = 5.538$, $p < 0.05$; $\varphi = 0.461$: **Figure 41**), indicating that these animals had intact working memory. However, only 62% of the males that received LPS alternated, which was not significantly different from chance ($\chi_1^2 = 1.190$, $p = 0.275$). By contrast, the females that received saline appeared to perform better than chance with 65% of these animals alternating between arms, albeit a mild effect that did not reach full statistical significance ($\chi_1^2 = 3.457$, $p = 0.063$). Conversely, there was a clear impairment in the performance of the females administered LPS and just 50% of these animals alternated between arms ($\chi_1^2 = 0.000$, $p = 1.00$).

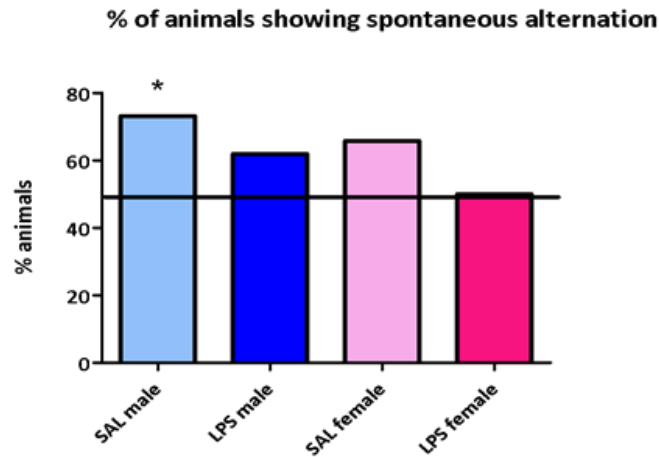


Figure 41.

Analysis of the T-maze data shows a significant difference in the proportion of SAL males that alternate compared to the 50% chance threshold. Unlike LPS treated females, SAL females also show a strong trend to differ from the level of chance: * $p < 0.05$ from expected chance value (50%).

6. Sex and treatment effects in startle response, its habituation and PPI.

PPI was assessed and no significant effects of Sex, Treatment or their interaction were detected in any of the trials (**Figure 42**). PPI12: Sex ($F_{(1,77)} = 0.587$, $p = 0.446$), Treatment ($F_{(1,77)} = 2.075$, $p = 0.154$) or their interactions ($F_{(1,77)} = 0.894$, $p = 0.347$). PPI8: Sex ($F_{(1,77)} = 2.631$, $p = 0.109$), Treatment ($F_{(1,77)} = 0.817$, $p = 0.369$) or their interactions ($F_{(1,77)} = 0.030$, $p = 0.864$). PPI4: Sex ($F_{(1,77)} = 0.108$, $p = 0.743$), Treatment ($F_{(1,77)} = 0.616$, $p = 0.435$) or their interactions ($F_{(1,77)} = 0.500$, $p = 0.482$).

There was a significant effect of Sex in the startle amplitude ($F_{(1,91)} = 9.566$, $p < 0.01$; partial $\eta^2 = 0.095$) with males displaying a more robust startle response than females (MeanMales = 851.903; SEMMales = 52.480; MeanFemales = 612.410; SEMFemales = 53.212).

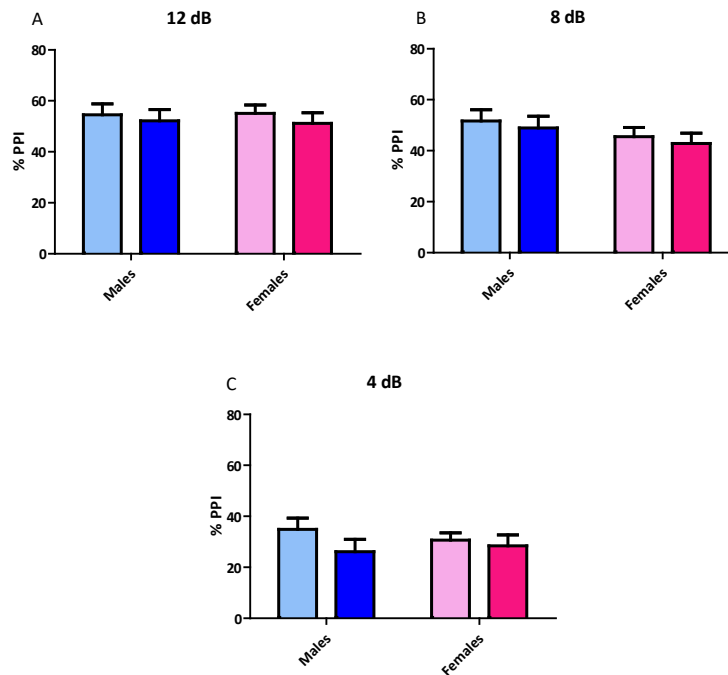


Figure 42.

Percentage of prepulse inhibition in the offspring of rats exposed to SAL or LPS. No significant effects of Sex or Treatment, or their interactions were found.

When we analysed the habituation of the startle response, we found a significant effect of Treatment ($F_{(1,90)} = 8.360, p < 0.01$; partial $\eta^2 = 0.085$) and of the Sex * Treatment interaction ($F_{(1,90)} = 3.975, p < 0.05$; partial $\eta^2 = 0.042$), which upon further analysis revealed that females administered LPS had a stronger habituation of the response than those that received SAL ($t_{44} = 3.381, p < 0.01$; Cohen's $d = 7.822$), although this difference was not evident in male rats (Figure 43).

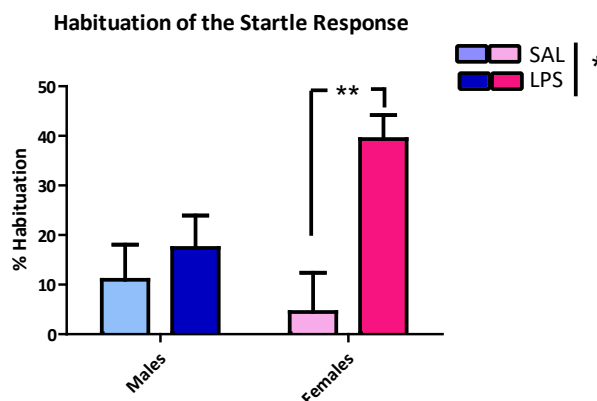


Figure 43.

Percentage habituation of the startle response in the initial and final 'pulse alone' trials. We found a significant effect of Treatment and of the Sex * Treatment interaction, revealing that LPS females experience stronger habituation than their SAL controls: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

We analysed the 120 ms ISI intervals in the second series of PPI assays and found Sex ($F_{(1,28)} = 6.314, p < 0.05$; partial $\eta^2 = 0.184$) and Treatment effects ($F_{(1,28)} = 13.395, p < 0.01$; partial $\eta^2 = 0.324$), but we did not find significant differences due to their interaction ($F_{(1,28)} = 0.159, p = 0.693$) nor did we find significant differences in the other PPI trials. In 12 dB trials: Sex ($F_{(1,28)} = 0.199, p = 0.659$), Treatment ($F_{(1,28)} = 1.520, p = 0.228$) or their interaction ($F_{(1,28)} = 0.069, p = 0.794$). In 8 dB trials: Sex ($F_{(1,28)} = 0.964, p = 0.334$), Treatment ($F_{(1,28)} = 3.787, p = 0.062$) or Sex * Treatment interaction ($F_{(1,28)} = 0.627, p = 0.435$). And last, on 4dB trials: Sex ($F_{(1,28)} = 0.004, p = 0.950$), Treatment ($F_{(1,28)} = 0.360, p = 0.553$) or their interaction ($F_{(1,28)} = 0.662, p = 0.423$).

We also found a significant effect of the Treatment in these animals in the 8 dB trials ($F_{(1,33)} = 4.198, p < 0.05$; partial $\eta^2 = 0.113$), indicating that rats exposed to LPS had weaker PPI in these trials (**Figure 44**). However, we did not find any effect of the Sex ($F_{(1,33)} = 0.127, p = 0.724$) or Sex * Treatment interaction ($F_{(1,33)} = 0.320, p = 0.575$).

We also observed an effect of Sex on the amplitude of the startle response ($F_{(1,36)} = 8.806, p < 0.01$; partial $\eta^2 = 0.197$) with males showing a more robust response than females (MeanMales= 1148.313; SEMMales= 77.450; MeanFemales= 829.760; SEMFemales= 74.330). No significant effects were due to the Treatment ($F_{(1,36)} = 0.084, p = 0.774$) or Treatment * Sex interaction ($F_{(1,36)} = 0.006, p = 0.941$).

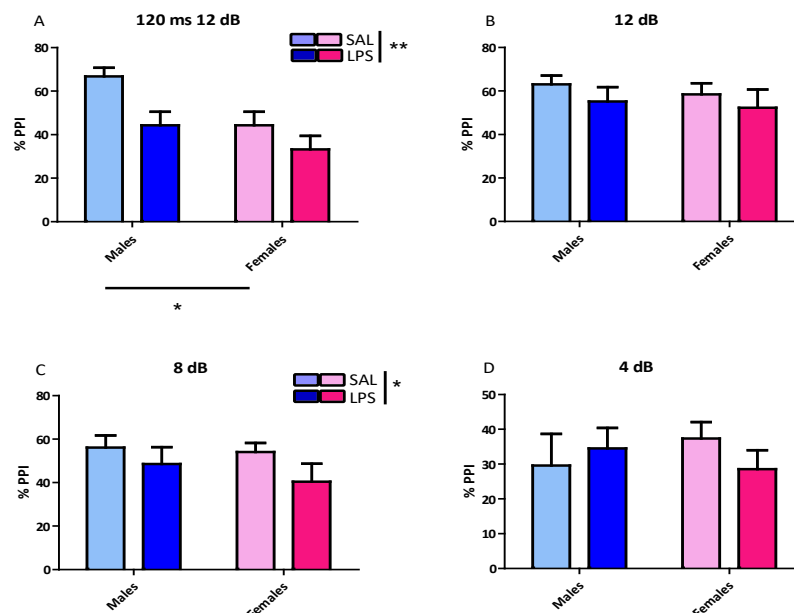


Figure 44.

Percentage prepulse inhibition in the second series of animals. In this round, a new condition was introduced: a 120ms interval between the prepulse and the pulse, and a prepulse intensity of 12 dB. A robust Treatment effect was observed in the new condition, as well as in the 8 dB trials. We also observed that in this newly introduced set of trials females had a weaker PPI than males: * $p < 0.05$ ** $p < 0.05$.

7. Unaltered impulsivity in LPS-exposed offspring.

A significant effect of the Delay factor was found ($F_{(3,39)} = 14.316$, $p < 0.0001$; partial $\eta^2 = 0.589$) showing a lower preference for the large reward as delays increased. A significant difference contrast was evident in all but the second session ($p < 0.05$). There were no differences due to the Treatment ($F_{(1,39)} = 1.244$, $p = 0.308$) or Sex factors ($F_{(1,39)} = 0.325$, $p = 0.859$) or their interaction ($F_{(1,39)} = 0.754$, $p = 0.561$) (**Figure 45 A-B**).

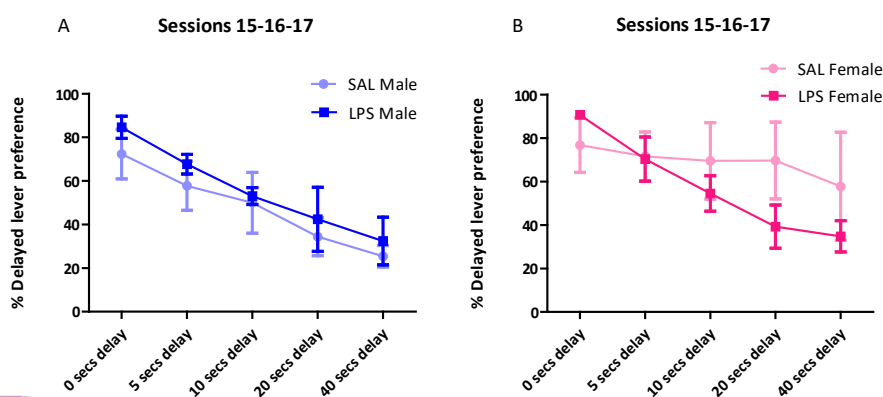


Figure 45.

A) Percentage of delayed lever preference in male rats (SAL or LPS) at 5 delays. **B)** Percentage delayed lever preference in female rats (SAL or LPS) at 5 delays. No significant effects were found.

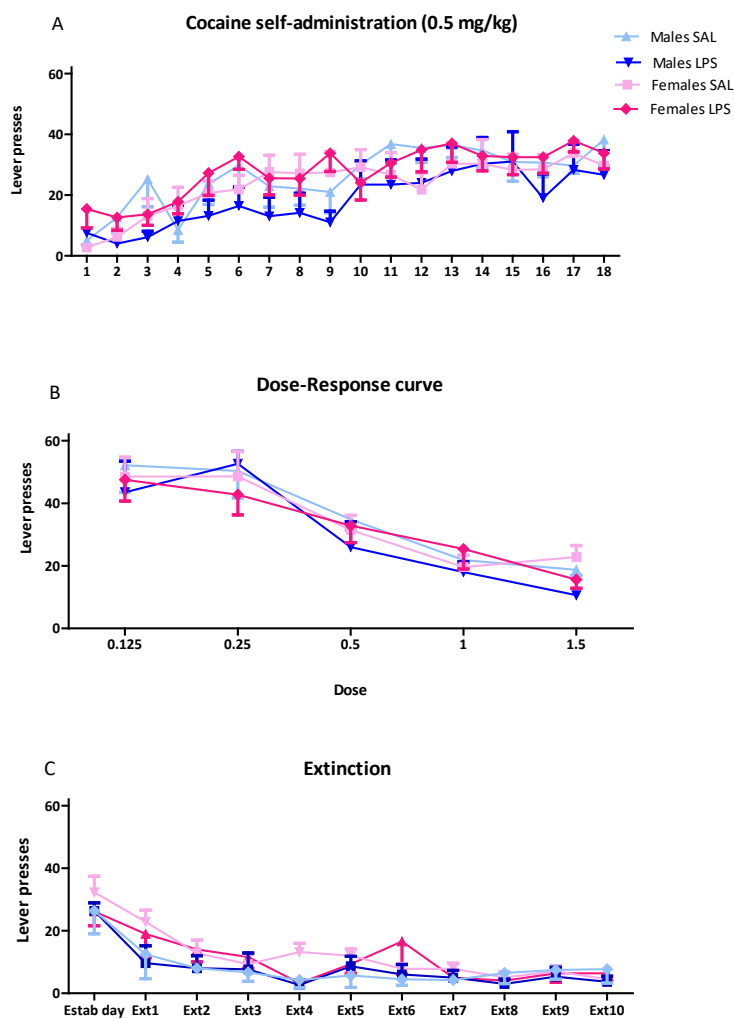
8. No differences were found in cocaine self-administration between treatment groups.

Animals from all the groups successfully acquired COC self-administration behaviour, as witnessed by the significant effect of the Sessions factor ($F_{(17,459)} = 13.439$, $p < 0.0001$; partial $\eta^2 = 0.332$) and the significant *Difference* contrast found from the fifth session onwards ($p < 0.05$). However, there were no significant effects of the Sex * Session ($F_{(17,459)} = 1.101$, $p = 0.349$), Treatment * Session ($F_{(17,479)} = 0.776$, $p = 0.722$) or Sex * Treatment * Session interactions ($F_{(17,479)} = 0.730$, $p = 0.773$). Similarly, no effects of the between subject factors Sex ($F_{(1,14)} = 0.358$, $p = 0.559$) or Treatment ($F_{(1,14)} = 0.004$, $p = 0.952$) were detected, or of the Sex * Treatment interaction ($F_{(1,14)} = 2.569$, $p = 0.131$) (**Figure 46-A**).

With regard to the dose–response curve, rats successfully titrated their COC intake in function of the dose (**Figure 46-B**), as revealed by the significant effect of the Dose factor ($F_{(4,68)} = 31.666$, $p < 0.0001$; partial $\eta^2 = 0.651$), yet with no other significant effects of Dose * Sex ($F_{(4,68)} = 0.643$, $p = 0.633$), Dose * Treatment ($F_{(4,68)} = 0.240$, $p = 0.914$) or Dose * Sex * Treatment interaction ($F_{(4,68)} = 0.617$, $p = 0.652$).

There were no differences during the three stabilization sessions and moreover, after saline substitution the animals progressively extinguished their previously acquired self-administration behaviour (significant effect of the Extinction Sessions factor – $F_{(10,120)} = 17.970$, $p < 0.0001$; partial $\eta^2 = 0.600$ – and significant effects of the *Difference* contrast for each session; $p < 0.05$: **Figure 46-C**). However, we did not find any significant difference of Extinction Sessions * Sex ($F_{(10,120)} = 0.747$, $p = 0.679$) or Extinction Sessions * Treatment ($F_{(10,120)} = 0.491$, $p = 0.893$) or their interaction of the three ($F_{(10,120)} = 0.483$, $p = 0.898$).

Two-way ANOVA did not show a significant effect in cue-induced reinstatement of either the Treatment ($F_{(3,14)} = 0.092$, $p = 0.766$) or Sex factors ($F_{(3,14)} = 2.169$, $p = 0.163$) or their interaction ($F_{(3,14)} = 0.572$, $p = 0.462$) in active lever. And in inactive lever we did not find any difference of Treatment ($F_{(3,14)} = 2.433$, $p = 0.141$), Sex ($F_{(3,14)} = 2.566$, $p = 0.131$) or their interaction ($F_{(3,14)} = 0.003$, $p = 0.956$). (**Figure 46-D**)



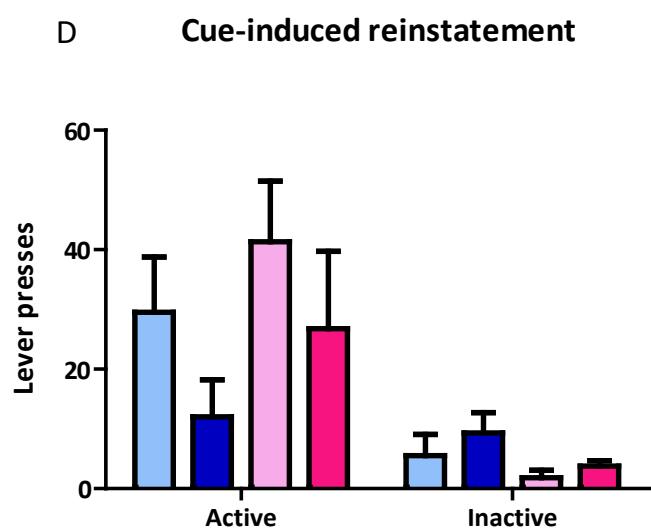


Figure 46.

Cocaine self-administration. **A)** The figure shows the number of active lever presses in the acquisition phase under a FR1 schedule. No differences were found in cocaine self-administration at a dose of 0.5 mg/kg according to sex or treatment. **B)** Average number of active lever presses on each of the three days at each dose. Animals modulated their cocaine intake according to the dose available, yet there was no effect on Treatment or Sex. **C)** Number of active lever presses during extinction. Animals progressively decreased their seeking behavior over the extinction sessions but no significant effect of Sex or Treatment was seen. **D)** Number of active and inactive lever presses in cue-induced reinstatement. No differences were found due to Sex or Treatment.

Conclusions

The adoption of the protocol used in the Boksa lab along with the use of the Sprague-Dawley strain, together with the introduction of a new PPI trial type (described by Wirschow et al., 2015) seems to have been a successful approach to obtaining a stable schizophrenia-like condition in the adult offspring. We also verified the effectiveness of this way of administration and dose of LPS in eliciting the immune response as indicated by the elevation of $\text{TNF}\alpha$ and the decrease in body weight in the pregnant rats after the injection.

Regarding the open field test we found that males were less anxious than females but no effects due to LPS-exposure in utero were found here or in the social interaction test. It seems therefore that LPS is not associated with the development of negative symptoms in this animal model at least not as measured with these tests.

In T maze and PPI we also obtained significant treatment effects indicating alterations in working memory and attentional processes related to cognitive and positive symptoms, respectively. However, we did not find differences in impulsive behaviour.

Finally, the results showed in self-administration of COC was not different between treatment groups. Therefore, rats exposed to LPS during prenatal development did not show greater vulnerability to the reinforcing effects of COC.

Discusión



Capítulo I. *Rattus Norvegicus* Wistar

En este primer capítulo se discuten los resultados obtenidos en los tres diferentes estudios. Mientras que los dos primeros estudios, como se describió anteriormente, mantienen el mismo diseño experimental, el tercero se realizó únicamente para validar los resultados poco consistentes encontrados en la prueba de PPI.

Los primeros resultados de este capítulo hacen referencia a la temperatura y peso materno medido a lo largo de la etapa gestacional, donde en ningún caso se obtuvieron diferencias debidas al tratamiento. Los efectos de MIA parecen depender de una manera muy crítica de los cambios que en la temperatura y el peso corporales aparecen tras la exposición a LPS. Diversos autores han encontrado una respuesta febril tras la inyección de la endotoxina que está mediada por un aumento de citoquinas, principalmente IL1 β . De hecho, un estudio ha demostrado cómo el incremento de IL1 β ra en ratas gestantes es capaz de mediar los efectos febriles, mediante la modulación de la proteína ciclooxygenasa-2, en comparación con las hembras que presentan su ciclo estral (Ashdown, Poole, Boksa, & Luheshi, 2007). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron diferencias entre los dos grupos en la temperatura medida después de cada inyección de LPS. Esto puede ser debido, en primer lugar, al tratamiento, ya que en nuestro caso las inyecciones se realizaron en días alternos, como un tratamiento crónico subcutáneo a lo largo de la gestación, en comparación con la mayoría de estudios donde la administración de LPS se realiza intraperitonealmente y solo en uno o dos días del periodo gestacional. Esto nos lleva a pensar que la ausencia de fiebre podría ser mediada por un efecto de la tolerancia en el tratamiento crónico de LPS. En el estudio realizado por O'Reilly et al., 1988, únicamente se obtuvieron diferencias significativas en comparación con los controles después de la primera infusión de LPS, volviendo a niveles basales de temperatura en las infusiones posteriores en el tratamiento crónico de LPS (O'Reilly, Vander, & Kluger, 1988). Por otro lado, el tiempo que transcurre desde la dosis de LPS hasta la medición de la temperatura podría estar influyendo en la falta de resultados positivos. En la mayoría de estudios la temperatura se suele medir a partir de las 2 h, tiempo que además se corresponde con el aumento de los valores de las citoquinas que están implicadas en la respuesta febril (Ashdown et al., 2006; Lowe, Luheshi, & Williams, 2008; Urakubo et al., 2001). Sin embargo, en nuestro estudio la medición se realizó una hora después, tiempo que parece no ser suficiente para observar estos cambios en la temperatura.

Diferentes estudios han demostrado que tras la administración de LPS el peso de los animales se encuentra disminuido (Arsenault, St-Amour, Cisbani, Rousseau, &

Cicchetti, 2014; Liu, Li, Chen, Zhang, & Kang, 2015; Moraes et al., 2017; Strassmann, Fong, Windsor, & Neta, 1993). Sin embargo, nosotros no encontramos diferencias entre los tratamientos en el peso materno, ni se observó la pérdida de peso asociada a la hipofagia característica de la administración de LPS. Estas discrepancias podrían ser debidas tanto a la concentración como a la vía de administración. Si bien es cierto que la mayoría de investigaciones realizan una administración ip de LPS, en el presente estudio se realizó por vía sc. En cuanto a la dosis, parece ser que 1 mg/kg debería ser suficiente para producir efectos en el peso materno. De hecho, un estudio muestra que a mayor dosis administrada de LPS la disminución del peso también es mayor (Banks et al., 2015). Por último, el tipo de tratamiento también podría estar afectando a estos resultados. En la mayoría de estudio, el LPS es administrado como un desafío en una o dos dosis a lo largo de la gestación. Sin embargo, en nuestro estudio se realizó durante todo este periodo, por lo que cabe suponer que la respuesta inmune materna no fuese tan acentuada, aunque debería haberse mostrado alguna diferencia en los primeros días.

Los pacientes con esquizofrenia desarrollan alteraciones en la atención y déficits en el procesamiento de información sensorial. El PPI es un ejemplo importante de la conducción sensoriomotora que ocurre en el cerebro y es un mecanismo que se interrumpe en individuos con esquizofrenia, aunque tal alteración puede revertirse con antipsicóticos atípicos (Van den Buuse, Garner, & Koch, 2003). Esta alteración en la respuesta de sobresalto ha sido documentada en pacientes esquizofrénicos (Veena Kumari, Aasen, & Sharma, 2004; Ludewig, Geyer, & Vollenweider, 2003) y en crías de ratas o ratones, cuyas madres fueron sometidas a la administración de LPS o Poli I:C (Borrell et al., 2002; M. E. Fortier et al., 2007; E Romero, Guaza, Castellano, & Borrell, 2010; Shi, Fatemi, Sidwell, & Patterson, 2003; Zuckerman & Weiner, 2003).

En el primer estudio de este capítulo los resultados en el PPI fueron concordantes con los estudios que se han presentado anteriormente. De este modo, los animales que fueron tratados prenatalmente con LPS mostraron una disminución en la respuesta de sobresalto. Además, estas diferencias fueron obtenidas en los parámetros donde los dB del prepulso fueron más altos (16 dB, por encima del ruido de fondo) independientemente de los ms en que se presentó el prepulso. Pese a obtener datos que apuntan a una alteración en la respuesta de sobresalto nuestros resultados no son del todo concordantes con otros estudios, donde se observaron diferencias en el PPI con dB comprendidos entre 4 y 12 (M. E. Fortier et al., 2007; E Romero et al., 2010). De hecho, parece que las diferencias entre las frecuencias entre el prepulso y el ruido de fondo y la intensidad del último son variables muy críticas para el PPI (Basavaraj & Yan, 2012).

No obstante, en la segunda cohorte de animales, los correspondientes al estudio 2, estos efectos en el PPI no aparecieron y además curiosamente mostraron un patrón inverso al obtenido en el estudio 1, mientras que en el primer caso los animales LPS mostraron inhibición prepulso, en este segundo estudio apareció el fenómeno de la facilitación por prepulso. Ante estos resultados discrepantes encontrados en las dos cohortes de animales se decidió hacer un tercer estudio, que únicamente se encargaría de verificar la orientación de estos resultados en el PPI. Asimismo, se tomó la decisión de realizar una medición más en un punto temporal más avanzado, el PD 120, por si el efecto de la edad del animal pudiese estar influyendo en los resultados contradictorios y esta respuesta fuese más estable en la etapa adulta. En este tercer estudio, los resultados del PPI fueron encaminados a replicar la tendencia obtenida en el estudio 2, mostrando los animales LPS un mayor porcentaje de inhibición prepulso que los SAL en el PD 90 y no se obtuvieron diferencias en el PD 120.

La explicación de estos resultados parece ir en contra de toda la bibliografía estudiada y además no pueden ser explicados ni por la dosis de LPS ni por los días de administración en la etapa gestacional. Por ejemplo, el estudio de Borrell et al., 2002, muestra una disminución en los animales tratados con LPS prenatalmente en el PPI desde el PD 60 hasta el PD 300 bajo las mismas condiciones que nuestro estudio, hay que recordar que este fue el protocolo que se utilizó para inducir MIA aunque el protocolo del PPI no es el mismo. Aunque en el trabajo citado se utiliza una intensidad similar en los dB del prepulso, como se ha descrito anteriormente hay otras investigaciones que han comprobado estos efectos utilizando menores dB que los utilizados en este estudio. Sin embargo, el incremento de dB por encima del ruido de fondo parece ser una variable crítica en los efectos de esta respuesta. En el siguiente estudio se encontró como los dB más bajos (3-6 dB, por encima del ruido de fondo) producían una respuesta de facilitación por prepulso mientras que con 12 dB no se encontraron diferencias entre los tratamientos en la respuesta de PPI (Howland et al., 2012).

Quizá la mejor explicación a la poca consistencia en los resultados entre las diferentes cohortes de animales podría ser la cepa utilizada. Aunque en este estudio los experimentos fueron realizados con la misma cepa que Borrell et al., 2002, se han encontrado distintos estudios que muestran una mayor vulnerabilidad genética dependiente de la cepa en este reflejo de sobresalto. De este modo, al comparar las ratas Wistar con otras cepas, la primera parece mostrar mayor variabilidad en el PPI (Farid, Martinez, Geyer, & Swerdlow, 2000; Hince & Martin-Iverson, 2005; Swerdlow et al., 2000), dependiendo incluso de los proveedores comerciales.

En la autoadministración de comida cabía esperar diferencias significativas entre los tratamientos ya que diferentes estudios muestran que el LPS es capaz de disminuir la motivación hacia los reforzadores naturales como es la comida (Bret-Dibat, Bluthe, Kent, Kelley, & Dantzer, 1995; Kent, Bret-Dibat, Kelley, & Dantzer, 1996). Sin embargo, no observamos diferencias entre los tratamientos en ninguna de las fases de la autoadministración de comida (adquisición, razón fija 5, razón progresiva y extinción). La diferencia principal entre este estudio y el resto de bibliografía al respecto es que nosotros administramos LPS en la gestación mientras que el resto administran LPS en la etapa adulta ya sea mediante un tratamiento agudo o crónico. Por este motivo, se considera que los efectos que median la falta de motivación producida por el LPS podrían diluirse con el tiempo.

A nuestro entender, este es el primer estudio para evaluar la acción reforzante de una droga a través de un paradigma de autoadministración intravenosa en el modelo MIA para la esquizofrenia. Las causas potenciales de la mayor prevalencia de TUS en la población esquizofrénica siguen siendo un tema de debate y el uso de modelos animales es fundamental para proporcionar una respuesta clara a esta cuestión. Sin embargo, no cabe ninguna duda que algunas de las alteraciones neurobiológicas encontradas en la esquizofrenia son compartidas por el TUS, especialmente el sistema mesolímbico dopaminérgico. La hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia propone que los síntomas del trastorno son debidos a una hiperactivación en las proyecciones dopaminérgicas del NAcc mientras que en las del CPf se presenta una hipoactivación (K. L. Davis, Kahn, Ko, & Davidson, 1991; Deutch, 1993; Goldstein & Deutch, 1992). Además esta hiperactivación dopaminérgica en el NAcc provoca una desregulación glutamatérgica cortical, lo que ha sido observado en las neuroadaptaciones que son inducidas por el abuso crónico de sustancias (Self & Nestler, 1998; White & Kalivas, 1998). La gran mayoría de los *output* de las neuronas del NAcc descienden por proyecciones GABAérgicas hasta el VP y otras estructuras talamocorticales que se encargan del pensamiento, la planificación premotora, la motivación y el movimiento (C. R. Yang & Mogenson, 1985). De este modo, la hiperactivación dopaminérgica en el NAcc podría disminuir el flujo GABAérgico en dichas estructuras, lo que traduciría la motivación en acción conductual (Lavin & Grace, 1994). Por otro lado, las proyecciones glutamatérgicas del Hp al NAcc son capaces de modular la liberación de DA en esta estructura, ya sea mediante proyecciones subiculares del Hp a la CPf o al VP, que a su vez proyectan a la VTA (Legault, Rompre, & Wise, 2000; Todd & Grace, 1999). Por tanto, las alteraciones hipocampales encontradas en los pacientes esquizofrénicos podría aumentar la eficacia del refuerzo a las drogas al interferir sobre el control inhibitorio con un comportamiento compulsivo de búsqueda de recompensas (R Andrew Chambers et al., 2001).

Para comprobar si existe una vulnerabilidad en los pacientes esquizofrénicos al abuso de drogas se ha utilizado un modelo que reproduce condiciones similares a la esquizofrenia con una fuerte validez traslacional, como MIA, y el paradigma de autoadministración para emular el consumo humano de drogas en animales.

Los resultados en la autoadministración de COC parecen mostrar la misma tendencia que en el caso del PPI. Mientras que en el estudio 1 se obtuvieron diferencias entre los tratamientos en la fase de adquisición, mostrando una mayor tasa de respuesta en la palanca activa en los animales LPS, en el estudio 2 estas diferencias no fueron replicadas bajo las mismas condiciones.

Aunque en el estudio 1 solamente se pudo realizar la estadística en la fase de adquisición debido a la pérdida experimental en la fase de mantenimiento, la tendencia en las fases revela que el grupo tratado prenatalmente con LPS consume más COC en comparación con el grupo control. Sin embargo, en el estudio 2 esta tendencia se invierte y durante las dos fases los animales LPS parecen consumir menos COC que el grupo SAL.

Otros estudios que han utilizado el paradigma de la autoadministración para estudiar los efectos reforzantes de las drogas ponen de manifiesto que tanto la dosis como el protocolo que nosotros utilizamos son suficientes para generar estos efectos en distintas cepas de ratas. Si bien es cierto que a lo largo de la bibliografía disponible se encuentran diferencias entre los tratamientos dependiendo de la dosis, duración de la sesión y cepa, todos los animales parecen administrarse COC en una tasa suficiente para considerar los efectos adictivos de la sustancia (Mandt, Copenhagen, Zahniser, & Allen, 2015; Wee, Specio, & Koob, 2007). Así pues, el protocolo de MIA proporcionado por Borrell et al., 2002, que fue utilizado en el primer capítulo de esta tesis, tampoco fue capaz de generar resultados consistentes en la autoadministración de COC, al igual que ocurrió en el PPI. Por otro lado, tampoco se han encontrado otros trabajos que hayan utilizado este protocolo de MIA ya sea para estudiar el fenotipo esquizofrénico o la patología dual. De hecho, en los estudios posteriores realizados en este grupo de investigación no se volvió a utilizar este mismo protocolo y en su lugar se aumentó la dosis de LPS hasta 2 mg/kg, administrando la endotoxina diariamente (E Romero et al., 2010; Eva Romero et al., 2007).

Capítulo II. *Rattus Norvegicus Lewis*

En este segundo capítulo decidimos cambiar el protocolo para inducir la activación maternal inmune debido a los resultados inconsistentes obtenidos en el capítulo 1, en concreto en la prueba de PPI.

En cuanto al peso materno durante la administración de LPS tampoco se observaron diferencias con el nuevo protocolo. La explicación de estos resultados podría encaminarse a la expuesta anteriormente (ver capítulo 1) debido a que la administración de LPS se realizó durante toda la gestación (en este caso el tratamiento fue diario).

Como ya se ha comentado, el PPI es una prueba conductual muy relevante para dictaminar el fenotipo esquizofrénico en los modelos animales de esquizofrenia. En este segundo capítulo obtuvimos diferencias entre los tratamientos pero estos resultados también fueron contradictorios. Mientras que en el parámetro PPI120_16 los datos apoyan la bibliografía existente, de nuevo nos volvemos a encontrar el fenómeno de la facilitación por prepulso en el PPI120_8. Si nos remitimos a los trabajos realizados por Romero et al., se puede observar cómo en estas investigaciones llevadas a cabo con el mismo protocolo de MIA, se obtienen diferencias en el PPI entre los tratamientos bajo diferentes condiciones e incluso en los dos sexos. En el primer estudio, realizaron el PPI en el PD 150, edad similar a la que se utilizó en este estudio, y con una intensidad del prepulso de 10 dB, obteniendo diferencias entre los animales tratados con LPS prenatalmente y sus controles (Eva Romero et al., 2007). Además, en un estudio posterior llevado a cabo con hembras y machos observaron diferencias entre los tratamientos y sexos con 6 y 12 dB (por encima del ruido de fondo) en el prepulso a partir del PD 70 hasta el PD 400 (se realizaron mediciones en el PD: 28, 35, 70, 170 y 400), a excepción de las hembras cuando fueron testadas con la intensidad de 6 dB donde sólo se obtuvieron diferencias en el PD 35 y PD 400 (E Romero et al., 2010)

Nuevamente nos encontramos con la dificultad de dar explicación a estos resultados ya que, como en el capítulo anterior hay bibliografía que avala resultados significativos para el PPI utilizando tanto la misma dosis como el mismo tratamiento de LPS. En este caso, se utilizó una cepa diferente a la Wistar ya que como se discutió con anterioridad esta cepa muestra mayor variabilidad en el PPI. Aun así, los resultados siguen mostrando cierta inconsistencia en la prueba que determina el fenotipo esquizofrénico. Por tanto, como en el capítulo anterior, estos resultados llevan a plantearnos un cambio en el modelo de MIA.

El paradigma de autoadministración de COC en este capítulo consistió en distintas fases. Aunque la dosis se mantuvo en 0.5 mg/kg, los días en la fase de adquisición se prolongaron hasta 24 para obtener una tasa de respuesta más estable en comparación a la que se presentó en el capítulo anterior. También se realizó una curva dosis-respuesta donde podríamos observar la dosis más eficaz para lograr los efectos reforzantes de la droga, una fase de razón progresiva en la cual se mediría la motivación que presentan estos animales para conseguir la droga, una etapa de extinción que nos informa de la resistencia en el cese del consumo y por último la recaída inducida por claves.

Como en el capítulo anterior, cabía esperar que los animales con el fenotipo esquizofrénico mostrasen una mayor vulnerabilidad en la autoadministración de COC debido a las alteraciones en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico que están presentes en la esquizofrenia (ver discusión capítulo 1). Sin embargo, aunque los animales adquirieron una tasa estable en el consumo no se observaron diferencias en ninguna de las fases explicadas anteriormente. Por tanto, los animales tratados con LPS en la etapa gestacional no presentaron mayor vulnerabilidad a la COC, ni tampoco mostraron mayor motivación por la droga o una persistencia a la búsqueda de la misma en la extinción. En este caso, tampoco se puede poner en duda si la dosis fue adecuada ya que al realizar la curva dosis-respuesta tampoco se obtuvieron diferencias entre los tratamientos. Sin embargo, un reciente artículo revela que existen ventanas de vulnerabilidad en la etapa gestacional que determinan la búsqueda de recompensas. En ese estudio se observa que los animales tratados prenatalmente con LPS en el GD 12 muestran esta conducta alterada, mientras que los que fueron administrados en el GD 16 no exhibieron dichas alteraciones (Straley et al., 2016).

Los últimos experimentos realizados en este capítulo fueron encaminados al conocimiento de posibles biomarcadores para el trastorno esquizofrénico. Debido a cuestiones éticas y metodológicas, la mayoría de estudios clínicos orientados a estos objetivos han realizado mediciones de citoquinas, hormonas y neurotransmisores en sangre periférica. Aunque la bibliografía es amplia en estudios clínicos no se han encontrado demasiados estudios realizados en laboratorios con modelos animales para dar respuesta a esta cuestión.

Muchos estudios clínicos han encontrado diferencias en los niveles de citoquinas en pacientes esquizofrénicos y cómo estos niveles correlacionan tanto con el diagnóstico del trastorno, la severidad de los síntomas o la respuesta al tratamiento (de Witte et al., 2014; Freudenreich et al., 2010; Loffler et al., 2010; Swiergiel & Dunn, 1999). Sin embargo, en nuestro estudio preferimos centrarnos en medir las variaciones en

las distintas poblaciones de las células inmunes y los receptores dopaminérgicos, en concreto D3 y D5, debido a la importancia que tiene esta vía de neurotransmisión en la etiopatogenia de la esquizofrenia y la implicación de estos receptores en los estudios clínicos de biomarcadores realizados en pacientes esquizofrénicos (Buttarelli, Fanciulli, Pellicano, & Pontieri, 2011). Además, también se pretendió estudiar si el sistema endocannabinoide podría actuar como un posible biomarcador para este trastorno. En los últimos tiempos cada vez existe mayor bibliografía que avala las relaciones existentes entre este sistema y la esquizofrenia, de hecho la activación de este sistema produce la liberación de citoquinas circulantes y de distintos neurotransmisores, entre ellos la DA (Foster et al., 2016; Kucerova, Tabiova, Drago, & Micale, 2014).

En esta tesis no se encontraron diferencias producidas por el LPS en cuanto al número en las diferentes poblaciones celulares (linfocitos, granulocitos y monocitos). Sin embargo, estudios clínicos han mostrado cómo los niveles de la población de linfocitos T y monocitos se encuentran aumentados en los pacientes esquizofrénicos, crónicos y agudos, sin observar diferencia en los linfocitos B (Cazzullo et al., 1998; Drexhage et al., 2011). Por tanto, cabe pensar que existe una sobreactivación del sistema inmune que es independiente de los estadios del trastorno. No obstante, queda por clarificar si esta sobreactivación es propia del trastorno esquizofrénico o puede ser compartida por otros trastornos, ya que se han encontrado resultados similares en pacientes con trastorno bipolar (Sourlingas et al., 2003). Una posible explicación podría ser que nuestro modelo de MIA tiene una fuerte validez de apariencia, consiguiendo una sintomatología específica del trastorno. Sin embargo, hay otros estudios que muestran que el tratamiento para el trastorno bipolar (litio) es capaz de revertir los efectos inflamatorios producidos por el LPS mediante la implicación del TLR4 (N. Li et al., 2016; Wieck et al., 2016).

En cuanto a los estudios clínicos que presentan resultados para los receptores dopaminérgicos en las células inmunes parece haber mayor controversia. Varios estudios muestran aumentos en el ARNm de los D3R en linfocitos en pacientes esquizofrénicos (Boneberg et al., 2006; Ilani et al., 2001), sin embargo otro de ellos, aparte de encontrar estos niveles disminuidos, también encuentra estos resultados en pacientes con trastorno bipolar (Vogel et al., 2004).

En nuestro estudio encontramos que los niveles de D3R se encontraron disminuidos en los granulocitos en los animales LPS, sin encontrar ningún cambio en los D5R. A este respecto cabe resaltar que los receptores dopaminérgicos no se distribuyen de la misma manera en todas las células inmunes. Así parece que la mayor expresión de estos receptores se encuentra en los linfocitos y además esta expresión

es dependiente del subtipo de receptor dopaminérgico, siendo D3R y D5R los más estables en las diferentes poblaciones (McKenna et al., 2002; Santambrogio, Lipartiti, Bruni, & Dal Toso, 1993). Sin embargo, en los pacientes esquizofrénicos, esta reducción en la expresión de los D3R se ha encontrado durante el síndrome paranoide y alucinatorio en este trastorno (Vogel et al., 2004). Además, los niveles reducidos de D3R están relacionados con una disminución de los niveles de BDNF y también parecen mediar la síntesis de DA inducida por $\text{TNF}\alpha$, lo que podría explicar este desequilibrio homeostático de los subtipos de receptores dopaminérgicos donde los D2R parecen tener una preponderancia funcional (Vogel, Busse, Freyberger, & Jo, 2006).

Por último, en el receptor de CB2 encontramos una tendencia en aumento en los linfocitos. Contradictoriamente, los estudios clínicos han revelado que los niveles de expresión de este receptor están disminuidos en las PBMC tanto en los primeros brotes de los pacientes como en los crónicos (Bioque et al., 2013; Ferretjans et al., 2014). Sin embargo, estos resultados únicamente aparecen en los pacientes que tuvieron un consumo previo de cannabis o estaban en tratamiento. Por tanto, puede ser que el tratamiento prenatal con LPS genere una subexpresión de estos receptores en los linfocitos que es revertida con tratamiento, la cual podría estar mediando los efectos inflamatorios de las citoquinas. De hecho un estudio ha revelado, que la inhibición en la degradación de los endocannabinoides incrementa los niveles de $\text{TNF}\alpha$ inducidos por el LPS (Roche, Kelly, Driscoll, & Finn, 2008). Aun así, sería interesante el desarrollo de ensayos clínicos donde se mida este receptor en distintas células inmunes en pacientes que no han sido expuestos a ningún tratamiento con antipsicóticos.

Pese a haber obtenido algunos resultados interesantes en este último experimento, estos datos deben tomarse con cautela debido a que como se podrá recordar con este modelo de MIA los resultados del PPI volvieron a mostrar ciertas contradicciones.

Por tanto, en el tercer capítulo se puso a prueba un nuevo modelo de activación prenatal inmune, en el cual se modificaron la mayoría de los parámetros y se añadieron otras pruebas conductuales que nos ayudasen a confirmar este fenotipo en las crías administradas con LPS en la gestación.

Capítulo III. *Rattus Norvegicus* Sprague Dawley

En este último capítulo el modelo que se utilizó para conseguir la activación maternal fue el descrito por Fortier et al., 2007. La elección de este protocolo vino determinada por ser uno de los más validados en los modelos de MIA.

Con el fin de verificar la activación inmunológica y el estado sintomático concomitante inducido por la exposición a LPS se midieron algunos índices típicamente afectados cuando se administró endotoxinas a ratas (GD 15 y GD 16). En primer lugar, observamos la típica falta de aumento de peso como consecuencia de la hipofagia inducida por LPS en el GD 15. La hipofagia inducida por LPS parece comenzar 4 h después de la administración y dura 24 h (Ribeiro et al., 2013; Rorato, Reis, de Carvalho Borges, Antunes-Rodrigues, & Elias, 2012), al igual que la reducción asociada en el aumento de peso corporal (Ribeiro et al., 2013). En nuestro estudio, este efecto duró 24 h, aunque también hubo una tendencia a persistir hasta 2 días después de la última inyección de LPS. También se observó una respuesta hipotérmica típica en el GD 15 dos horas después de la administración de LPS, que es la primera respuesta del organismo a la endotoxina mientras que la fiebre parece desarrollarse posteriormente (Tollner et al., 2000). Esta respuesta hipotérmica al LPS depende de la temperatura ambiente (Derijk, Van Kampen, Van Rooijen, & Berkenbosch, 1994) y del TNF α circulante (Tollner et al., 2000). En consecuencia, se encontró un aumento significativo en los niveles plasmáticos de esta citoquina en ratas preñadas después de la inyección de LPS, en concordancia con otros estudios ya comentados (Ashdown et al., 2006; Urakubo et al., 2001). Sin embargo, no se detectó este aumento del TNF α en el líquido amniótico, mientras que otro estudio revela un rápido aumento de TNF α detectado en este tejido 1 h después de la inyección de LPS a la misma dosis detectada (Gayle et al., 2004). Las razones de esta discrepancia no son claras ya que se usó el mismo serotipo, dosis y vía de administración de la endotoxina, y los kits de ELISA tenían sensibilidad y variabilidad intra e interensayo similares. Es interesante observar que una dosis de 0.5 mg/kg de LPS no produjo un aumento del TNF α en el líquido amniótico (Urakubo et al., 2001). Además, aunque se ha informado que el TNF α placentario aumenta después de la exposición a LPS (Ashdown et al., 2006; Gayle et al., 2004; Urakubo et al., 2001), este aumento no se replicó aquí. Tampoco se encontró ningún aumento en el TNF α fetal por LPS, lo que es coherente con las investigaciones previas (Ashdown et al., 2006; Urakubo et al., 2001) y que sugieren que las anomalías del desarrollo inducidas por la exposición prenatal a LPS no se deben a los efectos directos de la citoquina en el cerebro fetal. Este hecho está de acuerdo con la falta de paso de LPS a través de la barrera placentaria. Por lo tanto, la endotoxina podría ejercer efectos indirectos (quizás a través de alteraciones en la

función placentaria: Ashdown et al., 2006) que finalmente resultarían en disfunciones del cerebro fetal en el desarrollo. Cabe resaltar la necesidad que presenta la comunidad científica en confirmar si estas alteraciones en las citoquinas persisten en la etapa postnatal o incluso en la etapa adulta (Scola & Duong, 2017).

Dado que la inyección intraperitoneal de LPS en nuestro modelo provoca una respuesta inflamatoria y síntomas físicos típicos de la activación inmunitaria, investigamos los efectos a largo plazo en la descendencia, buscando un posible dimorfismo sexual en la memoria de trabajo, interacción social, PPI y especialmente en la autoadministración de COC.

El deterioro cognitivo en la esquizofrenia es clave en la sintomatología del trastorno (Elvevag & Goldberg, 2000), con los déficit de memoria de trabajo desempeñando un papel fundamental. Varios modelos de esquizofrenia en el neurodesarrollo, incluyendo aquellos que usan MIA, han revelado déficits cognitivos específicos que incluyen alteraciones en la memoria a corto plazo (Connor et al., 2012; Wischhof, Irrsack, Osorio, et al., 2015). En este capítulo utilizamos el laberinto en T para evaluar la memoria de trabajo (intervalo entre ensayos: 3 min), mostrando que los animales expuestos a LPS desempeñan la tarea en el nivel de azar. Además, las hembras parecen tener un desempeño peor que los machos cuando se exponen a LPS (50% y 62% de los animales muestran alternancia en cada grupo, respectivamente). Otros estudios han mostrado que los ratones expuestos prenatalmente a Poli I:C también presentan una memoria de trabajo deteriorada en el laberinto de agua de Morris (intervalo entre ensayos: 60s) (Meyer, Knuesel, Nyffeler, & Feldon, 2010). Estas deficiencias de comportamiento pueden atribuirse a la disminución de la plasticidad sináptica del Hp observada en ratas nacidas de las madres expuestas a LPS (Escobar et al., 2011) o a la disminución de la longitud y densidad de la columna dendrítica del Hp evidentes en estos animales (Baharnoori et al., 2009).

Los trastornos de ansiedad parecen ser muy frecuentes en los pacientes esquizofrénicos, aunque esto no siempre es claro (Achim AM, Maziade M, Raymond E, Olivier D, Mérette C, 2011). En los modelos de MIA, las ratas (Lin & Wang, 2014) y los ratones (Babri, Doosti, & Salari, 2014; Depino, 2015) expuestos a LPS mostraron un comportamiento aumentado de ansiedad en el *open field*, aunque estos resultados pueden estar influenciados por la edad y el sexo (H. Wang et al., 2010) y, por lo tanto, algunos factores críticos pueden determinar el efecto de la ansiedad en esta prueba en otros estudios (Foley, Macfabe, Vaz, Ossenkopp, & Kavaliers, 2014; H. Wang et al., 2010), tales como la edad de los animales en las pruebas, la dosis de LPS o las especies utilizadas.

En nuestro estudio los resultados del *open field* muestran que las ratas hembras (independientemente de su tratamiento prenatal) mostraron un comportamiento más ansioso en el *open field* (menos tiempo en el área central) que las ratas macho. Existe un acuerdo general en la literatura de que los roedores machos tienden a mostrar mayor ansiedad que sus homólogos femeninos en varias pruebas de comportamiento (para una revisión reciente ver Kokras & Dalla, 2014), incluyendo el *open field*. Sin embargo, esta prueba no refleja la diferencia sexual real que se observa típicamente en los seres humanos, donde las mujeres muestran más problemas relacionados con la ansiedad que los hombres. Por otra parte, es una prueba que también está fuertemente influenciado por las diferencias en la actividad locomotora, que se potencia en los ratones hembra, pero no en los machos expuestos al LPS (H. Wang et al., 2010), y que podría haber contribuido al efecto general del sexo que se presenta en esta tesis. Además, las ratas hembra en diestro son más ansiosas que las hembras en otras fases del ciclo estral o los machos (Dominguez, Cruz-Morales, Carvalho, Xavier, & Brandao, 2003; Marcondes, Miguel, Melo, & Spadari-Bratfisch, 2001). Aunque no pudimos controlar el ciclo estral de nuestras ratas (realizar un frotis vaginal después de la prueba del *open field* podría haber confundido los resultados de la prueba de interacción social que se llevaría a cabo más adelante), algunas, si no la mayoría, de las ratas hembra podrían haber estado en diestro en el momento del test, contribuyendo al efecto principal del sexo que encontramos.

La esquizofrenia suele asociarse con déficit en las interacciones sociales, constituyendo el núcleo del grupo de síntomas negativos. Nuestros resultados no revelaron alteración alguna producida por administración de LPS en ninguno de los índices examinados, replicando los resultados de un reciente estudio donde se usó la misma dosis que la empleada aquí (Batinic et al., 2016). Sin embargo, parece existir una mayor interacción social de los descendientes adultos cuando se usó LPS como inmunógeno durante la gestación (Harvey & Boksa, 2014; Hava et al., 2006), aunque con una dosis más débil que la utilizada en nuestro estudio (50 µg/kg frente a la dosis moderada de 100 µg/kg). Además, esta interacción social mejorada se observó en ratones y no en ratas, tratando a los animales en GD 17. No obstante, cabe resaltar que existen algunas diferencias en los comportamientos que se incluyen en la categoría de “interacción social” entre estos estudios. Aunque sutiles, estas diferencias podrían ayudar a explicar los distintos resultados obtenidos. Por otro lado, otros estudios han mostrado que la exposición prenatal a Poli I:C disminuyó las interacciones sociales en los animales adolescentes, aunque fueron normalizadas en la edad adulta (Aavani, Rana, Hawkes, & Pittman, 2015; Hsiao et al., 2013). Por lo tanto, los efectos de MIA en la conducta social parecen ser dependientes de la dosis específica, la especie probada y la edad en la que se analiza el comportamiento.

Como ya se ha comentado en los anteriores capítulos, existe un amplio consenso en la literatura de que el PPI se altera en los modelos de MIA de la esquizofrenia (Boksa, 2010; M. E. Fortier et al., 2007; Ozawa et al., 2006; Wischhof, Irrsack, Osorio, et al., 2015). Nuestros resultados también presentan una interrupción similar en ratas macho y hembra, pero sólo cuando se utilizó un intervalo de 120 ms entre el prepulso y el pulso, y con un prepulso 12 dB por encima del ruido de fondo. Utilizando el intervalo más largo de 120 ms hace que sea más difícil detectar el prepulso y, por lo tanto, hemos aumentado la carga cognitiva en los animales para revelar algunos déficits que de otro modo podría haber permanecido oculto, adoptando este enfoque de un estudio anterior al nuestro que produjo resultados similares (Wischhof, Irrsack, Osorio, et al., 2015). Este deterioro de PPI en ratas macho y hembra expuestas prenatalmente a LPS proporciona pruebas adicionales en favor de una sintomatología esquizofrénica inducidos por la MIA. A nuestro entender, este es el primer estudio en el que se observa una habituación de la respuesta de sobresalto en las hembras expuestas a LPS. Curiosamente, este efecto estuvo presente sólo en la primera serie de experimentos, quizás debido al gran tamaño de muestra utilizado o al tipo de ensayo de reciente introducción utilizado en la segunda serie de experimentos. La habituación es una forma simple de aprendizaje y algunas evidencias sugieren que está interrumpida en la esquizofrenia (Meincke, Light, Geyer, Braff, & Gouzoulis-Mayfrank, 2004), aunque encontramos una tendencia opuesta por la cual aparentemente la habituación aumentó en las hembras administradas con LPS. Las razones de esta discrepancia no están claras y necesitan ser exploradas más a fondo, aunque debe tenerse en cuenta que no siempre existe una correspondencia directa entre los síntomas en los pacientes con esquizofrenia y los obtenidos en modelos animales. También hemos encontrado consistentemente que las ratas macho exhiben un reflejo de sobresalto más fuerte que las hembras, como se ha informado previamente en otros estudios (Lehmann, Pryce, & Feldon, 1999; Reilly, Koirala, & Devaud, 2009).

Dentro de la población esquizofrénica se ha observado un mayor nivel de impulsividad que en la población no enferma (Hoptman, 2015; Wing, Rabin, Wass, & George, 2013). De hecho, existe evidencia clínica que correlaciona los niveles altos de impulsividad con mayores tasas de agresividad y suicidio en estos pacientes (Iancu et al., 2010), además esta característica de personalidad también se ha visto muy implicada en el abuso de sustancias (Grant & Chamberlain, 2014; Pattij & De Vries, 2013; Shokrgozar et al., 2015). Sin embargo, en el estudio que llevamos a cabo en esta tesis no encontramos diferencias en la elección impulsiva medida en un paradigma de descuento por demora, ni en machos ni en hembras que habían sido expuestos prenatalmente a LPS. Hasta la fecha este es el primer estudio que mide la impulsividad en un modelo animal de esquizofrenia, no obstante hay un estudio que ha encontrado que

niveles elevados de impulsividad en ratas no serían predictivos de una alteración en el PPI (Feja, Lang, Deppermann, Yüksel, & Wischhof, 2015). Por tanto, en nuestro estudio donde el PPI antecede a las pruebas de impulsividad nosotros podríamos concluir de la misma manera que la impulsividad no es un síntoma clave dentro del trastorno. Además hay evidencia que relaciona mayores tasas de impulsividad en pacientes que muestran mayor sintomatología negativa (Amr & Volpe, 2013), sin embargo nuestro modelo de MIA falló en reproducir la sintomatología negativa en la prueba de interacción social.

Por último, no se encontraron evidencias de un aumento del consumo de COC o los efectos reforzantes de la droga (como lo revelarían los cambios en la curva dosis-respuesta) en animales expuestos a LPS, ni se observó persistencia en la búsqueda de droga durante la extinción. Estos resultados sugieren que, al menos en nuestro modelo, el desarrollo de un estado esquizofrénico similar con anomalías documentadas dopaminérgicas, serotoninérgicas y glutamatérgicas (Boksa, 2010; Wischhof, Irrsack, Dietz, & Koch, 2015) no aumenta la vulnerabilidad de los individuos a las acciones de reforzantes de la COC. Los futuros experimentos deben determinar si se pueden variar ciertos parámetros, tales como el momento de administración de LPS, la dosis, el calendario de refuerzo (por ejemplo, utilizando una relación progresiva que refleje mejor la motivación para la droga y la potencia del reforzamiento).

Otros estudios que usaron Poli I:C se centraron en la COC o la AMP mediante el CPP. En estos estudios, el MIA se relacionó con el aumento de la preferencia de lugar condicionado por la AMP (Borcoi et al., 2015) y la COC (Labouesse, Langhans, & Meyer, 2015), además de una mayor tasa de recaída a la AMP, sin un efecto sobre la adquisición, en el CPP (Richtand et al., 2012). Aunque interesante, el paradigma del CPP evalúa la relevancia de los procesos asociativos pavlovianos en el establecimiento de comportamientos relacionados con las drogas. Como tal, no es equivalente al paradigma de autoadministración que combina el condicionamiento pavloviano e instrumental, representando un mejor modelo de consumo de drogas con comportamientos de motivación y búsqueda. Sin embargo, un reciente estudio ha utilizado el paradigma de la autoadministración de nicotina en el modelo de MIA. En este estudio se pone de manifiesto que los animales que fueron tratados con LPS prenatalmente muestran un discreto pero significativo aumento en la tasa de respuesta para la autoadministración de nicotina en la fase de adquisición, pero no obtuvieron ninguna diferencia debida al tratamiento ni en la curva dosis-respuesta ni en la razón progresiva (Waterhouse, Brennan, & Ellenbroek, 2017).

La cuestión de la comorbilidad también se ha abordado utilizando diferentes medios para establecer el fenotipo esquizofrénico, a saber, el modelo de rata NVHL. Estas ratas mostraron una tasa más alta en las presiones de palanca asociadas con la adquisición de COC en el paradigma de la autoadministración, así como una extinción retardada y una tasa más alta de recaída (R Andrew Chambers & Self, 2002). Sin embargo, hay importantes consideraciones metodológicas relacionadas con este estudio que nos impiden establecer cualquier tipo de comparación prudente con nuestros datos. En primer lugar, las ratas NVHL fueron pre-entrenadas para presionar la palanca para los pellets de sacarosa y aunque los animales fueron sometidos a una extinción de este comportamiento antes de comenzar el estudio de autoadministración de COC y la palanca activa estaba situada en la posición opuesta a la utilizada en el experimento de sacarosa, este aprendizaje previo podría haber facilitado los efectos predisponentes de las ratas NVHL. En segundo lugar, utilizaron un programa de dosis ascendente que administró 0.1 mg/kg durante una semana, 0.2 mg/kg durante una segunda semana y después dos semanas adicionales a 0.4 mg/kg. Finalmente, el efecto más claro de la lesión neonatal en las presiones de palanca fue durante el período de tiempo de espera en la primera semana, mientras que este efecto no fue claro durante las semanas siguientes.

En esta tesis se ha descrito la puesta a punto de un modelo de activación inmune prenatal fiable para estudiar la posible presencia de patología dual como consecuencia del síndrome esquizofrénico (y sus alteraciones neuroquímicas asociadas) en ausencia de factores como la medicación, la automedicación o variables socioeconómicas propias de los estudios en seres humanos. Nuestros resultados no sugieren que la causa primaria del mayor consumo de drogas en los pacientes esquizofrénicos sea el trastorno esquizofrénico en sí y por tanto serían otras variables como la medicación, el deseo de compensar los efectos secundarios de la medicación antipsicótica (automedicación) o una posible vulnerabilidad genética compartida, las que expliquen los fenómenos de patología dual en el contexto de los trastornos del espectro esquizofrénico. Se abren a partir de ahora nuevas posibilidades de investigación utilizando modelos más completos de trastornos esquizofrénicos que combinen la vulnerabilidad inducida por MIA junto con otros factores desencadenantes como el estrés en la adolescencia. Quizás en estos modelos más completos se recapitulen de manera más acertada las diferentes dimensiones sintomáticas de la esquizofrenia incluyendo un mayor consumo de drogas y la adicción a las mismas.

Conclusiones



1. Usando el modelo de activación inmunológica propuesto por Borrel et al., 2002 obtuvimos resultados inconsistentes en la prueba de inhibición prepulso y la autoadministración de cocaína (Capítulos 1 y 2).
2. Con este mismo modelo, pero adoptando un nuevo criterio temporal para la prueba de inhibición prepulso, no observamos ninguna diferencia significativa entre los grupos estudiados.
3. El segundo modelo de activación maternal inmunológica usado en esta tesis y descrita por Romero et al., 2007, junto con un cambio de la cepa, resultó en una disminución en la inhibición prepulso en el grupo LPS.
4. Considerando los resultados obtenidos en los experimentos de citometría de flujo, nosotros sugerimos que el estudio de los biomarcadores en esquizofrenia podría focalizarse sobre los cambios encontrados en los receptores D3 en granulocitos y sobre los CB2 en linfocitos.
5. Cuando nosotros adoptamos el modelo sugerido por Romero et al., 2007 no encontramos mayor vulnerabilidad a los efectos reforzantes de la cocaína en las crías que fueron expuestas a LPS en la etapa prenatal.
6. El tercer modelo de activación maternal inmune utilizado en esta tesis y descrito por el grupo de Boksa (Fortier et al., 2007) fue un enfoque exitoso para obtener el fenotipo esquizofrénico en las crías de LPS.
7. Utilizando este modelo, hubo una respuesta inmunológica de las ratas gestantes cuando se desafiaron con LPS, como se revela con el aumento en los niveles plasmáticos de $TNF\alpha$ y la disminución en el peso corporal.
8. La administración de LPS en la etapa prenatal no parece estar asociada con la sintomatología negativa de la esquizofrenia.
9. Sin embargo, este modelo fue capaz de simular la sintomatología cognitiva y positiva de la esquizofrenia (alteraciones en la memoria de trabajo y en los procesos atencionales).
10. El comportamiento impulsivo no fue alterado por la administración materna de LPS.
11. Finalmente, los animales con un fenotipo esquizofrénico (obtenido con este tercer modelo) no mostraron mayor vulnerabilidad a los efectos reforzadores de la cocaína.

1. Using the maternal immune activation model described by Borrell et al., 2002 we obtained inconsistent results in both the prepulse inhibition test and cocaine self-administration (Chapters 1 and 2).

2. Using this same model but adopting a new temporal criterion for the prepulse inhibition test (PD120) we did not observe any significant difference between the groups studied.

3. The second model of maternal immune activation used in this thesis and described by Romero et al., 2007, together with the strain change, resulted in a decrease in prepulse inhibition in LPS offspring.

4. In considering the results obtained in our flow cytometry experiments, we suggest that the study of biomarkers in schizophrenia may focus on D3 receptors found on granulocytes and CB2 on lymphocytes.

5. When we adopted the model suggested by Romero et al., 2007, the offspring exposed to LPS in the prenatal stage did not show greater vulnerability to the reinforcing effects of cocaine.

6. The third model of maternal immune activation used in this thesis described by the group of Boksa (Fortier et al., 2007) was a successful approach to obtaining the schizophrenic phenotype in the LPS offspring.

7. Using this model, there was a prominent immunological response of the pregnant rats when challenged with LPS, as revealed by the increase in plasma $\text{TNF}\alpha$ levels and the decrease in body weight.

8. Administration of LPS in the prenatal stage does not appear to be associated with the negative symptomatology that occurs in schizophrenia.

9. However, this model was able to simulate the cognitive and positive symptomatology of schizophrenia (alterations in working memory and attentional processes).

10. Impulsive behavior was not altered by maternal LPS administration.

11. Finally, animals with a schizophrenic phenotype (obtained with this third model) showed no greater vulnerability to the reinforcing effects of cocaine.

Bibliografía



- Aavani, T., Rana, S.A., Hawkes, R., & Pittman, Q. J. (2015). Maternal immune activation produces cerebellar hyperplasia and alterations in motor and social behaviors in male and female mice. *Cerebellum* (London, England), 14(5), 491–505. <http://doi.org/10.1007/s12311-015-0669-5>
- Abi-Dargham, A., Xu, X., Thompson, J. L., Gil, R., Kegeles, L. S., Urban, N., Slifstein, M. (2012). Increased prefrontal cortical D(1) receptors in drug naive patients with schizophrenia: a PET study with [(1)(1)C]NNC112. *Journal of Psychopharmacology* (Oxford, England), 26(6), 794–805. <http://doi.org/10.1177/0269881111409265>
- Achim AM, Maziade M, Raymond E, Olivier D, Mérette C, R. M. (2011). How Prevalent Are Anxiety Disorders in Schizophrenia ? A Meta-Analysis and Critical Review on a Significant Association. *Schizophrenia Bulletin*, 37(4), 811–821. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbp148>
- Aderibigbe, Y.A. (1999). Dementia praecox to schizophrenia : The first 100 years, 437–448.
- Ahmed, S. H., & Koob, G. F. (1999). Long-lasting increase in the set point for cocaine self-administration after escalation in rats. *Psychopharmacology*, 146(3), 303–312.
- Allardyce, J., Mccreadie, Æ. R. G., Morrison, Æ. G., & Os, Æ. J. Van. (2007). Do symptom dimensions or categorical diagnoses best discriminate between known risk factors for psychosis ?, 429–437. <http://doi.org/10.1007/s00127-007-0179-y>
- Allen, R. M., Mandt, B. H., Jaskunas, J., Hackley, A., Shickedanz, A., & Bergkamp, D. (2015). Continuous exposure to dizocilpine facilitates the acquisition and escalation of cocaine consumption in male Sprague-Dawley rats. *Drug and Alcohol Dependence*, 147, 137–143. <http://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.11.027>
- Amara, S. G., & Kuhar, M. J. (1993). Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annual Review of Neuroscience*, 16, 73–93. <http://doi.org/10.1146/annurev.ne.16.030193.000445>
- Amitai, N., & Markou, A. (2009). Increased impulsivity and disrupted attention induced by repeated phencyclidine are not attenuated by chronic quetiapine treatment. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 93(3), 248–257. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2008.08.025>
- Amr, M., & Volpe, F. M. (2013). Relationship between anhedonia and impulsivity in schizophrenia, major depression and schizoaffective disorder. *Asian Journal of Psychiatry*, 6(6), 577–580. <http://doi.org/10.1016/j.ajp.2013.09.002>
- Andreasen, N. C., Ehrhardt, J. C., Swayze, V.W. 2nd, Alliger, R. J., Yuh, W.T., Cohen, G., & Ziebell, S. (1990). Magnetic resonance imaging of the brain in schizophrenia. The pathophysiologic significance of structural abnormalities. *Archives of General Psychiatry*, 47(1), 35–44.
- Arguello, P.A., & Gogos, J.A. (2010). Cognition in mouse models of schizophrenia susceptibility genes. *Schizophrenia Bulletin*, 36(2), 289–300. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbp153>
- Arsenault, D., St-Amour, I., Cisbani, G., Rousseau, L.-S., & Cicchetti, F. (2014). The different effects of LPS and poly I:C prenatal immune challenges on the behavior, development and inflammatory responses in pregnant mice and their offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 38, 77–90. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.016>
- Asevedo, E., Gadelha, A., Noto, C., Mansur, R. B., Zugman, A., Belangero, S. I. N., Brietzke, E. (2013). Impact of peripheral levels of chemokines, BDNF and oxidative markers on cognition

in individuals with schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research*, 47(10), 1376–1382. <http://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2013.05.032>

Ashdown, H., Dumont, Y., Ng, M., Poole, S., Boksa, P., & Luheshi, G. N. (2006). The role of cytokines in mediating effects of prenatal infection on the fetus: implications for schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 11(1), 47–55. <http://doi.org/10.1038/sj.mp.4001748>

Ashdown, H., Poole, S., Boksa, P., & Luheshi, G. N. (2007). Interleukin-1 receptor antagonist as a modulator of gender differences in the febrile response to lipopolysaccharide in rats, 3. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00274.2006>.

Babri, S., Doosti, M.-H., & Salari, A.-A. (2014). Strain-dependent effects of prenatal maternal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors in offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, 37, 164–176. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.003>

Baharnoori, M., Bhardwaj, S. K., & Srivastava, L. K. (2012). Neonatal behavioral changes in rats with gestational exposure to lipopolysaccharide: A prenatal infection model for developmental neuropsychiatric disorders. *Schizophrenia Bulletin*, 38(3), 444–456. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbq098>

Baharnoori, M., Brake, W. G., & Srivastava, L. K. (2009). Prenatal immune challenge induces developmental changes in the morphology of pyramidal neurons of the prefrontal cortex and hippocampus in rats. *Schizophrenia Research*, 107(1), 99–109. <http://doi.org/10.1016/j.schres.2008.10.003>

Balla, A., Sershen, H., Serra, M., Koneru, R., & Javitt, D. C. (2003). Subchronic Continuous Phencyclidine Administration Potentiates Amphetamine-Induced Frontal Cortex Dopamine Release, 34–44. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1300019>

Banks, W. A., Gray, A. M., Erickson, M. A., Salameh, T. S., Damodarasamy, M., Sheibani, N., ... Reed, M. J. (2015). Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1), 223. <http://doi.org/10.1186/s12974-015-0434-1>

Barajas, A., Ochoa, S., Obiols, J. E., & Lalucat-jo, L. (2015). Gender Differences in Individuals at High-Risk of Psychosis: A Comprehensive Literature Review, 2015. <http://doi.org/10.1155/2015/430735>

Barry, S. J. E., Gaughan, T. M., & Hunter, R. (2012). Search date May 2010 Mental health, (May 2010).

Basavaraj, S., & Yan, J. (2012). Prepulse Inhibition of Acoustic Startle Reflex as a Function of the Frequency Difference between Prepulse and Background Sounds in Mice, 7(9). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0045123>

Batinic, B., Santrac, A., Divovic, B., Timic, T., Stankovic, T., Obradovic, A. L., Savic, M. M. (2016). Lipopolysaccharide exposure during late embryogenesis results in diminished locomotor activity and amphetamine response in females and spatial cognition impairment in males in adult, but not adolescent rat offspring. *Behavioural Brain Research*, 299, 72–80. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.11.025>

Becker, A., Grecksch, G., Bernstein, H. G., Holtt, V., & Bogerts, B. (1999). Social behaviour in rats lesioned with ibotenic acid in the hippocampus: quantitative and qualitative analysis. *Psychopharmacology*, 144(4), 333–338.

Belin, D., Balado, E., Piazza, P.V., & Deroche-Gamonet, V. (2009). Pattern of intake and drug craving predict the development of cocaine addiction-like behavior in rats. *Biological Psychiatry*, 65(10), 863–868. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.05.031>

Beninger, R. J., Beuk, J., Banasikowski, T. J., van Adel, M., Boivin, G. A., & Reynolds, J. N. (2010). Subchronic phencyclidine in rats: alterations in locomotor activity, maze performance, and GABA(A) receptor binding. *Behavioural Pharmacology*, 21(1), 1–10. <http://doi.org/10.1097/FBP.0b013e3283347091>

Bhardwaj, S. K., Baharnoori, M., Sharif-Askari, B., Kamath, A., Williams, S., & Srivastava, L. K. (2009). Behavioral characterization of dysbindin-1 deficient sandy mice. *Behavioural Brain Research*, 197(2), 435–441. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.10.011>

Bioque, M., Garcia-Bueno, B., Macdowell, K. S., Meseguer, A., Saiz, P.A., Parellada, M., Bernardo, M. (2013). Peripheral endocannabinoid system dysregulation in first-episode psychosis. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 38(13), 2568–2577. <http://doi.org/10.1038/npp.2013.165>

Boksa, P. (2010). Effects of prenatal infection on brain development and behavior: A review of findings from animal models. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(6), 881–897. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.03.005>

Boneberg, E.-M., von Seydlitz, E., Propster, K., Watzl, H., Rockstroh, B., & Illges, H. (2006). D3 dopamine receptor mRNA is elevated in T cells of schizophrenic patients whereas D4 dopamine receptor mRNA is reduced in CD4+ -T cells. *Journal of Neuroimmunology*, 173(1-2), 180–187. <http://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.11.018>

Borcoi, A. R., Patti, C. L., Zanin, K. A., Hollais, A. W., Santos-Baldaia, R., Ceccon, L. M. B., Frussa-Filho, R. (2015). Effects of prenatal immune activation on amphetamine-induced addictive behaviors: Contributions from animal models. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 63, 63–69. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.05.015>

Borrell, J., Vela, J. M., Arevalo-Martin, A., Molina-Holgado, E., & Guaza, C. (2002). Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats. Implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 26(2), 204–215. [http://doi.org/10.1016/S0893-133X\(01\)00360-8](http://doi.org/10.1016/S0893-133X(01)00360-8)

Boucher, A. A., Arnold, J. C., Duffy, L., Schofield, P. R., Micheau, J., & Karl, T. (2007). Heterozygous neuregulin 1 mice are more sensitive to the behavioural effects of Delta9-tetrahydrocannabinol. *Psychopharmacology*, 192(3), 325–336. <http://doi.org/10.1007/s00213-007-0721-3>

Brady, A. M., McCallum, S. E., Glick, S. D., & O'Donnell, P. (2008). Enhanced methamphetamine self-administration in a neurodevelopmental rat model of schizophrenia. *Psychopharmacology*, 200(2), 205–215. <http://doi.org/10.1007/s00213-008-1195-7>

Braehler, C., Valiquette, L., Holowka, D., Malla, A. K., Joobar, R., Ciampi, A., King, S. (2013). Chil-

hood trauma and dissociation in first-episode psychosis, chronic schizophrenia and community controls. *Psychiatry Research*, 210(1), 36–42. <http://doi.org/10.1016/j.psychres.2013.05.033>

Braff, D., Stone, C., Callaway, E., Geyer, M., Glick, I., & Bali, L. (1978). Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology*, 15(4), 339–343.

Bramon, E., Rabe-Hesketh, S., Sham, P., Murray, R. M., & Frangou, S. (2004). Meta-analysis of the P300 and P50 waveforms in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 70(2-3), 315–329. <http://doi.org/10.1016/j.schres.2004.01.004>

Bray, N. J., Preece, A., Williams, N. M., Moskvina, V., Buckland, P. R., Owen, M. J., & O'Donovan, M. C. (2005). Haplotypes at the dystrobrevin binding protein 1 (DTNBPI) gene locus mediate risk for schizophrenia through reduced DTNBPI expression. *Human Molecular Genetics*, 14(14), 1947–1954. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddi199>

Bret-Dibat, J. L., Bluthé, R. M., Kent, S., Kelley, K. W., & Dantzer, R. (1995). Lipopolysaccharide and interleukin-1 depress food-motivated behavior in mice by a vagal-mediated mechanism. *Brain, Behavior, and Immunity*, 9(3), 242–246.

Brown, A. S. (2011). The environment and susceptibility to schizophrenia. *Progress in Neurobiology*, 93(1), 23–58. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2010.09.003>

Brown, A. S., Begg, M. D., Gravenstein, S., Schaefer, C. A., Wyatt, R. J., Bresnahan, M., Susser, E. S. (2004). Serologic evidence of prenatal influenza in the etiology of schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 61(8), 774–780. <http://doi.org/10.1001/archpsyc.61.8.774>

Brown, A. S., & Derkits, E. J. (2010). Prenatal infection and schizophrenia: a review of epidemiologic and translational studies. *The American Journal of Psychiatry*, 167(3), 261–280. <http://doi.org/10.1176/appi.ajp.2009.09030361>

Brown, A. S., & Patterson, P. H. (2011). Maternal infection and schizophrenia: Implications for prevention. *Schizophrenia Bulletin*, 37(2), 284–290. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbq146>

Brown, A. S., Schaefer, C. A., Quesenberry, C. P. J., Liu, L., Babulas, V. P., & Susser, E. S. (2005). Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. *The American Journal of Psychiatry*, 162(4), 767–773. <http://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.4.767>

Brown, A. S., & Susser, E. S. (2002). In utero infection and adult schizophrenia. *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 8(1), 51–57. <http://doi.org/10.1002/mrdd.10004>

Brown, A. S., Susser, E. S., Butler, P. D., Richardson Andrews, R., Kaufmann, C. A., & Gorman, J. M. (1996). Neurobiological plausibility of prenatal nutritional deprivation as a risk factor for schizophrenia. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 184(2), 71–85.

Brown, J. M., Hanson, G. R., & Fleckenstein, A. E. (2001). Regulation of the vesicular monoamine transporter-2: a novel mechanism for cocaine and other psychostimulants. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296(3), 762–767.

Brugal, M. T., Pulido, J., Toro, C., de la Fuente, L., Bravo, M. J., Ballesta, R., Castellano, Y. (2009). Injecting, sexual risk behaviors and HIV infection in young cocaine and heroin users in Spain. *European Addiction Research*, 15(3), 171–178. <http://doi.org/10.1159/000220345>

- Buchta, W. C., & Riegel, A. C. (2016). Chronic cocaine disrupts mesocortical learning mechanisms, *1628(0 0)*, 88–103. <http://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.02.003>. Chronic
- Buckley, P. F. (1998). Substance abuse in schizophrenia: a review. *The Journal of Clinical Psychiatry*, *59* Suppl 3, 26–30.
- Buka, S. L., Cannon, T. D., Torrey, E. F., & Yolken, R. H. (2008). Maternal exposure to herpes simplex virus and risk of psychosis among adult offspring. *Biological Psychiatry*, *63*(8), 809–815. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.09.022>
- Buttarelli, F. R., Fanciulli, A., Pellicano, C., & Pontieri, F. E. (2011). The dopaminergic system in peripheral blood lymphocytes: from physiology to pharmacology and potential applications to neuropsychiatric disorders. *Current Neuropharmacology*, *9*(2), 278–288. <http://doi.org/10.2174/157015911795596612>
- Cai, Z., Pan, Z. L., Pang, Y., Evans, O. B., & Rhodes, P. G. (2000). Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatric Research*, *47*(1), 64–72.
- Caine, S. B., Heinrichs, S. C., Coffin, V. L., & Koob, G. F. (1995). Effects of the dopamine D-1 antagonist SCH 23390 microinjected into the accumbens, amygdala or striatum on cocaine self-administration in the rat. *Brain Research*, *692*(1-2), 47–56.
- Callicott, J. H., Straub, R. E., Pezawas, L., Egan, M. F., Mattay, V. S., Hariri, A. R., Weinberger, D. R. (2005). Variation in DISC1 affects hippocampal structure and function and increases risk for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(24), 8627–8632. <http://doi.org/10.1073/pnas.0500515102>
- Cannon, M., Jones, P. B., & Murray, R. M. (2002). Obstetric complications and schizophrenia: historical and meta-analytic review. *The American Journal of Psychiatry*, *159*(7), 1080–1092. <http://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.7.1080>
- Cannon, T. D., Hennah, W., van Erp, T. G. M., Thompson, P. M., Lonnqvist, J., Huttunen, M., Peltonen, L. (2005). Association of DISC1/TRAX haplotypes with schizophrenia, reduced prefrontal gray matter, and impaired short- and long-term memory. *Archives of General Psychiatry*, *62*(11), 1205–1213. <http://doi.org/10.1001/archpsyc.62.11.1205>
- Cantin, L., Lenoir, M., Augier, E., Vanhille, N., Dubreucq, S., Serre, F., Ahmed, S. H. (2010). Cocaine is low on the value ladder of rats: possible evidence for resilience to addiction. *PloS One*, *5*(7), e11592. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0011592>
- Cantor-Graae, E., Nordstrom, L. G., & McNeil, T. F. (2001). Substance abuse in schizophrenia: a review of the literature and a study of correlates in Sweden. *Schizophrenia Research*, *48*(1), 69–82.
- Cantor-Graae, E., & Selten, J.-P. (2005). Schizophrenia and migration: a meta-analysis and review. *The American Journal of Psychiatry*, *162*(1), 12–24. <http://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.1.12>
- Carelli, R. M., & Deadwyler, S. A. (1996). Dose-dependent transitions in nucleus accumbens cell firing and behavioral responding during cocaine self-administration sessions in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *277*(1), 385–393.

Carpenter, W.T., & Koenig, J. I. (2008). The evolution of drug development in schizophrenia: past issues and future opportunities. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(9), 2061–2079. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1301639>

Caspi, A., Moffitt, T. E., Cannon, M., McClay, J., Murray, R., Harrington, H., Craig, I. W. (2005). Moderation of the effect of adolescent-onset cannabis use on adult psychosis by a functional polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: longitudinal evidence of a gene X environment interaction. *Biological Psychiatry*, 57(10), 1117–1127. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.01.026>

Cazzullo, C. L., Saresella, M., Roda, K., Calvo, M. G., Bertrando, P., Doria, S., Ferrante, P. (1998). Increased levels of CD8+ and CD4+ 45RA+ lymphocytes in schizophrenic patients. *Schizophrenia Research*, 31(1), 49–55.

Chambers, R. A., Krystal, J. H., & Self, D. W. (2001). A Neurobiological Basis for Substance Abuse Comorbidity in Schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 50(2), 71–83.

Chambers, R. A., Moore, J., McEvoy, J. P., & Levin, E. D. (1996). Cognitive effects of neonatal hippocampal lesions in a rat model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 15(6), 587–594. [http://doi.org/10.1016/S0893-133X\(96\)00132-7](http://doi.org/10.1016/S0893-133X(96)00132-7)

Chambers, R. A., & Self, D. W. (2002). Motivational responses to natural and drug rewards in rats with neonatal ventral hippocampal lesions: an animal model of dual diagnosis schizophrenia. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 27(6), 889–905. [http://doi.org/10.1016/S0893-133X\(02\)00365-2](http://doi.org/10.1016/S0893-133X(02)00365-2)

Chan, M. K., Gottschalk, M. G., Haenisch, F., Tomasik, J., Ruland, T., Rahmoune, H., Bahn, S. (2014). Applications of blood-based protein biomarker strategies in the study of psychiatric disorders. *Progress in Neurobiology*, 122, 45–72. <http://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2014.08.002>

Chan, M. K., Guest, P. C., Levin, Y., Umrana, Y., Schwarz, E., Bahn, S., & Rahmoune, H. (2011). Converging evidence of blood-based biomarkers for schizophrenia: an update. *International Review of Neurobiology*, 101, 95–144. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-387718-5.00005-5>

Chang, C.-K., Hayes, R. D., Perera, G., Broadbent, M. T. M., Fernandes, A. C., Lee, W. E., Stewart, R. (2011). Life expectancy at birth for people with serious mental illness and other major disorders from a secondary mental health care case register in London. *PloS One*, 6(5), e19590. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0019590>

Chen, J., Xu, Y., Zhang, J., Liu, Z., Xu, C., Zhang, K., Xu, Q. (2013). A combined study of genetic association and brain imaging on the DAOA gene in schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics : The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 162B(2), 191–200. <http://doi.org/10.1002/ajmg.b.32131>

Chen, Y.-H., Xu, D.-X., Zhao, L., Wang, H., Wang, J.-P., & Wei, W. (2006). Ascorbic acid protects against lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and intra-uterine growth retardation in mice. *Toxicology*, 217(1), 39–45. <http://doi.org/10.1016/j.tox.2005.08.010>

Choi, Y. K., Snigdha, S., Shahid, M., Neill, J. C., & Tarazi, F. I. (2009). Subchronic effects of phencyclidine on dopamine and serotonin receptors: implications for schizophrenia. *Journal of Molecular Neuroscience* : MN, 38(3), 227–235. <http://doi.org/10.1007/s12031-009-9204-9>

Clark, A. J., Feldon, J., & Rawlins, J. N. (1992). Aspiration lesions of rat ventral hippocampus disinhibit responding in conditioned suppression or extinction, but spare latent inhibition and the partial reinforcement extinction effect. *Neuroscience*, 48(4), 821–829.

Cohen, C. I., Palekar, N., Barker, J., & Ramirez, P. M. (2012). The relationship between trauma and clinical outcome variables among older adults with schizophrenia spectrum disorders. *The American Journal of Geriatric Psychiatry* : Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry, 20(5), 408–415. <http://doi.org/10.1097/JGP.0b013e318211817e>

Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. (N. J. : L. E. A. Hillsdale, Ed.) (2nd Editio).

Connor, C. M., Dincer, A., Straubhaar, J., Galler, J. R., Houston, I. B., & Akbarian, S. (2012). Maternal immune activation alters behavior in adult offspring, with subtle changes in the cortical transcriptome and epigenome. *Schizophrenia Research*, 140(1-3), 175–184. <http://doi.org/10.1016/j.schres.2012.06.037>

Corcoran, C., Perrin, M., Harlap, S., Deutsch, L., Fennig, S., Manor, O., Susser, E. (2009). Effect of socioeconomic status and parents' education at birth on risk of schizophrenia in offspring. *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology*, 44(4), 265–271. <http://doi.org/10.1007/s00127-008-0439-5>

Corson, P.W., Nopoulos, P., Miller, D. D., Arndt, S., & Andreasen, N. C. (1999). Change in basal ganglia volume over 2 years in patients with schizophrenia: typical versus atypical neuroleptics. *The American Journal of Psychiatry*, 156(8), 1200–1204. <http://doi.org/10.1176/ajp.156.8.1200>

Cox, M. M., Tucker, A. M., Tang, J., Talbot, K., Richer, D. C., Yeh, L., & Arnold, S. E. (2009). Neurobehavioral abnormalities in the dysbindin-1 mutant, sandy, on a C57BL/6J genetic background. *Genes, Brain, and Behavior*, 8(4), 390–397. <http://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2009.00477.x>

Coyle, P., Tran, N., Fung, J. N. T., Summers, B. L., & Rofe, A. M. (2009). Maternal dietary zinc supplementation prevents aberrant behaviour in an object recognition task in mice offspring exposed to LPS in early pregnancy. *Behavioural Brain Research*, 197(1), 210–218. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.08.022>

Craddock, N., O'Donovan, M. C., & Owen, M. J. (2005). The genetics of schizophrenia and bipolar disorder: dissecting psychosis. *Journal of Medical Genetics*, 42(3), 193–204. <http://doi.org/10.1136/jmg.2005.030718>

Craddock, N., Owen, M. J., & O'Donovan, M. C. (2006). The catechol-O-methyl transferase (COMT) gene as a candidate for psychiatric phenotypes: evidence and lessons. *Molecular Psychiatry*, 11(5), 446–458. <http://doi.org/10.1038/sj.mp.4001808>

Cui, K., Ashdown, H., Luheshi, G. N., & Boksa, P. (2009). Effects of prenatal immune activation on hippocampal neurogenesis in the rat. *Schizophrenia Research*, 113(2-3), 288–297. <http://doi.org/10.1016/j.schres.2009.05.003>

Davies, G., Welham, J., Chant, D., Torrey, E. F., & McGrath, J. (2003). A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 29(3), 587–593.

Davis, J., Eyre, H., Jacka, F. N., Dodd, S., Dean, O., Mcewen, S., Berk, M. (2016). A review of vulnerability and risks for schizophrenia: Beyond the two hit hypothesis, 185–194. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.017>.A

Davis, K. L., Kahn, R. S., Ko, G., & Davidson, M. (1991). Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *The American Journal of Psychiatry*, 148(11), 1474–1486. <http://doi.org/10.1176/ajp.148.11.1474>

De Vries, T. J., Schoffelmeer, A. N., Binnekade, R., & Vanderschuren, L. J. (1999). Dopaminergic mechanisms mediating the incentive to seek cocaine and heroin following long-term withdrawal of IV drug self-administration. *Psychopharmacology*, 143(3), 254–260.

De Witte, L., Tomasik, J., Schwarz, E., Guest, P. C., Rahmoune, H., Kahn, R. S., & Bahn, S. (2014). Cytokine alterations in first-episode schizophrenia patients before and after antipsychotic treatment. *Schizophrenia Research*, 154(1-3), 23–29. <http://doi.org/10.1016/j.schres.2014.02.005>

Deacon, R. M. J., & Rawlins, J. N. P. (2006). T-maze alternation in the rodent. *Nature Protocols*, 1(1), 7–12. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.2>

Depino, a. M. (2015). Early prenatal exposure to LPS results in anxiety- and depression-related behaviors in adulthood. *Neuroscience*, 299, 56–65. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.065>

Depoortere, R., Perrault, G., & Sanger, D. J. (1997). Potentiation of prepulse inhibition of the startle reflex in rats: pharmacological evaluation of the procedure as a model for detecting antipsychotic activity. *Psychopharmacology*, 132(4), 366–374.

DeQuardo, J. R., Carpenter, C. F., & Tandon, R. (1994). Patterns of substance abuse in schizophrenia: nature and significance. *Journal of Psychiatric Research*, 28(3), 267–275.

Derijk, R. H., Van Kampen, M., Van Rooijen, N., & Berkenbosch, F. (1994). Hypothermia to endotoxin involves reduced thermogenesis, macrophage-dependent mechanisms, and prostaglandins. *The American Journal of Physiology*, 266(1 Pt 2), R1–8.

Deroche-Gamonet, V., Belin, D., & Piazza, P. V. (2004). Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5686), 1014–1017. <http://doi.org/10.1126/science.1099020>

DeRosse, P., Funke, B., Burdick, K. E., Lencz, T., Ekholm, J. M., Kane, J. M., Malhotra, A. K. (2006). Dysbindin genotype and negative symptoms in schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*, 163(3), 532–534. <http://doi.org/10.1176/appi.ajp.163.3.532>

Dervaux, A., & Laqueille, X. (2008). [Smoking and schizophrenia: epidemiological and clinical features]. *L'Encephale*, 34(3), 299–305. <http://doi.org/10.1016/j.encep.2007.04.003>

Deutch, A. Y. (1993). Prefrontal cortical dopamine systems and the elaboration of functional corticostriatal circuits: implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Journal of*

Neural Transmission. General Section, 91(2-3), 197–221.

Diergaarde, L., Pattij, T., Poortvliet, I., Hogenboom, F., de Vries, W., Schoffelmeer, a. N. M., & De Vries, T. J. (2008). Impulsive Choice and Impulsive Action Predict Vulnerability to Distinct Stages of Nicotine Seeking in Rats. *Biological Psychiatry*. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.07.011>

Dikeos, D. G., Wickham, H., McDonald, C., Walshe, M., Sigmundsson, T., Grech, A., Ay, R. M. (2006). Distribution of symptom dimensions across Kraepelinian divisions.

Dixon, L. (1999). Dual diagnosis of substance abuse in schizophrenia: prevalence and impact on outcomes. *Schizophrenia Research*, 35 Suppl, S93–100.

Dominguez, R., Cruz-Morales, S. E., Carvalho, M. C., Xavier, M., & Brandao, M. L. (2003). Sex differences in serotonergic activity in dorsal and median raphe nucleus. *Physiology & Behavior*, 80(2-3), 203–210.

Drexhage, R. C., Hoogenboezem, T.A., Cohen, D., Versnel, M.A., Nolen, W.A., van Beveren, N. J. M., & Drexhage, H.A. (2011). An activated set point of T-cell and monocyte inflammatory networks in recent-onset schizophrenia patients involves both pro- and anti-inflammatory forces. *The International Journal of Neuropsychopharmacology*, 14(6), 746–755. <http://doi.org/10.1017/S1461145710001653>

Egan, M. F., Goldberg, T. E., Kolachana, B. S., Callicott, J. H., Mazzanti, C. M., Straub, R. E., Weinberger, D. R. (2001). Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6917–6922. <http://doi.org/10.1073/pnas.111134598>

Einon, D. F., & Morgan, M. J. (1977). A critical period for social isolation in the rat. *Developmental Psychobiology*, 10(2), 123–132. <http://doi.org/10.1002/dev.420100205>

Ellenbroek, B. A., van den Kroonenberg, P. T., & Cools, A. R. (1998). The effects of an early stressful life event on sensorimotor gating in adult rats. *Schizophrenia Research*, 30(3), 251–260.

Elvevag, B., & Goldberg, T. E. (2000). Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Critical Reviews in Neurobiology*, 14(1), 1–21.

Escobar, M., Crouzin, N., Cavalier, M., Quentin, J., Roussel, J., Lante, F., Vignes, M. (2011). Early, time-dependent disturbances of hippocampal synaptic transmission and plasticity after in utero immune challenge. *Biological Psychiatry*, 70(10), 992–999. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2011.01.009>

European Monitoring Center for Drug and Drug Addiction. (2016). Informe Europeo sobre Drogas.

Everitt, B. J., Belin, D., Economidou, D., Pelloux, Y., Dalley, J. W., & Robbins, T. W. (2008). Review. Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363(1507), 3125–3135. <http://doi.org/10.1098/rstb.2008.0089>

Fanous, S., Goldart, E. M., Theberge, F. R. M., Bossert, J. M., Shaham, Y., & Hope, B. T. (2012). Role of Orbitofrontal Cortex Neuronal Ensembles in the Expression of Incubation of He-

roin Craving. *Journal of Neuroscience*, 32(34), 11600–11609. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1914-12.2012>

Farid, M., Martinez, Z.A., Geyer, M.A., & Swerdlow, N. R. (2000). Regulation of sensorimotor gating of the startle reflex by serotonin 2A receptors. Ontogeny and strain differences. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 23(6), 623–632. [http://doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00163-9](http://doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00163-9)

Fatemi, S. H., Folsom, T. D., Rooney, R. J., Mori, S., Kornfield, T. E., Reutiman, T. J., Patel, D. H. (2012). The viral theory of schizophrenia revisited: abnormal placental gene expression and structural changes with lack of evidence for H1N1 viral presence in placentae of infected mice or brains of exposed offspring. *Neuropharmacology*, 62(3), 1290–1298. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.011>

Featherstone, R. E., Burton, C. L., Coppa-Hopman, R., Rizos, Z., Sinyard, J., Kapur, S., & Fletcher, P. J. (2009). Gestational treatment with methylazoxymethanol (MAM) that disrupts hippocampal-dependent memory does not alter behavioural response to cocaine. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 93(4), 382–390. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2009.05.010>

Featherstone, R. E., Kapur, S., & Fletcher, P. J. (2007). The amphetamine-induced sensitized state as a model of schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 31(8), 1556–1571. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2007.08.025>

Featherstone, R. E., Rizos, Z., Kapur, S., & Fletcher, P. J. (2008). A sensitizing regimen of amphetamine that disrupts attentional set-shifting does not disrupt working or long-term memory. *Behavioural Brain Research*, 189(1), 170–179. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.12.032>

Feja, M., Lang, M., Deppermann, L., Yüksel, A., & Wischhof, L. (2015). High levels of impulsivity in rats are not accompanied by sensorimotor gating deficits and locomotor hyperactivity. *Behavioural Processes*, 121, 13–20. <http://doi.org/10.1016/j.beproc.2015.10.011>

Fernandes, B. S., Steiner, J., Berk, M., Molendijk, M. L., Gonzalez-Pinto, A., Turck, C.W., Gonçalves, C.-A. (2015). Peripheral brain-derived neurotrophic factor in schizophrenia and the role of antipsychotics: meta-analysis and implications. *Molecular Psychiatry*, 20(9), 1108–1119. <http://doi.org/10.1038/mp.2014.117>

Ferretjans, R., de Campos, S. M., Ribeiro-Santos, R., Guimaraes, F. C., de Oliveira, K., Cardoso, A. C. A., Salgado, J. V. (2014). Cognitive performance and peripheral endocannabinoid system receptor expression in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 156(2-3), 254–260. <http://doi.org/10.1016/j.schres.2014.04.028>

Fiore, M., Grace, A.A., Korf, J., Stampachiachiere, B., & Aloe, L. (2004). Impaired brain development in the rat following prenatal exposure to methylazoxymethanol acetate at gestational day 17 and neurotrophin distribution. *Neuroreport*, 15(11), 1791–1795.

Flagstad, P., Mork, A., Glenthøj, B.Y., van Beek, J., Michael-Titus, A. T., & Didriksen, M. (2004). Disruption of neurogenesis on gestational day 17 in the rat causes behavioral changes relevant to positive and negative schizophrenia symptoms and alters amphetamine-induced dopamine release in nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the*

American College of Neuropsychopharmacology, 29(11), 2052–2064. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1300516>

Fletcher, P. J., Tenn, C. C., Rizos, Z., Lovic, V., & Kapur, S. (2005). Sensitization to amphetamine, but not PCP, impairs attentional set shifting: reversal by a D1 receptor agonist injected into the medial prefrontal cortex. *Psychopharmacology*, 183(2), 190–200. <http://doi.org/10.1007/s00213-005-0157-6>

Fletcher, P. J., Tenn, C. C., Sinyard, J., Rizos, Z., & Kapur, S. (2007). A sensitizing regimen of amphetamine impairs visual attention in the 5-choice serial reaction time test: reversal by a D1 receptor agonist injected into the medial prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32(5), 1122–1132. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1301221>

Flores, G., Barbeau, D., Quirion, R., & Srivastava, L. K. (1996). Decreased binding of dopamine D3 receptors in limbic subregions after neonatal bilateral lesion of rat hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(6), 2020–2026.

Foley, K. a, Macfabe, D. F., Vaz, A., Ossenkopp, K.-P., & Kavaliers, M. (2014). Sexually dimorphic effects of prenatal exposure to propionic acid and lipopolysaccharide on social behavior in neonatal, adolescent, and adult rats: Implications for autism spectrum disorders. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 39, 1–11. <http://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2014.04.001>

Fone, K. C. F., & Porkess, M. V. (2008). Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents—relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 32(6), 1087–1102. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.003>

Fortier, M. E., Luheshi, G. N., & Boksa, P. (2007). Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. *Behavioural Brain Research*, 181(2), 270–277. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.04.016>

Fortier, M.-E., Joover, R., Luheshi, G. N., & Boksa, P. (2004). Maternal exposure to bacterial endotoxin during pregnancy enhances amphetamine-induced locomotion and startle responses in adult rat offspring. *Journal of Psychiatric Research*, 38(3), 335–345. <http://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2003.10.001>

Foster, D. J., Wilson, J. M., Remke, D. H., Mahmood, M. S., Uddin, M. J., Wess, J., ... Conn, P. J. (2016). Antipsychotic-like Effects of M4 Positive Allosteric Modulators Are Mediated by CB2 Receptor-Dependent Inhibition of Dopamine Release. *Neuron*, 91(6), 1244–1252. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.08.017>

Freudenreich, O., Brockman, M. A., Henderson, D. C., Evins, A. E., Fan, X., Walsh, J. P., & Goff, D. C. (2010). Analysis of peripheral immune activation in schizophrenia using quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). *Psychiatry Research*, 176(2-3), 99–102. <http://doi.org/10.1016/j.psychres.2008.11.007>

Frodl-Bauch, T., Gallinat, J., Meisenzahl, E. M., Moller, H. J., & Hegerl, U. (1999). P300 subcomponents reflect different aspects of psychopathology in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 45(1), 116–126.

Gaebel, W., Zielasek, J., & Cleveland, H.-R. (2013). Psychotic disorders in ICD-11. *Asian Journal of Psychiatry*, 6(3), 263–265. <http://doi.org/10.1016/j.ajp.2013.04.002>

Galdas, P. M., Cheater, F., & Marshall, P. (2005). Men and health help-seeking behaviour: literature review. *Journal of Advanced Nursing*, 49(6), 616–623. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2648.2004.03331.x>

Gayle, D. a, Beloosesky, R., Desai, M., Amidi, F., Nuñez, S. E., & Ross, M. G. (2004). Maternal LPS induces cytokines in the amniotic fluid and corticotropin releasing hormone in the fetal rat brain. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286(6), R1024–R1029. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.00664.2003>

Goepfrich, A. A., Gluch, C., Friemel, C. M., & Schneider, M. (2013). Behavioral differences in three Wistar Han rat lines for emotional reactivity, cognitive processing and ethanol intake. *Physiology & Behavior*, 110-111, 102–108. <http://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.12.019>

Golan, H. M., Lev, V., Hallak, M., Sorokin, Y., & Huleihel, M. (2005). Specific neurodevelopmental damage in mice offspring following maternal inflammation during pregnancy. *Neuropharmacology*, 48(6), 903–917. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.12.023>

Goldstein, M., & Deutch, A. Y. (1992). Dopaminergic mechanisms in the pathogenesis of schizophrenia. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 6(7), 2413–2421.

Gondek, T. M., Królic, A., Patryk, P., & Ki, A. (2015). The European studies on mortality in schizophrenia, 49(6), 1139–1148.

Grant, J. E., & Chamberlain, S. R. (2014). Impulsive action and impulsive choice across substance and behavioral addictions: cause or consequence? *Addictive Behaviors*, 39(11), 1632–1639. <http://doi.org/10.1016/j.addbeh.2014.04.022>

Grayson, B., Idris, N. F., & Neill, J. C. (2007). Atypical antipsychotics attenuate a sub-chronic PCP-induced cognitive deficit in the novel object recognition task in the rat. *Behavioural Brain Research*, 184(1), 31–38. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2007.06.012>

Group, M., & Melbourne, G. De. (2013). Schizophrenia : Analysis and psychological treatment according to the clinical staging, 41(1), 56–63.

Gustafsson, L., Ploj, K., & Nylander, I. (2005). Effects of maternal separation on voluntary ethanol intake and brain peptide systems in female Wistar rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 81(3), 506–516. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.03.016>

Hahn, C.-G., Wang, H.-Y., Cho, D.-S., Talbot, K., Gur, R. E., Berrettini, W. H., Arnold, S. E. (2006). Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Nature Medicine*, 12(7), 824–828. <http://doi.org/10.1038/nm1418>

Hart, C. L., Jatlow, P., Sevarino, K. A., & McCance-Katz, E. F. (2000). Comparison of intravenous cocaethylene and cocaine in humans. *Psychopharmacology*, 149(2), 153–162.

Harvey, L., & Boksa, P. (2014). Additive effects of maternal iron deficiency and prenatal immune activation on adult behaviors in rat offspring. *Brain, Behavior, and Immunity*, *40*, 27–37. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.005>

Hava, G., Vered, L., Yael, M., Mordechai, H., & Mahoud, H. (2006). Alterations in behavior in adult offspring mice following maternal inflammation during pregnancy. *Developmental Psychobiology*, *48*(2), 162–168. <http://doi.org/10.1002/dev.20116>

Hayashi-Takagi, A., Vawter, M. P., & Iwamoto, K. (2014). Peripheral biomarkers revisited: integrative profiling of peripheral samples for psychiatric research. *Biological Psychiatry*, *75*(12), 920–928. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.09.035>

Heckers, S. (2011). Bleuler and the Neurobiology of Schizophrenia, *37*(6), 1131–1135. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbr108>

Heidbreder, C. A., Weiss, I. C., Domeney, A. M., Pryce, C., Homberg, J., Hedou, G., Nelson, P. (2000). Behavioral, neurochemical and endocrinological characterization of the early social isolation syndrome. *Neuroscience*, *100*(4), 749–768.

Hennah, W., Thomson, P., Peltonen, L., & Porteous, D. (2006). Genes and schizophrenia: beyond schizophrenia: the role of DISC1 in major mental illness. *Schizophrenia Bulletin*, *32*(3), 409–416. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbj079>

Herberth, M., Koethe, D., Cheng, T. M. K., Krzyszton, N. D., Schoeffmann, S., Guest, P. C., ... Bahn, S. (2011). Impaired glycolytic response in peripheral blood mononuclear cells of first-onset antipsychotic-naive schizophrenia patients. *Molecular Psychiatry*, *16*(8), 848–859. <http://doi.org/10.1038/mp.2010.71>

Heston, L. L. (1966). Psychiatric disorders in foster home reared children of schizophrenic mothers. *The British Journal of Psychiatry : The Journal of Mental Science*, *112*(489), 819–825.

Hikida, T., Jaaro-Peled, H., Seshadri, S., Oishi, K., Hookway, C., Kong, S., Sawa, A. (2007). Dominant-negative DISC1 transgenic mice display schizophrenia-associated phenotypes detected by measures translatable to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(36), 14501–14506. <http://doi.org/10.1073/pnas.0704774104>

Hince, D.A., & Martin-Iverson, M.T. (2005). Differences in prepulse inhibition (PPI) between Wistar and Sprague-Dawley rats clarified by a new method of PPI standardization. *Behavioral Neuroscience*, *119*(1), 66–77. <http://doi.org/10.1037/0735-7044.119.1.66>

Hoffman, H. S., & Ison, J. R. (1980). Reflex modification in the domain of startle: I. Some empirical findings and their implications for how the nervous system processes sensory input. *Psychological Review*, *87*(2), 175–189.

Holmstrand, C., Bogren, M., Mattisson, C., & Bradvik, L. (2015). Long-term suicide risk in no, one or more mental disorders: the Lundby Study 1947-1997. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, *132*(6), 459–469. <http://doi.org/10.1111/acps.12506>

Homayoun, H., & Moghaddam, B. (2007). NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(43), 11496–11500. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4311-07.2007>

org/10.1523/JNEUROSCI.2213-07.2007

Hoptman, M. J. (2015). Impulsivity and aggression in schizophrenia: a neural circuitry perspective with implications for treatment. *CNS Spectrums*, 20(3), 280–286. <http://doi.org/10.1017/S1092852915000206>

Hor, K., & Taylor, M. (2010). Suicide and schizophrenia: a systematic review of rates and risk factors. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 24(4 Suppl), 81–90. <http://doi.org/10.1177/1359786810385490>

Howes, O. D., Kambeitz, J., Kim, E., Stahl, D., Slifstein, M., Abi-Dargham, A., & Kapur, S. (2012). The nature of dopamine dysfunction in schizophrenia and what this means for treatment. *Archives of General Psychiatry*, 69(8), 776–786. <http://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2012.169>

Howes, O., Mccutcheon, R., & Stone, J. (2016). Europe PMC Funders Group Glutamate and dopamine in schizophrenia : an update for the 21 st century, 29(2), 97–115. <http://doi.org/10.1177/0269881114563634.Glutamate>

Howland, J. G., Cazakoff, B. N., & Zhang, Y. (2012). Altered object-in-place recognition memory, prepulse inhibition, and locomotor activity in the offspring of rats exposed to a viral mimetic during pregnancy. *Neuroscience*, 201, 184–198. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.11.011>

Hsiao, E. Y., McBride, S. W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E. R., McCue, T., Mazmanian, S. K. (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155(7), 1451–1463. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.024>

Hubner, C. B., & Koob, G. F. (1990). The ventral pallidum plays a role in mediating cocaine and heroin self-administration in the rat. *Brain Research*, 508(1), 20–29.

Humphries, C., Mortimer, A., Hirsch, S., & de Belleruche, J. (1996). NMDA receptor mRNA correlation with antemortem cognitive impairment in schizophrenia. *Neuroreport*, 7(12), 2051–2055.

Hunt, G. E., Bergen, J., & Bashir, M. (2002). Medication compliance and comorbid substance abuse in schizophrenia: impact on community survival 4 years after a relapse. *Schizophrenia Research*, 54(3), 253–264.

Iancu, I., Bodner, E., Roitman, S., Piccone Sapir, A., Poreh, A., & Kotler, M. (2010). Impulsivity, aggression and suicide risk among male schizophrenia patients. *Psychopathology*, 43(4), 223–229. <http://doi.org/10.1159/000313520>

Ilani, T., Ben-Shachar, D., Strous, R. D., Mazor, M., Sheinkman, A., Kotler, M., & Fuchs, S. (2001). A peripheral marker for schizophrenia: Increased levels of D3 dopamine receptor mRNA in blood lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(2), 625–628. <http://doi.org/10.1073/pnas.021535398>

Jaaro-Peled, H., Ayhan, Y., Pletnikov, M. V., & Sawa, A. (2010). Review of pathological hallmarks of schizophrenia: comparison of genetic models with patients and nongenetic models. *Schizophrenia Bulletin*, 36(2), 301–313. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbp133>

Jablensky, A. (2010). The diagnostic concept of schizophrenia: its history, evolution, and

future prospects. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 12(3), 271–287.

Javitt, D. C. (2007). Glutamate and schizophrenia: phencyclidine, N-methyl-D-aspartate receptors, and dopamine-glutamate interactions. *International Review of Neurobiology*, 78, 69–108. [http://doi.org/10.1016/S0074-7742\(06\)78003-5](http://doi.org/10.1016/S0074-7742(06)78003-5)

Javitt, D. C. (2010). Glutamatergic theories of schizophrenia. *The Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences*, 47(1), 4–16.

Jenkins, T. A., Harte, M. K., & Reynolds, G. P. (2010). Effect of subchronic phencyclidine administration on sucrose preference and hippocampal parvalbumin immunoreactivity in the rat. *Neuroscience Letters*, 471(3), 144–147. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.01.028>

Jentsch, J. D., Taylor, J. R., Ph, D., Roth, R. H., & Ph, D. (1996). Subchronic Phencyclidine Administration Increases Mesolimbic Dopaminergic System Responsivity and Augments Stress- and Psychostimulant-Induced Hyperlocomotion, (98), 4–9.

Jentsch, J. D., Tran, A., Le, D., Youngren, K. D., & Roth, R. H. (1997). Subchronic phencyclidine administration reduces mesoprefrontal dopamine utilization and impairs prefrontal cortical-dependent cognition in the rat. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 17(2), 92–99. [http://doi.org/10.1016/S0893-133X\(97\)00034-1](http://doi.org/10.1016/S0893-133X(97)00034-1)

John, J. P., Rangaswamy, M., Thennarasu, K., Khanna, S., Nagaraj, R. B., Mukundan, C. R., & Pradhan, N. (2009). EEG power spectra differentiate positive and negative subgroups in neuroleptic-naive schizophrenia patients. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 21(2), 160–172. <http://doi.org/10.1176/jnp.2009.21.2.160>

Jones, C. A., Watson, D. J. G., F. K. C. F. (2011). Animal models of. *British Journal of Pharmacology*. <http://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x>

Kaalund, S. S., Newburn, E. N., Ye, T., Tao, R., Li, C., Deep-Soboslay, A., Kleinman, J. E. (2014). Contrasting changes in DRD1 and DRD2 splice variant expression in schizophrenia and affective disorders, and associations with SNPs in postmortem brain. *Molecular Psychiatry*, 19(12), 1258–1266. <http://doi.org/10.1038/mp.2013.165>

Kalivas, P. W., & McFarland, K. (2003). Brain circuitry and the reinstatement of cocaine-seeking behavior. *Psychopharmacology*, 168(1-2), 44–56. <http://doi.org/10.1007/s00213-003-1393-2>

Kalivas, P. W., & O'Brien, C. (2008a). Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(1), 166–180. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1301564>

Kalivas, P. W., & O'Brien, C. (2008b). Drug addiction as a pathology of staged neuroplasticity. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 33(1), 166–180. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1301564>

Kallmann, F. J. (1994). The genetic theory of schizophrenia. An analysis of 691 schizophrenic twin index families. 1946. *The American Journal of Psychiatry*, 151(6 Suppl), 188–198. <http://doi.org/10.1176/ajp.151.6.188>

Karlsson, R. M., Kircher, D. M., Shaham, Y., & O'Donnell, P. (2013). Exaggerated cue-induced reinstatement of cocaine seeking but not incubation of cocaine craving in a developmental rat model of schizophrenia. *Psychopharmacology*, 226(1), 45–51. <http://doi.org/10.1007/s00213-012-2882-y>

Kendell, R. E., & Kemp, I. W. (1989). Maternal influenza in the etiology of schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 46(10), 878–882.

Kendler, K. S. (1983). Overview: a current perspective on twin studies of schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*, 140(11), 1413–1425. <http://doi.org/10.1176/ajp.140.11.1413>

Kent, S., Bret-Dibat, J. L., Kelley, K. W., & Dantzer, R. (1996). Mechanisms of sickness-induced decreases in food-motivated behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 20(1), 171–175.

Kern, R. S., Glynn, S. M., Horan, W. P., & Marder, S. R. (2009). Psychosocial treatments to promote functional recovery in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 35(2), 347–361. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbn177>

Khantzian, E. J. (1997). The self-medication hypothesis of substance use disorders: a reconsideration and recent applications. *Harvard Review of Psychiatry*, 4(5), 231–244. <http://doi.org/10.3109/10673229709030550>

Khashan, A. S., Abel, K. M., McNamee, R., Pedersen, M. G., Webb, R. T., Baker, P. N., ... Mortensen, P. B. (2008). Higher risk of offspring schizophrenia following antenatal maternal exposure to severe adverse life events. *Archives of General Psychiatry*, 65(2), 146–152. <http://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2007.20>

Khokhar, J. Y., & Todd, T. P. (2017). Behavioral predictors of alcohol drinking in a neurodevelopmental rat model of schizophrenia and co-occurring alcohol use disorder. *Schizophrenia Research*. <http://doi.org/10.1016/j.schres.2017.02.029>

Kilpatrick, G. J., Jones, B. J., & Tyers, M. B. (1989). Binding of the 5-HT₃ ligand, [3H]GR65630, to rat area postrema, vagus nerve and the brains of several species. *European Journal of Pharmacology*, 159(2), 157–164.

Kim, J. S., Schmid-Burgk, W., Claus, D., & Kornhuber, H. H. (1982). Increased serum glutamate in depressed patients. *Archiv Fur Psychiatrie Und Nervenkrankheiten*, 232(4), 299–304.

Kim, Y. K., Kim, L., & Lee, M. S. (2000). Relationships between interleukins, neurotransmitters and psychopathology in drug-free male schizophrenics. *Schizophrenia Research*, 44(3), 165–175.

King, M. V., Seeman, P., Marsden, C. A., & Fone, K. C. F. (2009). Increased dopamine D₂High receptors in rats reared in social isolation. *Synapse (New York, N.Y.)*, 63(6), 476–483. <http://doi.org/10.1002/syn.20624>

Kleinschmidt, A., Falkai, P., Huang, Y., Schneider, T., Furst, G., & Steinmetz, H. (1994). In vivo morphometry of planum temporale asymmetry in first-episode schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 12(1), 9–18.

Kneeland, Rachel E, Fatemi, S. H. (2014). Viral infection, inflammation and schizophrenia.

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry, 1–34. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2012.02.001>. Viral

Koike, H., Arguello, P.A., Kvajo, M., Karayiorgou, M., & Gogos, J.A. (2006). Disc1 is mutated in the 129S6/SvEv strain and modulates working memory in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(10), 3693–3697. <http://doi.org/10.1073/pnas.0511189103>

Kokras, N., & Dalla, C. (2014). Sex differences in animal models of psychiatric disorders. *British Journal of Pharmacology*, 171(20), 4595–4619. <http://doi.org/10.1111/bph.12710>

Koob, G. F. (2008). A role for brain stress systems in addiction. *Neuron*, 59(1), 11–34. <http://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.012>

Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217–238. <http://doi.org/10.1038/npp.2010.4>

Koob, G., & Kreek, M. J. (2007). Stress, dysregulation of drug reward pathways, and the transition to drug dependence. *The American Journal of Psychiatry*, 164(8), 1149–1159. <http://doi.org/10.1176/appi.ajp.2007.05030503>

Kosaka, J., Takahashi, H., Ito, H., Takano, A., Fujimura, Y., Matsumoto, R., Suhara, T. (2010). Decreased binding of [¹¹C]NNC112 and [¹¹C]SCH23390 in patients with chronic schizophrenia. *Life Sciences*, 86(21-22), 814–818. <http://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.03.018>

Kosten, T. A., Sanchez, H., Zhang, X. Y., & Kehoe, P. (2004). Neonatal isolation enhances acquisition of cocaine self-administration and food responding in female rats. *Behavioural Brain Research*, 151(1-2), 137–149. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.08.010>

Kosten, T. A., Zhang, X. Y., & Kehoe, P. (2006). Heightened cocaine and food self-administration in female rats with neonatal isolation experience. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 31(1), 70–76. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1300779>

Krueger, D. D., Howell, J. L., Hebert, B. F., Olausson, P., Taylor, J. R., & Nairn, A. C. (2006). Assessment of cognitive function in the heterozygous reeler mouse. *Psychopharmacology*, 189(1), 95–104. <http://doi.org/10.1007/s00213-006-0530-0>

Krystal, J. H., Karper, L. P., Seibyl, J. P., Freeman, G. K., Delaney, R., Bremner, J. D., Charney, D. S. (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of General Psychiatry*, 51(3), 199–214.

Kucerova, J., Tabiova, K., Drago, F., & Micale, V. (2014). Therapeutic potential of cannabinoids in schizophrenia. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*, 9(1), 13–25.

Kumakura, Y., & Cumming, P. (2009). PET studies of cerebral levodopa metabolism: a review of clinical findings and modeling approaches. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 15(6), 635–650. <http://doi.org/10.1177/1073858409338217>

Kumari, V., Aasen, I., & Sharma, T. (2004). Sex differences in prepulse inhibition deficits in

chronic schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 69(2-3), 219–235.

Kumari, V., Soni, W., & Sharma, T. (1999). Normalization of information processing deficits in schizophrenia with clozapine. *The American Journal of Psychiatry*, 156(7), 1046–1051. <http://doi.org/10.1176/ajp.156.7.1046>

Kunugi, H., Nanko, S., Takei, N., Saito, K., Hayashi, N., & Kazamatsuri, H. (1995). Schizophrenia following in utero exposure to the 1957 influenza epidemics in Japan. *The American Journal of Psychiatry*, 152(3), 450–452. <http://doi.org/10.1176/ajp.152.3.450>

Kwak, Y. T., Koo, M. S., Choi, C. H., & Sunwoo, I. (2001). Change of dopamine receptor mRNA expression in lymphocyte of schizophrenic patients. *BMC Medical Genetics*, 2, 3.

Labouesse, M. a, Langhans, W., & Meyer, U. (2015). Abnormal context–reward associations in an immune-mediated neurodevelopmental mouse model with relevance to schizophrenia. *Translational Psychiatry*, 5(9), e637. <http://doi.org/10.1038/tp.2015.129>

Lai, C., Scarr, E., Udawela, M., Everall, I., Chen, W. J., Dean, B., Everall, I. (2016). Biomarkers in schizophrenia: a focus on blood based diagnostic and theranostic. *World Journal of Psychiatry*, 6(1), 102–117. <http://doi.org/10.5498/wjp.v6.i1.102>

Lang, U. E., Hellweg, R., Seifert, F., Schubert, F., & Gallinat, J. (2007). Correlation between serum brain-derived neurotrophic factor level and an in vivo marker of cortical integrity. *Biological Psychiatry*, 62(5), 530–535. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2007.01.002>

Lante, F., Meunier, J., Guiramand, J., De Jesus Ferreira, M.-C., Cambonie, G., Aimar, R., Barbanel, G. (2008). Late N-acetylcysteine treatment prevents the deficits induced in the offspring of dams exposed to an immune stress during gestation. *Hippocampus*, 18(6), 602–609. <http://doi.org/10.1002/hipo.20421>

Lapiz, M. D. S., Fulford, A., Muchimapura, S., Mason, R., Parker, T., & Marsden, C. A. (2003). Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 33(1), 13–29.

Laruelle, M., Abi-Dargham, A., Gil, R., Kegeles, L., & Innis, R. (1999). Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biological Psychiatry*, 46(1), 56–72.

Lavin, A., & Grace, A. A. (1994). Modulation of dorsal thalamic cell activity by the ventral pallidum: its role in the regulation of thalamocortical activity by the basal ganglia. *Synapse (New York, N.Y.)*, 18(2), 104–127. <http://doi.org/10.1002/syn.890180205>

Lawrie, S. M., & Abukmeil, S. S. (1998). Brain abnormality in schizophrenia. A systematic and quantitative review of volumetric magnetic resonance imaging studies. *The British Journal of Psychiatry : The Journal of Mental Science*, 172, 110–120.

Le Pen, G., Grottick, A. J., Higgins, G. A., Martin, J. R., Jenck, F., & Moreau, J. L. (2000). Spatial and associative learning deficits induced by neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats: further evaluation of an animal model of schizophrenia. *Behavioural Pharmacology*, 11(3-4), 257–268.

Legault, M., Rompre, P. P., & Wise, R. A. (2000). Chemical stimulation of the ventral hippocampus elevates nucleus accumbens dopamine by activating dopaminergic neurons of the

ventral tegmental area. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(4), 1635–1642.

Lehmann, J., Pryce, C. R., & Feldon, J. (1999). Sex differences in the acoustic startle response and prepulse inhibition in Wistar rats. *Behavioural Brain Research*, 104(1-2), 113–117.

Lenoir, M., Serre, F., Cantin, L., & Ahmed, S. H. (2007). Intense sweetness surpasses cocaine reward. *PLoS One*, 2(8), e698. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0000698>

Li, L., Du, Y., Li, N., Wu, X., & Wu, Y. (2009). Neuroscience and Biobehavioral Reviews Top – down modulation of prepulse inhibition of the startle reflex in humans and rats, 33, 1157–1167. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.02.001>

Li, N., Zhang, X., Dong, H., Zhang, S., Sun, J., & Qian, Y. (2016). Lithium Ameliorates LPS-Induced Astrocytes Activation Partly via Inhibition of Toll-Like Receptor 4 Expression. *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 38(2), 714–725. <http://doi.org/10.1159/000443028>

Li, Q., Cheung, C., Wei, R., Hui, E. S., Feldon, J., Meyer, U., McAlonan, G. M. (2009). Prenatal immune challenge is an environmental risk factor for brain and behavior change relevant to schizophrenia: evidence from MRI in a mouse model. *PLoS One*, 4(7), e6354. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0006354>

Lieberman, J. A., Bymaster, F. P., Meltzer, H. Y., Deutch, A. Y., Duncan, G. E., Marx, C. E., Csernansky, J. G. (2008). Antipsychotic drugs: comparison in animal models of efficacy, neurotransmitter regulation, and neuroprotection. *Pharmacological Reviews*, 60(3), 358–403. <http://doi.org/10.1124/pr.107.00107>

Lieberman, J. A., Kinon, B. J., & Loebel, A. D. (1990). Dopaminergic mechanisms in idiopathic and drug-induced psychoses. *Schizophrenia Bulletin*, 16(1), 97–110.

Lin, Y. L., & Wang, S. (2014). Prenatal lipopolysaccharide exposure increases depression-like behaviors and reduces hippocampal neurogenesis in adult rats. *Behavioural Brain Research*, 259, 24–34. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.10.034>

Ling, Z., Zhu, Y., Tong, C. W., Snyder, J. A., Lipton, J. W., & Carvey, P. M. (2009). Prenatal lipopolysaccharide does not accelerate progressive dopamine neuron loss in the rat as a result of normal aging. *Experimental Neurology*, 216(2), 312–320. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.12.004>

Lipina, T. V., Niwa, M., Jaaro-Peled, H., Fletcher, P. J., Seaman, P., Sawa, A., & Roder, J. C. (2010). Enhanced dopamine function in DISC1-L100P mutant mice: implications for schizophrenia. *Genes, Brain, and Behavior*, 9(7), 777–789. <http://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2010.00615.x>

Lipska, B. K., Jaskiw, G. E., & Weinberger, D. R. (1993). Postpubertal emergence of hyperresponsiveness to stress and to amphetamine after neonatal excitotoxic hippocampal damage: a potential animal model of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 9(1), 67–75. <http://doi.org/10.1038/npp.1993.44>

Liu, L., Jia, F., Yuan, G., Chen, Z., Yao, J., Li, H., & Fang, C. (2010). Tyrosine hydroxylase, inter-

leukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha are overexpressed in peripheral blood mononuclear cells from schizophrenia patients as determined by semi-quantitative analysis. *Psychiatry Research*, 176(1), 1–7. <http://doi.org/10.1016/j.psychres.2008.10.024>

Liu, L., Yuan, G., Cheng, Z., Zhang, G., Liu, X., & Zhang, H. (2013). Identification of the mRNA expression status of the dopamine D2 receptor and dopamine transporter in peripheral blood lymphocytes of schizophrenia patients. *PloS One*, 8(9), e75259. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0075259>

Liu, W. S., Pesold, C., Rodriguez, M. A., Carboni, G., Auta, J., Lacor, P., Costa, E. (2001). Down-regulation of dendritic spine and glutamic acid decarboxylase 67 expressions in the reelin haploinsufficient heterozygous reeler mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(6), 3477–3482. <http://doi.org/10.1073/pnas.051614698>

Liu, X., Lee, J. G., Yee, S. K., Bresee, C. J., Poland, R. E., & Pechnick, R. N. (2004). Endotoxin exposure in utero increases ethanol consumption in adult male offspring. *Neuroreport*, 15(1), 203–206.

Liu, Y. H., Li, X. Y., Chen, C. Y., Zhang, H. M., & Kang, J. X. (2015). Omega-3 fatty acid intervention suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation and weight loss in mice. *Marine Drugs*, 13(2), 1026–1036. <http://doi.org/10.3390/md13021026>

Loffler, S., Klimke, A., Kronenwett, R., Kobbe, G., Haas, R., & Fehsel, K. (2010). Clozapine mobilizes CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells and increases plasma concentration of interleukin 6 in patients with schizophrenia. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 30(5), 591–595. <http://doi.org/10.1097/JCP.0b013e3181eeb7f7>

Long, L. E., Chesworth, R., Arnold, J. C., & Karl, T. (2010). A follow-up study: acute behavioural effects of Delta(9)-THC in female heterozygous neuregulin I transmembrane domain mutant mice. *Psychopharmacology*, 211(3), 277–289. <http://doi.org/10.1007/s00213-010-1896-6>

Lowe, G. C., Luheshi, G. N., & Williams, S. (2008). Maternal infection and fever during late gestation are associated with altered synaptic transmission in the hippocampus of juvenile offspring rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(5), R1563–R1571. <http://doi.org/10.1152/ajpregu.90350.2008>

Ludewig, K., Geyer, M. A., & Vollenweider, F. X. (2003). Deficits in prepulse inhibition and habituation in never-medicated, first-episode schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 54(2), 121–128.

Mackay, A. V., Iversen, L. L., Rossor, M., Spokes, E., Bird, E., Arregui, A., Synder, S. H. (1982). Increased brain dopamine and dopamine receptors in schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 39(9), 991–997.

Malaspina, D., Harlap, S., Fennig, S., Heiman, D., Nahon, D., Feldman, D., & Susser, E. S. (2001). Advancing paternal age and the risk of schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 58(4), 361–367.

Malone, D. T., Kearns, C. S., Chongue, L., Mackie, K., & Taylor, D. A. (2008). Effect of social isolation on CBI and D2 receptor and fatty acid amide hydrolase expression in rats. *Neuroscience*, 152(1), 265–272. <http://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.10.043>

Mandt, B. H., Copenhagen, L. I., Zahniser, N. R., & Allen, R. M. (2015). Escalation of cocaine consumption in short and long access self-administration procedures. *Drug and Alcohol Dependence*, 149, 166–172. <http://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.01.039>

Mar, A. C., & Robbins, T. W. (2007). Delay discounting and impulsive choice in the rat. *Current Protocols in Neuroscience / Editorial Board, Jacqueline N. Crawley ... [et Al.]*, Chapter 8, Unit 8.22. <http://doi.org/10.1002/0471142301.ns0822s39>

Marco, E. M., Adriani, W., Llorente, R., Laviola, G., & Viveros, M.-P. (2009). Detrimental psychophysiological effects of early maternal deprivation in adolescent and adult rodents: altered responses to cannabinoid exposure. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 33(4), 498–507. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.008>

Marcondes, F. K., Miguel, K. J., Melo, L. L., & Spadari-Bratfisch, R. C. (2001). Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology & Behavior*, 74(4-5), 435–440.

Marsden, C. A., King, M. V., & Fone, K. C. F. (2011). Influence of social isolation in the rat on serotonergic function and memory--relevance to models of schizophrenia and the role of 5-HT(6) receptors. *Neuropharmacology*, 61(3), 400–407. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.03.003>

Mas, S., Gasso, P., Parellada, E., Bernardo, M., & Lafuente, A. (2015). Network analysis of gene expression in peripheral blood identifies mTOR and NF-kappaB pathways involved in antipsychotic-induced extrapyramidal symptoms. *The Pharmacogenomics Journal*, 15(5), 452–460. <http://doi.org/10.1038/tpj.2014.84>

Mathalon, D. H., Ford, J. M., & Pfefferbaum, A. (2000). Trait and state aspects of P300 amplitude reduction in schizophrenia: a retrospective longitudinal study. *Biological Psychiatry*, 47(5), 434–449.

Matricon, J., Bellon, A., Frieling, H., Kebir, O., Le Pen, G., Beuvon, F., Krebs, M.-O. (2010). Neuropathological and Reelin deficiencies in the hippocampal formation of rats exposed to MAM; differences and similarities with schizophrenia. *PloS One*, 5(4), e10291. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0010291>

Matsumoto, H., Simmons, A., Williams, S., Pipe, R., Murray, R., & Frangou, S. (2001). Structural magnetic imaging of the hippocampus in early onset schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 49(10), 824–831.

McGorry, P. D., Nelson, B., Goldstone, S., & Yung, A. R. (2010). Clinical staging: a heuristic and practical strategy for new research and better health and social outcomes for psychotic and related mood disorders. *Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne de Psychiatrie*, 55(8), 486–497. <http://doi.org/10.1177/070674371005500803>

McGrath, J., Brown, A., & St Clair, D. (2011). Prevention and schizophrenia--the role of dietary factors. *Schizophrenia Bulletin*, 37(2), 272–283. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbq121>

McGrath, J., & Castle, D. (1995). Does influenza cause schizophrenia? A five year review. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*, 29(1), 23–31.

McGregor, A., & Roberts, D. C. (1993). Dopaminergic antagonism within the nucleus accumbens or the amygdala produces differential effects on intravenous cocaine self-administration under fixed and progressive ratio schedules of reinforcement. *Brain Research*, 624(1-2), 245–252.

McKenna, F., McLaughlin, P. J., Lewis, B. J., Sibbring, G. C., Cummerson, J. A., Bowen-Jones, D., & Moots, R. J. (2002). Dopamine receptor expression on human T- and B-lymphocytes, monocytes, neutrophils, eosinophils and NK cells: a flow cytometric study. *Journal of Neuroimmunology*, 132(1-2), 34–40.

Meincke, U., Light, G. A., Geyer, M. A., Braff, D. L., & Gouzoulis-Mayfrank, E. (2004). Sensitization and habituation of the acoustic startle reflex in patients with schizophrenia. *Psychiatry Research*, 126(1), 51–61. <http://doi.org/10.1016/j.psychres.2004.01.003>

Melendez, R. I., Rodd, Z. A., McBride, W. J., & Murphy, J. M. (2004). Involvement of the mesopallidal dopamine system in ethanol reinforcement. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 32(2), 137–144. <http://doi.org/10.1016/j.alcohol.2003.12.002>

Messias, E. L., Chen, C. Y., & Eaton, W. W. (2007). Epidemiology of Schizophrenia: Review of Findings and Myths. *Psychiatric Clinics of North America*, 30(3), 323–338. <http://doi.org/10.1016/j.psc.2007.04.007>

Meyer, U., Knuesel, I., Nyffeler, M., & Feldon, J. (2010). Chronic clozapine treatment improves prenatal infection-induced working memory deficits without influencing adult hippocampal neurogenesis. *Psychopharmacology*, 208(4), 531–543. <http://doi.org/10.1007/s00213-009-1754-6>

Meyer, U., Nyffeler, M., Engler, A., Urwyler, A., Schedlowski, M., Knuesel, I., Feldon, J. (2006). The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated brain and behavioral pathology. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(18), 4752–4762. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0099-06.2006>

Meyer, U., Nyffeler, M., Yee, B. K., Knuesel, I., & Feldon, J. (2008). Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(4), 469–486. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2007.09.012>

Miles, J., Shevlin, M. (2001). *Applying Regression and Correlation: A Guide for Students and Researchers*. (First edit). London.

Moffett, M. C., Harley, J., Francis, D., Sanghani, S. P., Davis, W. I., & Kuhar, M. J. (2006). Maternal separation and handling affects cocaine self-administration in both the treated pups as adults and the dams. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 317(3), 1210–1218. <http://doi.org/10.1124/jpet.106.101139>

Moller, C., Wiklund, L., Sommer, W., Thorsell, A., & Heilig, M. (1997). Decreased experimental anxiety and voluntary ethanol consumption in rats following central but not basolateral amygdala lesions. *Brain Research*, 760(1-2), 94–101.

Moore, H., Jentsch, J. D., Ghajarnia, M., Geyer, M. A., & Grace, A. A. (2006). A neurobehavio-

ral systems analysis of adult rats exposed to methylazoxymethanol acetate on E17: implications for the neuropathology of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 60(3), 253–264. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2006.01.003>

Moraes, M. M. T., Galvao, M. C., Cabral, D., Coelho, C. P., Queiroz-Hazarbassanov, N., Martins, M. F. M., ... Kirsten, T. B. (2017). Propentofylline prevents sickness behavior and depressive-like behavior induced by lipopolysaccharide in rats via neuroinflammatory pathway. *PLoS ONE*, 12(1), 1–18. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0169446>

Morgan, C. J. A., & Curran, H. V. (2006). Acute and chronic effects of ketamine upon human memory: a review. *Psychopharmacology*, 188(4), 408–424. <http://doi.org/10.1007/s00213-006-0572-3>

Murray, J. E., Belin-rauscent, A., Simon, M., Giuliano, C., Benoit-marand, M., Everitt, B. J., & Belin, D. (2015). dependent cocaine-seeking habits. *Nature Communications*, 6, 1–9. <http://doi.org/10.1038/ncomms10088>

Naqvi, H. A. (2008). Schizophrenia: a concept. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 58(3), 133–137.

Neisewander, J. L., Peartree, N. A., & Pentkowski, N. S. (2012). Emotional valence and context of social influences on drug abuse-related behavior in animal models of social stress and prosocial interaction. *Psychopharmacology*, 224(1), 33–56. <http://doi.org/10.1007/s00213-012-2853-3>

Nelson, M. D., Saykin, A. J., Flashman, L. A., & Riordan, H. J. (1998). Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study. *Archives of General Psychiatry*, 55(5), 433–440.

Nestler, E. J. (2005). The neurobiology of cocaine addiction. *Science & Practice Perspectives / a Publication of the National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health*, 3(1), 4–10. <http://doi.org/10.1151/spp05314>

Newell, K. A., Zavitsanou, K., & Huang, X.-F. (2007). Opposing short- and long-term effects on muscarinic M1/4 receptor binding following chronic phencyclidine treatment. *Journal of Neuroscience Research*, 85(6), 1358–1363. <http://doi.org/10.1002/jnr.21247>

Ng, E., McGirr, A., Wong, A. H. C., & Roder, J. C. (2013). Using rodents to model schizophrenia and substance use comorbidity. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(5), 896–910. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.03.025>

Nordentoft, M., Madsen, T., & Fedyszyn, I. (2015). Suicidal behavior and mortality in first-episode psychosis. *The Journal of Nervous and Mental Disease*, 203(5), 387–392. <http://doi.org/10.1097/NMD.0000000000000296>

O'Reilly, B., Vander, A. J., & Kluger, M. J. (1988). Effects of chronic infusion of lipopolysaccharide on food intake and body temperature of the rat. *Physiology & Behavior*, 42(3), 287–291.

O'Tuathaigh, C. M. P., Kirby, B. P., Moran, P. M., & Waddington, J. L. (2010). Mutant mouse models: genotype-phenotype relationships to negative symptoms in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 36(2), 271–288. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbp125>

Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías. (2016). Informe 2016.

Ohnuma, T., Sakai, Y., Maeshima, H., Hatano, T., Hanzawa, R., Abe, S., Arai, H. (2008). Changes in plasma glycine, L-serine, and D-serine levels in patients with schizophrenia as their clinical symptoms improve: results from the Juntendo University Schizophrenia Projects (JUSP). *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 32(8), 1905–1912. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2008.07.022>

Ohnuma, T., Sakai, Y., Maeshima, H., Higa, M., Hanzawa, R., Kitazawa, M., Arai, H. (2012). No correlation between plasma NMDA-related glutamatergic amino acid levels and cognitive function in medicated patients with schizophrenia. *International Journal of Psychiatry in Medicine*, 44(1), 17–27. <http://doi.org/10.2190/PM.44.1.b>

Olds, J., & Milner, P. (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 47(6), 419–427.

Olney, J. W., & Farber, N. B. (1995). Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Archives of General Psychiatry*, 52(12), 998–1007.

Ozawa, K., Hashimoto, K., Kishimoto, T., Shimizu, E., Ishikura, H., & Iyo, M. (2006). Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 59(6), 546–554. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.07.031>

Paintlia, M. K., Paintlia, A. S., Contreras, M.A., Singh, I., & Singh, A. K. (2008). Lipopolysaccharide-induced peroxisomal dysfunction exacerbates cerebral white matter injury: attenuation by N-acetyl cysteine. *Experimental Neurology*, 210(2), 560–576. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.12.011>

Palmer, B. A., Pankratz, V. S., & Bostwick, J. M. (2005). The lifetime risk of suicide in schizophrenia: a reexamination. *Archives of General Psychiatry*, 62(3), 247–253. <http://doi.org/10.1001/archpsyc.62.3.247>

Papaleo, F., Yang, F., Garcia, S., Chen, J., Lu, B., Crawley, J. N., & Weinberger, D. R. (2012). Dysbindin-1 modulates prefrontal cortical activity and schizophrenia-like behaviors via dopamine/D2 pathways. *Molecular Psychiatry*, 17(1), 85–98. <http://doi.org/10.1038/mp.2010.106>

Pariante, C. M., Vassilopoulou, K., Velakoulis, D., Phillips, L., Soulsby, B., Wood, S. J., ... Pantelis, C. (2004). Pituitary volume in psychosis. *The British Journal of Psychiatry: The Journal of Mental Science*, 185, 5–10.

Pattij, T., & De Vries, T. J. (2013). The role of impulsivity in relapse vulnerability. *Current Opinion in Neurobiology*, 23(4), 700–705. <http://doi.org/10.1016/j.conb.2013.01.023>

Pautassi, R. M., Nizhnikov, M. E., Fabio, M. C., & Spear, N. E. (2012). Early maternal separation affects ethanol-induced conditioning in a nor-BNI insensitive manner, but does not alter ethanol-induced locomotor activity. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 100(3), 630–638. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.11.005>

Pearce, R. K., Seeman, P., Jellinger, K., & Tourtellotte, W. W. (1990). Dopamine uptake sites

and dopamine receptors in Parkinson's disease and schizophrenia. *European Neurology*, 30 Suppl 1, 9–14.

Pennartz, C. M., Groenewegen, H. J., & Lopes da Silva, F. H. (1994). The nucleus accumbens as a complex of functionally distinct neuronal ensembles: an integration of behavioural, electrophysiological and anatomical data. *Progress in Neurobiology*, 42(6), 719–761.

Penteado, S. H. W., Teodorov, E., Kirsten, T. B., Eluf, B. P., Reis-Silva, T. M., Acenjo, M. K., Bernardi, M. M. (2014). Prenatal lipopolysaccharide disrupts maternal behavior, reduces nest odor preference in pups, and induces anxiety: Studies of F1 and F2 generations. *European Journal of Pharmacology*, 738, 342–351. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.05.058>

Peñasco, S., Mela, V., López-moreno, J. A., Viveros, M., & Marco, E. M. (2015). Early Maternal Deprivation Enhances Voluntary Alcohol Intake Induced by Exposure to Stressful Events Later in Life, 2015. <http://doi.org/10.1155/2015/342761>

Perry, J. L., Larson, E. B., German, J. P., Madden, G. J., & Carroll, M. E. (2005). Impulsivity (delay discounting) as a predictor of acquisition of IV cocaine self-administration in female rats. *Psychopharmacology*, 178(2-3), 193–201. <http://doi.org/10.1007/s00213-004-1994-4>

Pfammatter, M., Junghan, U. M., & Brenner, H. D. (2006). Efficacy of psychological therapy in schizophrenia: conclusions from meta-analyses. *Schizophrenia Bulletin*, 32 Suppl 1, S64–80. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbl030>

Pickard, B. S. (2015). Schizophrenia biomarkers: translating the descriptive into the diagnostic. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*, 29(2), 138–143. <http://doi.org/10.1177/0269881114566631>

Pickens, R., & Thompson, T. (1968). Cocaine-reinforced behavior in rats: effects of reinforcement magnitude and fixed-ratio size. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 161(1), 122–129.

Pierce, R. C., & Kalivas, P. W. (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 25(2), 192–216.

Pierce, R. C., & Kumaresan, V. (2006). The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 30(2), 215–238. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.016>

Pletnikov, M. V., Ayhan, Y., Nikolskaia, O., Xu, Y., Ovanesov, M. V., Huang, H., Ross, C. A. (2008). Inducible expression of mutant human DISC1 in mice is associated with brain and behavioral abnormalities reminiscent of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 13(2), 115, 173–186. <http://doi.org/10.1038/sj.mp.4002079>

Pogarell, O., Koch, W., Karch, S., Dehning, S., Muller, N., Tatsch, K., Moller, H.-J. (2012). Dopaminergic neurotransmission in patients with schizophrenia in relation to positive and negative symptoms. *Pharmacopsychiatry*, 45 Suppl 1, S36–41. <http://doi.org/10.1055/s-0032-1306313>

Porteous, D. J., Thomson, P., Brandon, N. J., & Millar, J. K. (2006). The genetics and biology of DISC1--an emerging role in psychosis and cognition. *Biological Psychiatry*, 60(2), 123–131.

<http://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2006.04.008>

Poulos, C. X., Le, A. D., & Parker, J. L. (1995). Impulsivity predicts individual susceptibility to high levels of alcohol self-administration. *Behavioural Pharmacology*, 6(8), 810–814.

Rahman, M. (2006). *Introduction to Flow Cytometry*. Bio-Rad company.

Ramos, J., Cerdan, L. F., Guevara, M. A., Amezcua, C., & Sanz, A. (2001). Abnormal EEG patterns in treatment-resistant schizophrenic patients. *The International Journal of Neuroscience*, 109(1-2), 47–59.

Rea, L. M., Parker, R. A. (2014). *Designing and Conducting Survey Research: A Comprehensive Guide*. (4th editio). Jossey-Bass.

Reilly, W., Koirala, B., & Devaud, L. L. (2009). Sex differences in acoustic startle responses and seizure thresholds between ethanol-withdrawn male and female rats. *Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)*, 44(6), 561–566. <http://doi.org/10.1093/alcalc/agg049>

Reith, J., Benkelfat, C., Sherwin, A., Yasuhara, Y., Kuwabara, H., Andermann, F., Gjedde, A. (1994). Elevated dopa decarboxylase activity in living brain of patients with psychosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(24), 11651–11654.

Ribeiro, D. E., Maiolini, V. M., Soncini, R., Antunes-Rodrigues, J., Elias, L. L. K., Vilela, F. C., & Giusti-Paiva, A. (2013). Inhibition of nitric oxide synthase accentuates endotoxin-induced sickness behavior in mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 103(3), 535–540. <http://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.09.022>

Richardson, N. R., & Roberts, D. C. (1996). Progressive ratio schedules in drug self-administration studies in rats: a method to evaluate reinforcing efficacy. *Journal of Neuroscience Methods*, 66(1), 1–11.

Richtand, N. M., Ahlbrand, R., Horn, P. S., Chambers, B., Davis, J., & Benoit, S. (2012). Effects of prenatal immune activation and peri-adolescent stress on amphetamine-induced conditioned place preference in the rat, 313–324. <http://doi.org/10.1007/s00213-012-2646-8>

Riecher-Rossler, A., & Hafner, H. (2000). Gender aspects in schizophrenia: bridging the border between social and biological psychiatry. *Acta Psychiatrica Scandinavica. Supplementum*, (407), 58–62.

Roberts, D. C. S., Gabriele, A., & Zimmer, B. A. (2013). Conflation of cocaine seeking and cocaine taking responses in IV self-administration experiments in rats: methodological and interpretational considerations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37(9 Pt A), 2026–2036. <http://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.017>

Robinson, T. E., & Becker, J. B. (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Research*, 396(2), 157–198.

Robledo, P., & Koob, G. F. (1993). Two discrete nucleus accumbens projection areas differentially mediate cocaine self-administration in the rat. *Behavioural Brain Research*, 55(2), 159–166.

Roche, M., Kelly, J. P., Driscoll, M. O., & Finn, P. (2008). Augmentation of endogenous cannabinoid tone modulates lipopolysaccharide-induced alterations in circulating cytokine levels in rats, 263–271. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.02838.x>

Roman, E., Hyytia, P., & Nylander, I. (2003). Maternal separation alters acquisition of ethanol intake in male ethanol-preferring AA rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 27(1), 31–37. <http://doi.org/10.1097/01.ALC.0000047352.88145.80>

Roman, E., Ploj, K., & Nylander, I. (2004). Maternal separation has no effect on voluntary ethanol intake in female Wistar rats. *Alcohol (Fayetteville, N.Y.)*, 33(1), 31–39. <http://doi.org/10.1016/j.alcohol.2004.04.002>

Romero, E., Ali, C., Molina-Holgado, E., Castellano, B., Guaza, C., & Borrell, J. (2007). Neurobehavioral and immunological consequences of prenatal immune activation in rats. Influence of antipsychotics. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32(8), 1791–1804. <http://doi.org/10.1038/sj.npp.1301292>

Romero, E., Guaza, C., Castellano, B., & Borrell, J. (2010). Ontogeny of sensorimotor gating and immune impairment induced by prenatal immune challenge in rats: implications for the etiopathology of schizophrenia. *Molecular Psychiatry*, 15(4), 372–383. <http://doi.org/10.1038/mp.2008.44>

Rorato, R., Reis, W. L., de Carvalho Borges, B., Antunes-Rodrigues, J., & Elias, L. L. K. (2012). Cannabinoid CB(1) receptor restrains accentuated activity of hypothalamic corticotropin-releasing factor and brainstem tyrosine hydroxylase neurons in endotoxemia-induced hypophagia in rats. *Neuropharmacology*, 63(1), 154–160. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.11.009>

Ruiz, J. S., De, D. C., Sánchez, V., & Páez, S. (2010). The Neurobiological Basis of Schizophrenia Bases Neurobiológicas de la Esquizofrenia, 21. <http://doi.org/10.5093/cl2010v21n3a3>

Russig, H., Durrer, A., Yee, B. K., Murphy, C. A., & Feldon, J. (2003). The acquisition, retention and reversal of spatial learning in the morris water maze task following withdrawal from an escalating dosage schedule of amphetamine in wistar rats. *Neuroscience*, 119(1), 167–179.

Sahin, S., Yuksel, C., Guler, J., Karadayi, G., Akturan, E., Gode, E., Uçok, A. (2013). The history of childhood trauma among individuals with ultra high risk for psychosis is as common as among patients with first-episode schizophrenia. *Early Intervention in Psychiatry*, 7(4), 414–420. <http://doi.org/10.1111/eip.12022>

Sams-Dodd, F. (1995). Distinct effects of d-amphetamine and phencyclidine on the social behaviour of rats. *Behavioural Pharmacology*, 6(1), 55–65.

Sams-Dodd, F. (1996). Phencyclidine-induced stereotyped behaviour and social isolation in rats: a possible animal model of schizophrenia. *Behavioural Pharmacology*, 7(1), 3–23.

Sams-Dodd, F., Lipska, B. K., & Weinberger, D. R. (1997). Neonatal lesions of the rat ventral hippocampus result in hyperlocomotion and deficits in social behaviour in adulthood. *Psychopharmacology*, 132(3), 303–310.

Sanfilipo, M., Lafargue, T., Rusinek, H., Arena, L., Loneragan, C., Lautin, A., Wolkin, A. (2000). Volumetric measure of the frontal and temporal lobe regions in schizophrenia: relationship to

negative symptoms. *Archives of General Psychiatry*, 57(5), 471–480.

Santambrogio, L., Lipartiti, M., Bruni, A., & Dal Toso, R. (1993). Dopamine receptors on human T- and B-lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology*, 45(1-2), 113–119.

Scalzo, F. M., & Holson, R. R. (1992). The ontogeny of behavioral sensitization to phencyclidine. *Neurotoxicology and Teratology*, 14(1), 7–14.

Scheepers, F. E., Gispen de Wied, C. C., Hulshoff Pol, H. E., & Kahn, R. S. (2001). Effect of clozapine on caudate nucleus volume in relation to symptoms of schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*, 158(4), 644–646. <http://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.4.644>

Schmajuk, N. A., Christiansen, B., & Cox, L. (2000). Haloperidol reinstates latent inhibition impaired by hippocampal lesions: data and theory. *Behavioral Neuroscience*, 114(4), 659–670.

Schmidt, L. M., Hesse, M., & Lykke, J. (2011). The impact of substance use disorders on the course of schizophrenia--a 15-year follow-up study: dual diagnosis over 15 years. *Schizophrenia Research*, 130(1-3), 228–233. <http://doi.org/10.1016/j.schres.2011.04.011>

Scola, G., & Duong, A. (2017). Perspective prenatal maternal immune activation and brain 346, 403–408.

Seeman, P., Guan, H. C., & Van Tol, H. H. (1993). Dopamine D4 receptors elevated in schizophrenia. *Nature*, 365(6445), 441–445. <http://doi.org/10.1038/365441a0>

Seeman, P., Niznik, H. B., Guan, H. C., Booth, G., & Ulpian, C. (1989). Link between D1 and D2 dopamine receptors is reduced in schizophrenia and Huntington diseased brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(24), 10156–10160.

Seeman, P., Schwarz, J., Chen, J.-F., Szechtman, H., Perreault, M., McKnight, G. S., ... Sumiyoshi, T. (2006). Psychosis pathways converge via D2high dopamine receptors. *Synapse (New York, N.Y.)*, 60(4), 319–346. <http://doi.org/10.1002/syn.20303>

Seillier, A., & Giuffrida, A. (2009). Evaluation of NMDA receptor models of schizophrenia : Divergences in the behavioral effects of sub-chronic PCP and MK-801, 204, 410–415. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2009.02.007>

Self, D. W. (1998). Neural substrates of drug craving and relapse in drug addiction. *Annals of Medicine*, 30(4), 379–389.

Self, D. W., Barnhart, W. J., Lehman, D. A., & Nestler, E. J. (1996). Opposite modulation of cocaine-seeking behavior by D1- and D2-like dopamine receptor agonists. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5255), 1586–1589.

Self, D. W., & Nestler, E. J. (1998). Relapse to drug-seeking: neural and molecular mechanisms. *Drug and Alcohol Dependence*, 51(1-2), 49–60.

Shalev, U. (2002). Neurobiology of Relapse to Heroin and Cocaine Seeking: A Review. *Pharmacological Reviews*, 54(1), 1–42. <http://doi.org/10.1124/pr.54.1.1>

Shen, S., Lang, B., Nakamoto, C., Zhang, F., Pu, J., Kuan, S.-L., St Clair, D. (2008). Schizophrenia-related neural and behavioral phenotypes in transgenic mice expressing truncated Discl. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 28(43), 10893–10904. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3299-08.2008>

Shenton, M. E., Dickey, C. C., Frumin, M., & McCarley, R. W. (2001). A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophrenia Research*, 49(1-2), 1–52.

Shi, L., Fatemi, S. H., Sidwell, R. W., & Patterson, P. H. (2003). Maternal influenza infection causes marked behavioral and pharmacological changes in the offspring. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(1), 297–302.

Shokrgozar, S., Ahmadi, R., Yousefnezhad, A., Roshandelrad, M., Khosravi, T., Ellahi, M., Eskandari, A. (2015). Drug Addiction in Patients With Chronic Schizophrenia and Its Relation With Psychopathology and Impulsiveness. *Global Journal of Health Science*, 7(7 Spec No), 131–136. <http://doi.org/10.5539/gjhs.v7n7p131>

Shoval, G., & Weizman, A. (2005). The possible role of neurotrophins in the pathogenesis and therapy of schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology : The Journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 15(3), 319–329. <http://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2004.12.005>

Silvestri, S., Seeman, M. V., Negrete, J. C., Houle, S., Shammi, C. M., Remington, G. J., ... Seeman, P. (2000). Increased dopamine D2 receptor binding after long-term treatment with antipsychotics in humans: a clinical PET study. *Psychopharmacology*, 152(2), 174–180.

Simeone, J. C., Ward, A. J., Rotella, P., Collins, J., & Windisch, R. (2015). An evaluation of variation in published estimates of schizophrenia prevalence from 1990-2013 : a systematic literature review, 1–14. <http://doi.org/10.1186/s12888-015-0578-7>

Smith, S. E. P., Li, J., Garbett, K., Mirnics, K., & Patterson, P. H. (2007). Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(40), 10695–10702. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007>

Sokolov, B. P. (1998). Expression of NMDAR1, GluR1, GluR7, and KAI1 glutamate receptor mRNAs is decreased in frontal cortex of “neuroleptic-free” schizophrenics: evidence on reversible up-regulation by typical neuroleptics. *Journal of Neurochemistry*, 71(6), 2454–2464.

Song, J., Viggiano, A., Monda, M., & De Luca, V. (2014). Peripheral glutamate levels in schizophrenia: evidence from a meta-analysis. *Neuropsychobiology*, 70(3), 133–141. <http://doi.org/10.1159/000364828>

Sorensen, H. J., Mortensen, E. L., Reinisch, J. M., & Mednick, S. A. (2009). Association between prenatal exposure to bacterial infection and risk of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 35(3), 631–637. <http://doi.org/10.1093/schbul/sbn121>

Sourlingas, T. G., Issidorides, M. R., Alevizos, B., Kontaxakis, V. P., Chrysanthou-Piterou, M., Livaniou, E., Sekeri-Pataryas, K. E. (2003). Lymphocytes from bipolar and schizophrenic patients share common biochemical markers related to histone synthesis and histone cell membrane localization characteristic of an activated state. *Psychiatry Research*, 118(1), 55–67.

Strassmann, G., Fong, M., Windsor, S., & Neta, R. (1993). The role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced weight loss, hypoglycemia and fibrinogen production, in vivo. *Cytokine*, 5(4), 285–290.

Stewart, J. (2000). Pathways to relapse: the neurobiology of drug- and stress-induced relapse to drug-taking. *Journal of Psychiatry & Neuroscience* : JPN, 25(2), 125–136.

Straley, M. E., Oeffelen, W. Van, Theze, S., Sullivan, A. M., Mahony, S. M. O., Cryan, J. F., & Keeffe, G. W. O. (2016). Brain, Behavior, and Immunity Distinct alterations in motor & reward seeking behavior are dependent on the gestational age of exposure to LPS-induced maternal immune activation. *Brain Behavior and Immunity*. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.002>

Strober, W. (2001). Monitoring cell growth. *Current Protocols in Immunology*, Appendix 3, Appendix 3A. <http://doi.org/10.1002/0471142735.ima03as21>

Sumiyoshi, T., Stockmeier, C. A., Overholser, J. C., Thompson, P. A., & Meltzer, H. Y. (1995). Dopamine D4 receptors and effects of guanine nucleotides on [³H]raclopride binding in post-mortem caudate nucleus of subjects with schizophrenia or major depression. *Brain Research*, 681(1-2), 109–116.

Swerdlow, N. R., Braff, D. L., Taaid, N., & Geyer, M. A. (1994). Assessing the validity of an animal model of deficient sensorimotor gating in schizophrenic patients. *Archives of General Psychiatry*, 51(2), 139–154.

Swerdlow, N. R., & Geyer, M. A. (1998). Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 24(2), 285–301.

Swerdlow, N. R., Martinez, Z. A., Hanlon, F. M., Platten, A., Farid, M., Auerbach, P., Geyer, M. A. (2000). Toward understanding the biology of a complex phenotype: rat strain and substrain differences in the sensorimotor gating-disruptive effects of dopamine agonists. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 20(11), 4325–4336.

Swiergiel, A. H., & Dunn, A. J. (1999). The roles of IL-1, IL-6, and TNF α in the feeding responses to endotoxin and influenza virus infection in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 13(3), 252–265. <http://doi.org/10.1006/brbi.1999.0565>

Tandon, N., Bolo, N. R., Sanghavi, K., Mathew, I. T., Francis, A. N., Stanley, J. A., & Keshavan, M. S. (2013). Brain metabolite alterations in young adults at familial high risk for schizophrenia using proton magnetic resonance spectroscopy. *Schizophrenia Research*, 148(1-3), 59–66. <http://doi.org/10.1016/j.schres.2013.05.024>

Tesone-Coelho, C., Morel, L. J., Bhatt, J., Estevez, L., Naudon, L., Giros, B., Dauge, V. (2015). Vulnerability to opiate intake in maternally deprived rats: implication of MeCP2 and of histone acetylation. *Addiction Biology*, 20(1), 120–131. <http://doi.org/10.1111/adb.12084>

Thompson, T., & Schuster, C. R. (1964). Morphine self-administration, food-reinforced, and avoidance behaviors in rhesus monkeys. *Psychopharmacologia*, 5, 87–94.

Todd, C. L., & Grace, A. A. (1999). Modulation of ventral tegmental area dopamine cell activity by the ventral subiculum and entorhinal cortex. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877, 688–690.

Tollner, B., Roth, J., Storr, B., Martin, D., Voigt, K., & Zeisberger, E. (2000). The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection

of a high dose of lipopolysaccharide. *Pflugers Archiv : European Journal of Physiology*, 440(6), 925–932.

Tunbridge, E. M., Harrison, P. J., & Weinberger, D. R. (2006). Catechol-o-methyltransferase, cognition, and psychosis: Val158Met and beyond. *Biological Psychiatry*, 60(2), 141–151. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.10.024>

Turner, T. (1997). *Schizophrenia Aetiology*, 315(July).

Umbricht, D., & Krljes, S. (2005). Mismatch negativity in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophrenia Research*, 76(1), 1–23. <http://doi.org/10.1016/j.schres.2004.12.002>

Urakubo, A., Jarskog, L. F., Lieberman, J. a., & Gilmore, J. H. (2001). Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain. *Schizophrenia Research*, 47(1), 27–36. [http://doi.org/10.1016/S0920-9964\(00\)00032-3](http://doi.org/10.1016/S0920-9964(00)00032-3)

Van den Buuse, M., Garner, B., & Koch, M. (2003). Neurodevelopmental animal models of schizophrenia: effects on prepulse inhibition. *Current Molecular Medicine*, 3(5), 459–471.

Van Os, J., Fahy, T.A., Jones, P., Harvey, I., Sham, P., Lewis, S., Murray, R. (1996). Psychopathological syndromes in the functional psychoses: associations with course and outcome. *Psychological Medicine*, 26(1), 161–176.

Van Os, J., Gilvarry, C., Bale, R., van Horn, E., Tattan, T., White, I., & Murray, R. (1999). To what extent does symptomatic improvement result in better outcome in psychotic illness? UK700 Group. *Psychological Medicine*, 29(5), 1183–1195.

Vanderschuren, L. J. M. J., & Ahmed, S. H. (2013). *Animal Studies of Addictive Behavior*.

Vanderschuren, L. J. M. J., & Everitt, B. J. (2004). Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science (New York, N.Y.)*, 305(5686), 1017–1019. <http://doi.org/10.1126/science.1098975>

Vanderschuren, L. J. M. J., & Everitt, B. J. (2005). Behavioral and neural mechanisms of compulsive drug seeking. *European Journal of Pharmacology*, 526(1-3), 77–88. <http://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.09.037>

Vogel, M., Busse, S., Freyberger, H. J., & Jo, H. (2006). Dopamine D3 receptor and schizophrenia : A widened scope for the immune hypothesis, 354–358. <http://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.01.044>

Vogel, M., Pfeifer, S., Schaub, R. T., Grabe, H.-J., Barnow, S., Freyberger, H. J., & Cascorbi, I. (2004). Decreased levels of dopamine D3 receptor mRNA in schizophrenic and bipolar patients. *Neuropsychobiology*, 50(4), 305–310. <http://doi.org/10.1159/000080958>

Vos, T., Flaxman, A. D., Naghavi, M., Lozano, R., Michaud, C., Ezzati, M., Memish, Z.A. (2012). Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet (London, England)*, 380(9859), 2163–2196. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61729-2](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61729-2)

Wang, H., Meng, X.-H., Ning, H., Zhao, X.-F., Wang, Q., Liu, P., Xu, D.-X. (2010). Age- and gender-dependent impairments of neurobehaviors in mice whose mothers were exposed to lipopolysaccharide during pregnancy. *Toxicology Letters*, 192(2), 245–251. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.12.011>

toxlet.2009.10.030

Waterhouse, U., Brennan, K. A., & Ellenbroek, B. A. (2017). Nicotine self-administration reverses cognitive deficits in a rat model for schizophrenia. *Addiction Biology*, n/a–n/a. <http://doi.org/10.1111/adb.12517>

Wee, S., Specio, S. E., & Koob, G. F. (2007). Effects of Dose and Session Duration on Cocaine Self-Administration in Rats, 320(3), 1134–1143. <http://doi.org/10.1124/jpet.106.113340.stable>

Weeks, J. R. (1962). Experimental morphine addiction: method for automatic intravenous injections in unrestrained rats. *Science (New York, N.Y.)*, 138(3537), 143–144.

Weickert, C. S., Rothmond, D. A., Hyde, T. M., Kleinman, J. E., & Straub, R. E. (2008). Reduced DTNBP1 (dysbindin-1) mRNA in the hippocampal formation of schizophrenia patients. *Schizophrenia Research*, 98(1-3), 105–110. <http://doi.org/10.1016/j.schres.2007.05.041>

Weike, A. I., Bauer, U., & Hamm, A. O. (2000). Effective neuroleptic medication removes prepulse inhibition deficits in schizophrenia patients. *Biological Psychiatry*, 47(1), 61–70.

Weiss, I. C., Pryce, C. R., Jongen-Relo, A. L., Nanz-Bahr, N. I., & Feldon, J. (2004). Effect of social isolation on stress-related behavioural and neuroendocrine state in the rat. *Behavioural Brain Research*, 152(2), 279–295. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2003.10.015>

Westermeyer, J. (2006). Comorbid schizophrenia and substance abuse: a review of epidemiology and course. *The American Journal on Addictions*, 15(5), 345–355. <http://doi.org/10.1080/10550490600860114>

White, F. J., & Kalivas, P. W. (1998). Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug and Alcohol Dependence*, 51(1-2), 141–153.

Wicks, S., Hjern, A., Gunnell, D., Lewis, G., & Dalman, C. (2005). Social adversity in childhood and the risk of developing psychosis: a national cohort study. *The American Journal of Psychiatry*, 162(9), 1652–1657. <http://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.9.1652>

Wieck, A., Grassi-Oliveira, R., do Prado, C. H., Viola, T. W., Petersen, L. E., Porto, B., Bauer, M. E. (2016). Toll-like receptor expression and function in type I bipolar disorder. *Brain, Behavior, and Immunity*, 54, 110–121. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.01.011>

Wing, V. C., Rabin, R. A., Wass, C. E., & George, T. P. (2013). Correlations between executive function, decision-making and impulsivity are disrupted in schizophrenia versus controls. *Psychiatry Research*, 205(1-2), 168–171. <http://doi.org/10.1016/j.psychres.2012.08.022>

Wischhof, L., Irrsack, E., Dietz, F., & Koch, M. (2015). Maternal lipopolysaccharide treatment differentially affects 5-HT_{2A} and mGlu_{2/3} receptor function in the adult male and female rat offspring. *Neuropharmacology*, 97, 275–288. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.05.029>

Wischhof, L., Irrsack, E., Osorio, C., & Koch, M. (2015). Prenatal LPS-exposure--a neurodevelopmental rat model of schizophrenia--differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 57, 17–30. <http://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2014.10.004>

Wise, R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(6), 483–494. <http://doi.org/10.1038/nrn1406>

Wójc, P., Agnieszka, R. M., & Ry, J. (2016). Stages of the clinical course of schizophrenia – staging concept, *50*(4), 717–730.

Wolf, M. E., Sun, X., Mangiavacchi, S., & Chao, S. Z. (2004). Psychomotor stimulants and neuronal plasticity. *Neuropharmacology*, *47* Suppl 1, 61–79. <http://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2004.07.006>

Wright, C. I., Beijer, A. V., & Groenewegen, H. J. (1996). Basal amygdaloid complex afferents to the rat nucleus accumbens are compartmentally organized. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *16*(5), 1877–1893.

Wright, I. C., Rabe-Hesketh, S., Woodruff, P. W., David, A. S., Murray, R. M., & Bullmore, E. T. (2000). Meta-analysis of regional brain volumes in schizophrenia. *The American Journal of Psychiatry*, *157*(1), 16–25. <http://doi.org/10.1176/ajp.157.1.16>

Xu, D.-X., Chen, Y.-H., Wang, H., Zhao, L., Wang, J.-P., & Wei, W. (2006). Tumor necrosis factor alpha partially contributes to lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal growth restriction and skeletal development retardation in mice. *Toxicology Letters*, *163*(1), 20–29. <http://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.09.009>

Xu, X., & Domino, E. F. (1994). Phencyclidine-induced behavioral sensitization. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, *47*(3), 603–608.

Yamamori, H., Hashimoto, R., Fujita, Y., Numata, S., Yasuda, Y., Fujimoto, M., Takeda, M. (2014). Changes in plasma D-serine, L-serine, and glycine levels in treatment-resistant schizophrenia before and after clozapine treatment. *Neuroscience Letters*, *582*, 93–98. <http://doi.org/10.1016/j.neulet.2014.08.052>

Yang, C. Q., Kitamura, N., Nishino, N., Shirakawa, O., & Nakai, H. (1998). Isotype-specific G protein abnormalities in the left superior temporal cortex and limbic structures of patients with chronic schizophrenia. *Biological Psychiatry*, *43*(1), 12–19.

Yang, C. R., & Mogenson, G. J. (1985). An electrophysiological study of the neural projections from the hippocampus to the ventral pallidum and the subpallidal areas by way of the nucleus accumbens. *Neuroscience*, *15*(4), 1015–1024.

Yokel, R. A., & Pickens, R. (1974). Drug level of d- and l-amphetamine during intravenous self-administration. *Psychopharmacologia*, *34*(3), 255–264.

Zager, A., Mennecier, G., & Palermo-Neto, J. (2012). Maternal immune activation in late gestation enhances locomotor response to acute but not chronic amphetamine treatment in male mice offspring: role of the D1 receptor. *Behavioural Brain Research*, *232*(1), 30–36. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.03.036>

Zhang, C., Li, X.-Y., Zhao, L., Wang, H., & Xu, D.-X. (2007). Lipopolysaccharide (LPS) up-regulates the expression of haem oxygenase-1 in mouse placenta. *Placenta*, *28*(8-9), 951–957. <http://doi.org/10.1016/j.placenta.2007.04.003>

Zhang, X. Y., Zhou, D. F., Cao, L. Y., & Wu, G. Y. (2006). The effects of Ginkgo biloba extract added to haloperidol on peripheral T cell subsets in drug-free schizophrenia: a double-blind, placebo-controlled trial. *Psychopharmacology*, *188*(1), 12–17. <http://doi.org/10.1007/s00213->

006-0476-2

Zhang, X. Y., Zhou, D. F., Cao, L. Y., Zhang, P. Y., Wu, G. Y., & Shen, Y. C. (2004). Changes in serum interleukin-2, -6, and -8 levels before and during treatment with risperidone and haloperidol: relationship to outcome in schizophrenia. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 65(7), 940–947.

Zuckerman, L., & Weiner, I. (2003). Post-pubertal emergence of disrupted latent inhibition following prenatal immune activation. *Psychopharmacology*, 169(3-4), 308–313. <http://doi.org/10.1007/s00213-003-1461-7>