



Estudio del rol de los receptores AT₁ de Angiotensina II en alteraciones conductuales y neuroquímicas en un modelo preclínico hipoglutamatérgico de esquizofrenia

Tesis de doctorado en Ciencias Químicas
Bióloga Victoria Belén Occhieppo

Departamento de Farmacología.
IFEC- CONICET
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba
Córdoba, Argentina

2021

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Claudia Bregonzio

COMISIÓN EVALUADORA:

COMISIÓN ASESORA

- Dra. Mariela Fernanda Pérez
- Dr. Mario Eduardo Guido
- Dra. María Cecilia Sánchez

EVALUADOR EXTERNO

Dr. Alberto Javier Ramos

A mi familia...

El presente trabajo de Tesis ha sido realizado en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Instituto de Farmacología Experimental de Córdoba (IFEC-CONICET).

Para la realización de esta tesis, la doctoranda contó con una beca del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) 2016-2021. Además, se contó con el apoyo financiero de subsidios otorgados por la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT) y por el Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT).

Se deja constancia que se ha cumplimentado con los cursos requeridos, así como también se realizaron actividades docentes en asignaturas del Departamento de Farmacología, de acuerdo a la reglamentación vigente para optar por el grado de Doctora en Ciencias Químicas, de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Res. HCS 72/13.

Índice

Resumen	I
Abstract	II
Abreviaturas	III
Introducción	
Esquizofrenia	1
<i>Administración de ketamina como modelo de esquizofrenia</i>	3
<i>Interneuronas parvalbuminérgicas en esquizofrenia</i>	5
<i>Alteraciones gliales, inflamatorias y vasculares cortico-límbicas en esquizofrenia</i>	6
Angiotensina II cerebral	8
<i>Angiotensina II y la neuromodulación</i>	9
<i>Angiotensina II y la neuroinflamación</i>	10
Hipótesis	12
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Materiales y Métodos	
Animales y drogas experimentales	14
Diseño experimental	14
Toma de muestra	16
Procedimiento general de inmunohistoquímica	16
Tinción de Nissl	18
Obtención y análisis de imágenes	19
Análisis de estrés oxidativo	23
Análisis conductual	24
Análisis estadístico	26
Resultados	
<i>Objetivo 1</i>	
Activación neuronal	28
<i>Objetivo 2</i>	
Astroцитos	38
Microglía	39
Apoptosis	48
Estrés oxidativo	50
<i>Objetivo 3</i>	
Microvasculatura	52
<i>Objetivo 4</i>	
Actividad locomotora	58
Actividad locomotora	59

Prueba de interacción social	61
Prueba de reconocimiento de objetos novedoso	63
Pruebas conductuales en modelo “Agudo”	66
Discusión	
Activación neuronal	69
Inflamación: efecto dual de la ketamina y AngII	74
La administración de ketamina recrea los equivalentes etológicos de los signos conductuales característicos de la esquizofrenia	83
El receptor AT ₁ participa de las alteraciones conductuales a largo plazo generadas por la administración repetida de ketamina	86
Conclusión	89
Bibliografía	91
Publicaciones	102
Colaboraciones	103
Capítulos de libros	104

Resumen

La esquizofrenia es una enfermedad psiquiátrica crónica que afecta la supervivencia y calidad de vida del 1% de la población mundial y que se caracteriza por presentar signos conductuales positivos (alucinaciones, delirios), negativos (asociabilidad, desmotivación) y déficit cognitivo. Estas alteraciones conductuales tienen su base en cambios en la neurotransmisión dopaminérgica, glutamatérgica y GABAérgica. La subpoblación de interneuronas que expresan parvalbúmina juegan un rol preponderante en el desarrollo de la esquizofrenia, constituyendo un marcador esencial en los modelos de esta patología. La administración aguda y repetida de ketamina, un antagonista de los receptores NMDA, constituyen modelos preclínicos validados ya que recrean los aspectos conductuales y algunos neuroquímicos, típicos de esta patología. Los tratamientos disponibles para esta patología son paliativos, y el 20-30 % son refractarios para el control de los signos positivos. Por esta razón resulta imperativo la búsqueda de nuevos blancos y métodos terapéuticos. Angiotensina II, a través de los receptores AT₁, posee un rol neuromodulador sobre los sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos y GABAérgicos, así como proinflamatorio. Se ha descrito la síntesis de Angiotensina II a nivel cerebral, así como la expresión del receptor AT₁ en todos los componentes de la unidad neurovascular; jugando un rol crítico en las alteraciones inducidas por la administración de psicoestimulantes y procesos neurodegenerativos. Considerando esta evidencia, nos proponemos evaluar el rol de los receptores AT₁ en las alteraciones conductuales a largo plazo, generados por la administración repetida de ketamina; así como cambios en el patrón activación y expresión de interneuronas GABAérgicas, principalmente parvalbuminérgicas, y en la unidad neurovascular (astroglía, microglía, neuronas y microvasculatura). Por otro lado, también evaluaremos el efecto del bloqueo de los receptores AT₁ en la respuesta conductual a una administración aguda de ketamina. El receptor AT₁ participa en los cambios neuroadaptativos, proinflamatorios/pro-oxidativos y conductuales a largo plazo generados por la administración repetida de ketamina; sin embargo, carecen de efecto en las respuestas agudas a la misma. Los resultados de esta tesis suman evidencias al gran espectro de acción de ketamina y amplían la información sobre el rol de los receptores AT₁ en las alteraciones inducidas por la administración de fármacos psicotrópicos propuestas anteriormente en nuestro grupo de trabajo, sustentando su rol preponderante en patologías psiquiátricas.

Abstract

Schizophrenia is a chronic psychiatric disease affecting the survival and quality of life of 1% worldwide and is characterized by positive behavioural signs (hallucinations, delusions), negative (associability, demotivation) and cognitive deficits. These behavioural alterations have a common basis in dopaminergic, glutamatergic, and GABAergic neurotransmission changes. To this last respect, the subpopulation of parvalbumin-expressing interneurons plays a preponderant role in the development of schizophrenia, constituting an essential marker in the models of this pathology. The acute or repeated administration of Ketamine, an antagonist of NMDA receptors, are validated preclinical models since recreating the behavioural and, some, neurochemical features of this pathology. In addition to the absence of complete remission, 20-30% of patients with schizophrenia are refractory to the available treatments aimed at alleviating the positive signs, while there are no treatments for negative signs or cognitive deficits. Therefore, the search for new targets and therapeutic methods is imperative. Angiotensin II, through AT₁ receptors, has a neuromodulatory role on the dopaminergic, serotonergic and GABAergic systems, as well as pro-inflammatory. The synthesis of Angiotensin II at the brain level has been well described, as well as the expression of the AT₁ receptor in all the components of the neurovascular unit, playing a critical role in the alterations induced by the administration of psychostimulants and neurodegenerative processes. Considering this evidence, we propose to evaluate the role of AT₁ receptors in long-term behavioural changes, generated by the repeated administration of Ketamine; as well as changes in the activation and expression pattern of GABAergic interneurons, mainly in the parvalbumin-positive subpopulation, and in the neurovascular unit (astroglia, microglia, neurons and microvasculature). On the other hand, we will also evaluate the effect of blocking AT₁ receptors on the behavioural response to an acute dose of Ketamine. The AT₁ receptor is involved in the long-term neuroadaptive, pro-inflammatory / pro-oxidative and behavioural changes generated by the repeated administration of Ketamine; however, they do not affect the acute responses of the psychostimulant. The results of this thesis add evidence to the wide spectrum of action of Ketamine and expand the role of the AT₁ receptor in the alterations induced by the administration of psychostimulants previously proposed in our group, supporting its preponderant role in psychiatric pathologies.

Abreviaturas

AngII: angiotensina II

AOPP: productos derivados de la oxidación de proteínas

AT₁/ R-AT₁: receptor tipo I de angiotensina II

D₂: receptores dopaminérgicos tipo 2

ECA: enzima convertidora de angiotensina

GFAP: proteína ácida fibrilar de la glía

IP: índice de preferencia

MDA: malondialdehido

NEMs: neuronas espinosas medianas

NMDA: receptor N-Metil-D-Aspartato de glutamato

Introducción



Esquizofrenia

La esquizofrenia es una enfermedad psiquiátrica crónica y muy heterogénea, que afecta la supervivencia y calidad de vida del 1% de la población mundial. El diagnóstico de esta patología se correlaciona con una reducción del 20% en la esperanza de vida con respecto a la población general y que incluye hasta un 40% de las muertes atribuidas al suicidio. Sumado a la angustia personal de alrededor de 20 millones de personas que padecen esta patología, la esquizofrenia tiene un alto costo socio-económico, principalmente relacionado con la pérdida de empleo y necesidad de apoyo social a lo largo de toda la vida del paciente (World Health Organization). Esto resulta de importancia dada la duración de la enfermedad considerando que el diagnóstico ocurre en la adultez temprana o en la adolescencia tardía con el advenimiento del primer episodio psicótico, y que acompaña al paciente a lo largo de toda su vida. Antes del diagnóstico, durante la niñez y adolescencia, es muy frecuente que el paciente transcurra por un período prodrómico en el que los síntomas psicóticos de tipo negativos o cognitivos, ocasionales y/o atenuados, pueden ocurrir sin ser detectados o bien siendo confundidos con los de otras patologías psiquiátricas. El estado sintomatológico que caracteriza al periodo prodrómico continúa durante el desarrollo de la patología, incluso en ausencia de los episodios psicóticos agudos y, eventualmente, las personas pueden presentar comorbilidad con otros trastornos psiquiátricos como la depresión (Cheng & Schepp, 2016; Hany et al., 2021; Millan et al., 2014).

Los signos conductuales típicos de la esquizofrenia pueden agruparse en: signos positivos, negativos y déficit cognitivo. Históricamente, los signos positivos (alucinaciones y delirios) han sido el objetivo de la investigación y búsqueda de tratamientos, lo que ha resultado en el desarrollo de fármacos antipsicóticos de primera y segunda generación; sin embargo, alrededor del 30% de los pacientes son refractarios al tratamiento disponible (Hany et al., 2021; Millan et al., 2014). Por otro lado, los síntomas negativos- los cuales incluyen la pobreza del habla (alogia), desmotivación, anhedonia anticipatoria y asociabilidad- no han recibido una atención importante hasta años recientes, a pesar que interfieren gravemente con el estado funcional de los pacientes (Millan et al., 2014). Es importante destacar que tanto los signos negativos como el déficit cognitivo, comienzan a manifestarse durante el periodo prodrómico, constituyendo uno de los marcadores tempranos de

la patología. Generalmente, la gravedad de estos signos se incrementa luego del primer episodio psicótico para, finalmente, acompañar al desarrollo de la patología incluso cuando el paciente no se encuentra en el estado psicótico- es decir en ausencia de signos positivos (Meltzer et al., 2013). La disfunción cognitiva incluye una capacidad disminuida para enfocar la atención y falla en la memoria declarativa, la cual contiene información sobre experiencias personales que han ocurrido en un lugar y momento determinado (Freedman, 2003). Del mismo modo se ve afectada la cognición social- que refiere a la comprensión y comunicación de los modos verbales y no verbales, así como interpretar los estados mentales, gestos, comportamientos y expresiones faciales de los demás- lo cual predice discapacidades sociales para los pacientes (Millan et al., 2014). Algunos tratamientos existentes presentan una leve mejora de los signos negativos, no así en el déficit cognitivo, generando la necesidad de buscar nuevos blancos terapéuticos.

Se ha propuesto que estas alteraciones conductuales se deben a un desbalance en la neurotransmisión dopaminérgica, principalmente, así como también la glutamatérgica y serotoninérgica; dando lugar a las principales teorías que explican la etiopatología de la esquizofrenia. La teoría dopaminérgica- la más antigua y apoyada históricamente- tiene su base en las numerosas evidencias que muestran que un incremento de la liberación de dopamina, inducida por la administración de psicoestimulantes, puede recrear los signos positivos de la enfermedad; así como en la eficiencia de los antipsicóticos clásicos- antagonistas de los receptores dopaminérgicos tipo 2 (D₂)- para paliar las crisis psicóticas (van Kammen, 1979). Pero esta teoría resulta insuficiente al momento de explicar toda la patología ya que los antipsicóticos clásicos no pudieron remediar los signos negativos o cognitivos. En 1990, María y Arvid Carlsson propusieron que la etiología de la esquizofrenia, más allá de su heterogeneidad, estaba fuertemente relacionada con un desbalance dopaminérgico-glutamatérgico que altera la retroalimentación de la corteza prefrontal sobre los núcleos estriatales y talámicos (Carlsson & Carlsson, 1990). Se han descrito dos interrelaciones muy estrechas entre glutamato y dopamina. En la primera, las neuronas piramidales (glutamatérgicas) modulan la actividad de las neuronas dopaminérgicas a nivel del área tegmental ventral, y la segunda donde las neuronas dopaminérgicas modulan indirectamente a las glutamatérgicas en la corteza prefrontal por medio de interneuronas GABAérgicas (Bubeníková-

Valešová et al., 2008; Goff & Coyle, 2001; Sesack et al., 2003). A partir de estas nuevas evidencias es que surgen los modelos de la hipofunción del receptor N-Metil-D-Aspartato (NMDA) de glutamato, los cuales proponen que una disfunción de estos receptores ubicados en interneuronas GABAérgicas de la corteza prefrontal, producirían una falla en la acción inhibitoria de estas interneuronas sobre las neuronas piramidales glutamatérgicas. Al bloquear el efecto inhibitorio GABAérgico, las neuronas piramidales excitatorias inducen un desbalance en la neurotransmisión a nivel del estriado y del área tegmental ventral. En este último se encuentran los somas dopaminérgicos, lo que resulta en una hipo-dopaminergia meso cortical (responsable de los signos negativos y déficit cognitivo) y una hiper-dopaminergia meso-límbica/nigro-estriatal (responsable de los signos positivos) (Cohen et al., 2015; Pitsikas & Markou, 2014; Sesack et al., 2003).

Administración de ketamina como modelo preclínico de esquizofrenia

De la teoría glutamatérgica se desprenden los modelos que utilizan a los antagonistas del receptor NMDA que incluyen la administración aguda o repetida de ketamina. La ketamina es un anestésico disociativo que actúa principalmente bloqueando el NMDA, sin embargo, se sabe que tiene efecto sobre los receptores α -amino-3-ácido hidroxil-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y D₂, además de inhibir los canales de Na⁺ y K⁺ dependientes de voltaje y la recaptación de serotonina y dopamina (Eldufani et al., 2018; Frohlich & Van Horn, 2014). La composición (subunidades) de los receptores NMDA ubicados en interneuronas GABAérgicas de corteza prefrontal facilitan la eliminación del bloqueo por Mg²⁺, por lo que administración de dosis subanestésicas de este psicofármaco bloquea la función inhibitoria de las interneuronas GABAérgicas sobre las neuronas piramidales mencionadas anteriormente (Cohen et al., 2015; Frohlich & Van Horn, 2014). La administración de ketamina en humanos recrea los signos psicóticos mientras que agrava de manera significativa los signos preexistentes en pacientes. Más aún, se reportó una psicosis persistente en algunos consumidores crónicos de ketamina, incluso tiempo después de haber abandonado el consumo, cuyos signos son idénticos a los observados en la esquizofrenia e incluyen los eventos psicóticos y falla en la memoria espacial y verbal (Cheng et al., 2018). Consumidores crónicos de ketamina muestran déficit cognitivo principalmente asociado a la memoria semántica y episódica, así como menor fluidez verbal durante sus períodos de

abstinencia (Cheng et al., 2018; Morgan et al., 2006; Morgan et al., 2004). A nivel preclínico, los protocolos de administración aguda y repetida de ketamina son modelos validados muy utilizados para el estudio de la esquizofrenia que cuentan con validez de apariencia, constructo y predictiva (Becker et al., 2003; Becker & Grecksch, 2004). En este sentido, la administración repetida de ketamina recrea los aspectos crónicos de la patología mientras que la aguda simula los episodios psicóticos, principalmente, durante etapas tempranas (Adell et al., 2012). Con respecto a este último, tanto en estudios realizados en humanos como en modelos animales, se ha reportado que la administración aguda de ketamina produce un incremento de la liberación de neurotransmisores corticales, así como dopamina en estriado, e hiperlocomoción recreando los signos positivos y otorgando validez de apariencia al modelo agudo (Bubeníková-Valešová et al., 2008). La administración repetida de ketamina recrea los signos positivos y negativos, y déficits cognitivos abarcando un espectro más completo de la sintomatología conductual; mientras que, al mismo tiempo genera una hipofrontalidad y reducción de la expresión de interneuronas parvalbuminérgicas similar a la de los pacientes, lo que le otorga además la validez de constructo (Adell et al., 2012; Bubeníková-Valešová et al., 2008). Más aún, se ha descrito que la administración de ketamina produce asociabilidad, el signo más significativo dentro del grupo de signos negativos. Dada la conducta social- gregaria- de los roedores, la prueba de interacción social es un punto clave en la validación del modelo animal de ketamina (Holuj et al., 2015).

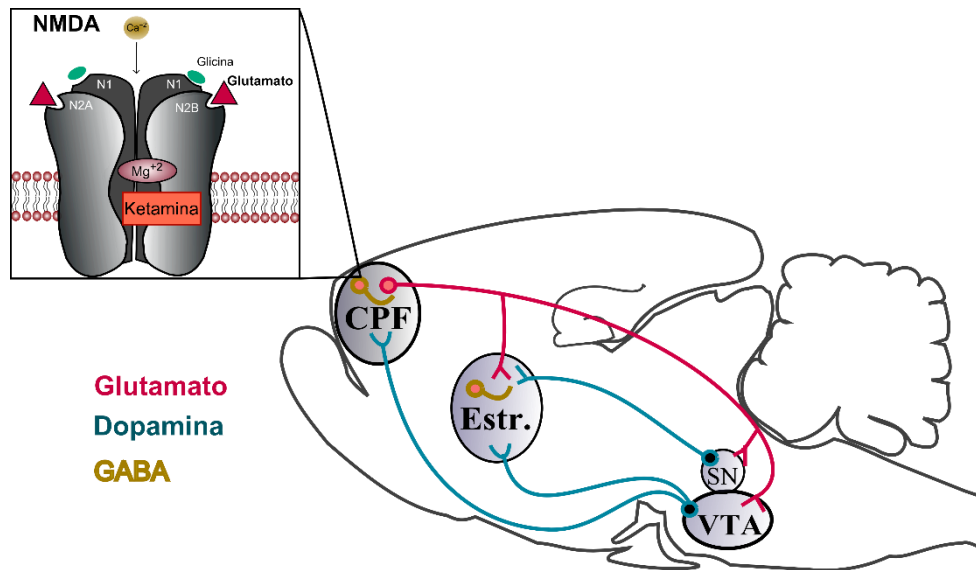


Figura 1: La administración de dosis subanestésicas de Ketamina libera el bloqueo por Mg^{+2} de los receptores NMDA ubicados en las interneuronas GABAérgicas (Amarillo) de la corteza prefrontal (CPF). Al antagonizar estos receptores, se reduce el tono GABAérgico sobre las neuronas piramidales glutamatérgicas (Rosa). La hiperactivación piramidal afecta de forma diferencial a las distintas áreas como estriado (Estr.), sustancia nigra (SN) y área tegmental ventral (VTA). Dado que en estas últimas áreas se encuentran los somas de las neuronas dopaminérgicas (Azul), se produce un desbalance que culmina en una hipo-dopaminergia mesocortical (asociada a los signos negativos y cognitivos) y una hiper-dopaminergia en el sistema mesolímbico/nigroestriado (signos positivos).

Interneuronas parvalbuminérgicas en esquizofrenia

Análisis postmortem de pacientes con esquizofrenia, mostraron alteraciones en la neurotransmisión GABA, particularmente en una subpoblación de interneuronas positivas para parvalbúmina las cuales son cruciales para el balance excitatorio/inhibitorio y la sincronización neuronal de alta frecuencia mediante ondas gamma, críticas para los procesos cognitivos (Adell et al., 2012; Do et al., 2013). En este sentido, las ondas gamma constituyen el principal mecanismo para la transmisión y procesamiento de la información a nivel cortical y del hipocampo, y por lo tanto son un factor crítico para los procesos de aprendizaje y memoria, así como para procesamientos sensoriales y la conducta social (Do et al., 2013; Gonzalez-Burgos et al., 2011; Steullet et al., 2017). Estudios en pacientes con esquizofrenia mostraron una disfunción y reducción en el número de interneuronas parvalbuminérgicas en la corteza prefrontal (Benneyworth et al., 2011; Kaar et al., 2019; Lewis et al., 2012). Distintas anomalías relacionadas con oscilaciones de alta frecuencia se han encontrado en pacientes esquizofrénicos, y algunas de ellas se correlacionan con la aparición de síntomas, principalmente los negativos y el déficit

cognitivo; en tanto, las alucinaciones se han asociado con un aumento de la conectividad a nivel local y excesivo poder gamma de alta energía (Niklitschek et al., 2011).

Alteraciones gliales, inflamatorias y vasculares cortico-límbicas en la esquizofrenia

Es ampliamente conocido que los astrocitos cumplen un rol central en el mantenimiento de la homeostasis del microambiente cerebral mediando la comunicación de la unidad neurovascular. Se ha demostrado que los astrocitos reactivos muestran un incremento en la expresión de GFAP con pérdida de las propiedades antioxidantes, reducción de los transportadores de glutamato y síntesis de glutatión (Cragolini et al., 2020; Papa et al., 2014). Más aún, la alteración en la reactividad astrocitaria genera un desbalance en la homeostasis, desacoplamiento de la unidad neurovascular, neuroinflamación y muerte neuronal; y, por lo tanto, tiene un rol central en el desarrollo de patologías como Parkinson, Alzheimer, esquizofrenia y depresión mayor (Blanco-Suárez et al., 2017; Cragolini et al., 2020; McConnell et al., 2019; Phatnani & Maniatis, 2015). En este sentido, estudios postmortem en pacientes con esquizofrenia indicaron una reactividad astrocitaria crónica con hipertrofia celular y un aumento en la densidad de células de microglía-macrófagos cerebrales (Van Kesteren et al., 2017). Los signos de gliosis y neuroinflamación, por lo general, están estrechamente relacionados con el historial y la gravedad de la enfermedad (Arnold et al., 1996; Bernstein et al., 2015; Catts et al., 2014). Los efectos antiinflamatorios de los fármacos antipsicóticos sustentan también la raíz inflamatoria en la etiopatología de la esquizofrenia (Tourjman et al., 2013). Más aún, se ha propuesto que el daño oxidativo en los lípidos podría ser un biomarcador temprano de esquizofrenia. Estudios en roedores mostraron un incremento de niveles de malondialdehído (MDA) en corteza prefrontal, cuerpo estriado e hipocampo inducida por la administración repetida de ketamina, lo cual fue revertido por la administración de clozapina sustentando el efecto antiinflamatorio de los antipsicóticos (Monte et al., 2013; Vasconcelos et al., 2015). Por último, existe amplia evidencia que muestra que la esquizofrenia podría tener base en el daño vascular. En este sentido, se ha reportado alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral mediante el uso de resonancia magnética funcional en pacientes con esquizofrenia en estrecha relación con las respuestas conductuales (Camchong

Introducción

et al., 2011; Y. Zhou et al., 2015). Estos antecedentes, en conjunto con los antecedentes inflamatorios/oxidativos ya mencionados, dan lugar a la teoría inflamatoria-vascular de la esquizofrenia la cual reúne factores genéticos, pre y perinatales y ambientales (Fitzsimmons et al., 2013; Hanson & Gottesman, 2005).

Angiotensina II cerebral

A pesar de ser conocido históricamente como un sistema periférico, se ha descrito la presencia del sistema renina angiotensina, así como la síntesis de todos sus componentes, a nivel cerebral. En este sentido, los astrocitos son la principal fuente de angiotensinógeno, mientras que la producción de este octapéptido en las neuronas es secundaria y está restringida solo a algunas regiones del cerebro. El angiotensinógeno es convertido en angiotensina I por medio de la renina cerebral y, posteriormente, a angiotensina II (AngII) mediante la enzima convertidora de angiotensina (ECA), la cual se expresa en muchas áreas del encéfalo (Basmadjian et al., 2017). Existe evidencia que muestra que Ang II, a través de sus receptores AT₁, juega un papel regulador en un gran número de funciones cerebrales que incluyen la respuesta al estrés, el consumo de alcohol, la depresión y la cognición; además de los roles clásicos de AngII en el control de la presión arterial y la homeostasis de los líquidos (Basmadjian et al., 2017). Se ha descrito que los receptores AT₁ se expresan en muchas áreas del cerebro, incluyendo a la corteza cerebral y el estriado (Martinez-Pinilla et al., 2015; Von Bohlen Und Halbach & Albrecht, 1998). Más aún, estos receptores se sintetizan activamente en neuronas, células endoteliales, células de la microglía y astrocitos, sugiriendo un rol clave de este neuropéptido en las respuestas inflamatorias y vasculares.

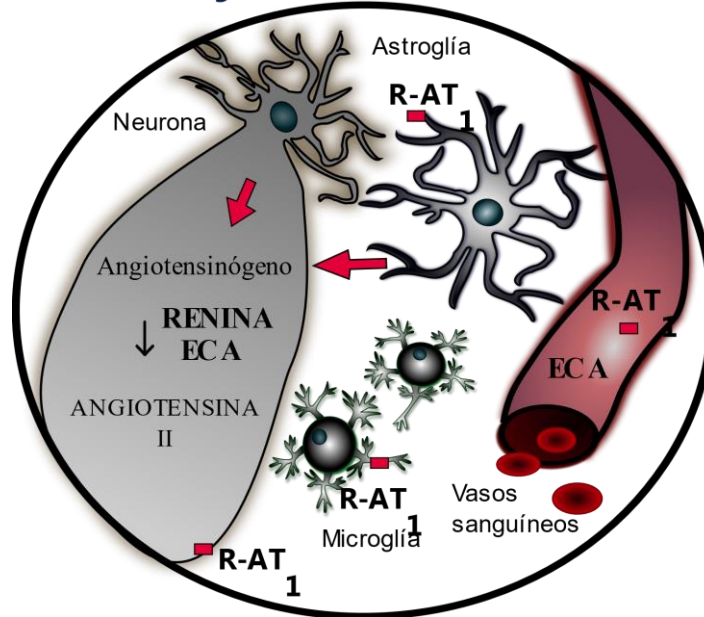
Angiotensina II cerebral

Figura 2: Se ha descrito extensamente la presencia de un sistema renina angiotensina cerebral en estrecha relación con todos los componentes de la unidad neurovascular. Los astrocitos son la principal fuente de angiotensinógeno. Se ha descrito la presencia de todos los escalones necesarios para la síntesis de AngII en neuronas dopaminérgicas. Los receptores AT₁ (R-AT₁) se expresan en todos los componentes de la unidad neurovascular.

Angiotensina II y la neuromodulación

Se ha detallado extensamente el rol de AngII como modulador de los sistemas de neurotransmisión GABAérgico, glutamatérgico y dopaminérgico, en el cual nos enfocaremos con más detalle. La relación entre AngII y glutamato o GABA ha sido descrita principalmente asociada con las funciones neuroendocrinas y cardiovasculares clásicas de la AngII (Li et al., 2003; Saavedra et al., 2006; Zhou et al., 2019). En este sentido, el sistema de neurotransmisión GABAérgica juega un papel crítico en las funciones de AngII sobre el mantenimiento de la presión arterial y la respuesta al estrés (Dupont & Lé gat, 2020; Lé gat et al., 2019; Juan M. Saavedra et al., 2006). AngII presenta un efecto inhibitorio sobre la neurotransmisión glutamatérgica ya que se ha demostrado que inhibe la excitación evocada por glutamato o sus agonistas, vía activación de los receptores AT₁ (Albrecht et al., 1997; Bregonzio et al., 2017; Mooney et al., 1994; Xiong & Marshall, 1990). Por otro lado, existe una estrecha relación entre AngII y dopamina que ha sido foco de numerosas investigaciones que extienden el rol de AngII e involucra a todos los componentes de la unidad neurovascular. Esto se debe a que todos los componentes

necesarios para la síntesis de AngII se han encontrado en neuronas dopaminérgicas, mientras que los astrocitos son la principal fuente de angiotensinógeno. El receptor AT₁ se expresa no solo en neuronas, sino también en células de la glía (astrocitos y microglía), células endoteliales de la vasculatura cerebral. Más aún, a nivel del estriado se observó que los receptores AT₁ forman heterómeros funcionales con receptores dopaminérgicos D₂ (Martinez-Pinilla et al., 2015). AngII, a través de los receptores AT₁, modulan la síntesis de dopamina- dado que aumenta la expresión de la tirosina hidroxilasa en área tegmental ventral (Aschrafi et al., 2019)- la liberación en estriado (Brown et al., 1996; Stragier et al., 2004) y la expresión de receptores dopaminérgicos (Mertens et al., 2010; Stragier et al., 2004). Por otro lado, se ha descrito que cambios en la neurotransmisión dopaminérgica genera alteraciones en la actividad del sistema renina angiotensina cerebral y aumenta la expresión de los receptores AT₁ (Brown et al., 1996; Medelsohn et al., 1993). En línea con estas evidencias, se ha propuesto que el desbalance AngII/Dopamina juegan un rol clave en procesos fisiológicos como el envejecimiento, así como en el desarrollo de patologías neurodegenerativas incluyendo Parkinson e hipertensión (Labandeira-Garcia et al., 2011; B Villar-Cheda et al., 2014; Wright & Harding, 2011). Nuestro grupo de trabajo ha reportado numerosas evidencias de la participación de los receptores AT₁ en los cambios neuroadaptativos a largo plazo inducidos por la exposición a amfetamina, tanto a nivel neuroquímico y conductual (Marchese et al., 2016, 2020; Occhieppo et al., 2017; Paz et al., 2011, 2014).

Angiotensina II y la neuroinflamación

Los antagonistas del receptor AT₁ se han asociado con efectos antiinflamatorios, antioxidantes y neuroprotectores (Prusty et al., 2017; J M Saavedra, 2017; Villapol & Saavedra, 2015). En este sentido, nuestro grupo ha descrito previamente el rol protector del bloqueo AT₁ contra el efecto proinflamatorio/pro-oxidativo generado por la administración de amfetamina sobre la reactividad de astrocitos y células de la microglía, la apoptosis neuronal y la arquitectura de la red vascular en las regiones corticales (Marchese et al., 2020; Occhieppo et al., 2017). Una amplia evidencia muestra que AngII, vía activación del receptor AT₁, tiene un rol crítico en el estrés oxidativo e inflamación,

Introducción

promoviendo la activación de la enzima NADPH-oxidasa, la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α (Wu et al., 2013).

Hipótesis

Dado que Angiotensina II, a través de sus receptores AT₁, actúa modulando la neurotransmisión GABAérgica, glutamatérgica y dopaminérgica, así como los procesos neuroinflamatorios, postulamos que las alteraciones a largo plazo a nivel neuroquímico, neuroinflamatorio y conductual, consecuencia de la hipoglutamatergia inducida por la administración de ketamina y enmarcados en un modelo animal de esquizofrenia, podrían ser prevenidas/ atenuadas por el bloqueo de los receptores AT₁

Objetivo General

Evaluar el rol de los receptores AT₁ de Angiotensina II en alteraciones conductuales y neuroquímicas inducidas por ketamina, modelo animal de esquizofrenia, focalizándonos en alteraciones funcionales/estructurales y áreas cerebrales claves en la etiopatología de esta enfermedad.

Objetivos específicos

Objetivo N°1: Evaluar la participación del receptor AT₁ en la activación neuronal y expresión de interneuronas GABAérgicas y de la subpoblación parvalbuminérgica a largo plazo luego de la administración repetida de ketamina, en área tegmental ventral, estriado dorsal y corteza prefrontal.

Objetivo N°2: Evaluar la participación del receptor AT₁ en la respuesta glial y la supervivencia celular a largo plazo luego de la administración repetida de ketamina, en área tegmental ventral, estriado dorsal y corteza prefrontal.

- a- Analizar la reactividad y la respuesta morfológica de astrocitos.
- b- Evaluar la reactividad de las células de la microglía.
- c- Evaluar la apoptosis celular.

Objetivo N°3: Evaluar la participación del receptor AT₁ en los cambios a largo plazo en arquitectura de la red microvascular de la corteza prefrontal luego de la administración repetida de ketamina.

Objetivo N°4: Evaluar la participación del receptor AT₁ en las respuestas conductuales a la administración de ketamina, abarcando los signos positivos, negativos y déficit cognitivo, típicos de la esquizofrenia como:

a- Recrear equivalentes etológicos de los signos conductuales característicos de la esquizofrenia mediante el protocolo de administración repetida de ketamina y evaluar la participación del receptor AT₁ en alteraciones a largo plazo.

b- Evaluar la participación del receptor AT₁ en alteraciones conductuales en un protocolo de administración aguda de ketamina.

Materiales y métodos



Animales

Para realizar los experimentos se utilizaron ratas macho de la cepa “Wistar”, adultos (60 días), con un peso entre 250 y 280g al inicio del tratamiento. Una semana antes del inicio del protocolo, los animales fueron asignados por azar a los distintos grupos experimentales y se mantuvieron agrupados en un máximo de cuatro por caja con libre acceso a comida y agua. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de laboratorio de humedad y temperatura controlada (21-23°C), bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 hs, iniciando el horario de luz a las 7:00 hs. Durante los días previos al inicio del tratamiento, los animales fueron habituados al contacto con el operador a fin de evitar el estrés de la manipulación.

Todos los experimentos fueron realizados según la reglamentación establecida y el protocolo aprobado por resolución N° 46/15 y 270/18 del Comité de Cuidado y Uso de Animales (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina; basada en la Guía para el Cuidado y el Uso de Animales del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos. Todos los operadores fueron aprobados por el CICUAL-FCQ.

Drogas

Ketamina (Holliday, Buenos Aires, Argentina) disuelto en solución fisiológica (salina 0,9%) inmediatamente antes de su uso.

Candesartán cilexetilo (Laboratorios Phoenix) disuelto en una solución de bicarbonato de sodio 0,1N (vehículo).

Diseño experimental

Modelo de administración repetida de ketamina

A fin de evaluar el desarrollo de alteraciones a largo plazo inducidas por la administración repetida de ketamina, y la participación del receptor AT₁, los animales recibieron una administración diaria de vehículo/candesartán (3 mg/Kg, oral por gavage) durante diez días. Entre los días 6 y 10, adicionalmente, recibieron una inyección diaria de salina/ ketamina (30mg/Kg i.p.) y luego permanecieron en sus cajas por un período libre de droga de 14 días. Finalmente, el día experimental 24, se llevaron a cabo las pruebas conductuales, en condiciones basales o luego de la administración de una dosis desafío de ketamina (15mg/Kg). El sacrificio y toma

Materiales y métodos

de muestras de los animales se llevó a cabo el día 25, en condiciones basales y después del desafío (90min o 24hs según experimento).

Modelo de administración repetida de Ketamina



Figura 3: Esquema experimental del protocolo de administración repetida.

Modelo de administración aguda de ketamina

Con el objetivo de evaluar los efectos agudos de ketamina a nivel conductual y el impacto del bloqueo de los receptores AT₁ en ellos, los animales recibieron vehículo/candesartán durante 6 días. El día seis recibieron una única inyección de salina/ketamina (30mg/Kg i.p.) y las pruebas conductuales se llevaron a cabo según el protocolo de cada una.

Modelo de administración aguda de Ketamina

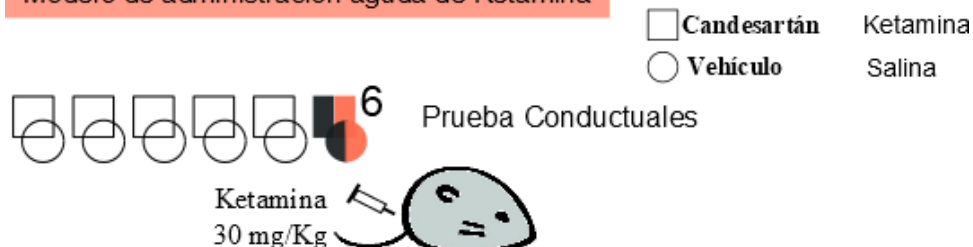


Figura 4: Esquema experimental del protocolo de administración aguda.

Ketamina

La dosis elegida para esta tesis se basa en el protocolo experimental utilizado en (Schumacher et al., 2016). La administración de dosis subanestésicas de ketamina recrea los signos conductuales de la esquizofrenia y presenta validez de apariencia como modelo conductual de esta patología.

Administración de la dosis desafío

La dosis desafío nos permite desenmascarar las neuroadaptaciones a largo plazo generadas por la administración repetida de ketamina, mientras que muestra los efectos agudos del psicotrópico en los animales previamente tratados con salina. La dosis desafío se estableció en 15mg/Kg con el fin de poner en evidencia la

sensibilización conductual inducida por la administración repetida de ketamina y evitar el efecto “techo” observado con una dosis de 30mg/Kg en actividad locomotora (datos no mostrados).

Toma de muestras

Perfusión transcardial

El día experimental 24, los animales fueron perfundidos transcardialmente. Para ello fueron anestesiados con Uretano al 50% (100mg/kg i.p.), para ingresar por la cavidad torácica hasta el corazón, donde se inserta la aguja de perfusión mediante la cual se administra una solución lavadora de salina 0,9% con heparina 500 U/l (250 ml), seguido por una solución fijadora de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0,1M (pH 7,4; 250ml). Después de 15 min, se extraen los cerebros y son almacenados en una solución crioprotectora de sacarosa al 30% en buffer fosfato 0,1M y mantenidos a 4°C hasta su uso.

Procedimiento general de inmunohistoquímica

El día del experimento los cerebros fueron adheridos a un soporte con medio para congelamiento tisular (Biopack) e inmediatamente congelados con spray congelante (Biopack), para luego ser dejados por 20min a -20°C para que todo el tejido se congele en forma equitativa. Utilizando un Crióstato Leica CM15105, se obtuvieron cortes coronales de 30 y 40 µm, según indicaciones de cada inmunomarcación que fueron recolectados en pocillos con buffer 0,01M para su lavado. Los cortes de tejido fueron incubados por 2 hs en una solución de 10% de metanol y 10% de peróxido de hidrógeno en agua destilada, lo que permite una mejor fijación del tejido y el agotamiento de la actividad de peroxidasa endógena. Los cortes son lavados con buffer 0,01M en tres intervalos de 5min y luego son sumergidos en solución de suero de cabra al 10% en buffer 0,1M, por 2hs, para el bloqueo de las uniones inespecíficas. Sin realizar ningún lavado, los cortes se incuban durante la noche en una solución que contiene el anticuerpo primario correspondiente, 2% de suero de cabra y 0,3% de Tritón X-100 (Flucka Analytical) en buffer 0,1M. Al día siguiente, luego de tres lavados con buffer 0,01M, la señal fue amplificada incubando los cortes con el anticuerpo secundario biotinilado en una solución con 2% de suero de cabra en buffer 0,1M, por un periodo de 2hs. Inmediatamente se realizó el lavado de los cortes con buffer 0,01M y se incubaron en una solución que contiene el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa (Vector

Materiales y métodos

Laboratories Inc.) con 2% suero de cabra en buffer 0,1M. Esto permite amplificar la inmunomarcación y agrega la enzima peroxidasa fundamental para el proceso del revelado en el que se utiliza peróxido de hidrógeno (sustrato de la enzima) y Diaminobenzidina (Sigma Chemical Co.) como cromógeno. Al mismo tiempo, se agrega a la solución cloruro de cobalto 1% y de sulfato de níquel 1% con, otorgándole un color violeta oscuro. Finalmente, los cortes son lavados en buffer 0,01M durante 3 periodos de 10min y montados en portaobjetos gelatinizados. Se dejaron secar a temperatura ambiente para luego ser aclarados con xilol y cubiertos con medio de montaje DPX (Flucka Analytical) y un cubre objetos.

En todos los casos, previo al experimento, se llevó a cabo una puesta punto de las concentraciones de anticuerpos primario y secundario. Además, en cada experimento se procesaron muestras de los 4 grupos experimentales, más un control negativo (sin anticuerpo primario), a fin de minimizar la variabilidad intrínseca de la metodología y del operador.

Activación neuronal y composición poblacional de interneuronas GABAérgicas- Tabla 1

Para evaluar la activación neuronal, los animales fueron sacrificados 90 min luego de la administración de la dosis desafío de ketamina. Se llevó a cabo una inmunomarcación doble para un marcador de activación neuronal, c-Fos, y un marcador de interneuronas. Para ello se eligió en anticuerpo anti-GAD65 como marcador de toda la población de interneuronas GABAérgicas, y un anticuerpo monoclonal anti-parvalbúmina, para la subpoblación parvalbuminérgicas. Como anticuerpo secundario, se utilizaron anticuerpo biotinilado anti-conejo para c-Fos y anticuerpo biotinilado anti-ratón para los otros inmunomarcadores.

Reactividad astrocitaria y microglial- Tabla 1

Los animales fueron sacrificados en condiciones basales o 24hs luego de la administración de la dosis desafío de ketamina. Se tomaron secciones consecutivas de 30µm para inmunomarcación de astrocitos y células de la microglía, para lo que se utilizaron anticuerpos primarios monoclonales anti-GFAP (proteína fibrilar ácida de la glía) y anti-CD11b, respectivamente, ambos provenientes de ratón. Como anticuerpo secundario, para ambas se utilizó un anticuerpo biotinilado anti-ratón.

Arquitectura vascular- Tabla 1

Los animales fueron sacrificados en condiciones basales, y de sus cerebros se tomaron secciones consecutivas de 40µm para inmunomarcación contra la glicoproteína endotelial, con anti-factor de von Willebrand proveniente de conejo. Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo biotinilado de cabra anti-conejo.

<i>Objetivo</i>	<i>Anticuerpo</i>	<i>Dilución; origen</i>	<i>Marca comercial</i>
Activación neuronal * ¹	c-Fos	1:3000; conejo	Abcam
Interneuronas GABAérgicas	GAD65	1:2000; ratón	Abcam
Interneuronas parvalbuminérgicas	Parvalbúmina	1:4000; ratón	Abcam
Astrocitos	GFAP	1:1000; ratón	Sigma-Aldrich
Células de la microglía	CD11b	1:1000; ratón	Millipore
Células endoteliales de los vasos sanguíneos * ²	Factor de von Willebrand	1:200; conejo	Dako
Anticuerpo 2°	Anti-Conejo	* ¹ 1:1000/ * ² 1:500; cabra	Vector Laboratories
Anticuerpo 2°	Anti-ratón	1:3000; cabra	Jackson Immune Research

Tabla 1: resumen de anticuerpos utilizados para los distintos objetivos de esta tesis, mediante procedimiento de inmunohistoquímica.

Tinción de Nissl

Apoptosis celular

Se tomaron secciones consecutivas de 30µm de los mismos cerebros utilizados para evaluar reactividad astrocitaria y microglial, y se llevó a cabo una tinción de Nissl con cresil violeta. Para ello, los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados y dejados para secarse a temperatura ambiente durante toda la noche. Al día siguiente, luego de ser rehidratados por 10min, las muestras fueron teñidas con cresil violeta (Sigma-Aldrich) por 2 min e inmediatamente sumergidas en agua destilada que quitar el excedente. Luego fueron sumergidas secuencialmente en alcohol 70% (2min), solución de ácido acético y alcohol 96% (2min), alcohol 96% (1min) y alcohol 100% (una única inmersión) para ser deshidratados. Finalmente, las secciones montadas fueron dejadas para secarse a temperatura ambiente durante la noche y aclaradas con xilol y cubiertas con medio de montaje DPX (Flucka Analytical) y un cubre objetos.

Obtención y análisis de imágenes

La visualización del tejido se llevó a cabo a través de un microscopio Leica DM 4000B de campo claro, acoplado una cámara digital *Leica DFC Camera* que permite capturar y almacenar las imágenes en formato TIFF (1392 x 1040 píxeles). Se obtuvieron cuatro fotografías por muestra tomando ambos hemisferios de dos secciones coronales de cada área cerebral a estudiar; y el valor final de la variable se obtuvo del promedio de las 4 aproximaciones. Al momento de capturar las imágenes, se le asignó un código al azar para asegurar la objetividad del análisis. El análisis de las imágenes se realizó con el programa Image J (versión 1.52i, Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos).

Análisis de activación neuronal

Se obtuvieron imágenes a un aumento de 200x que corresponde a un área de estudio de 0,38 mm². Para cuantificar el número de células positivas para c-Fos, las imágenes se transformaron en binarias fijando el umbral de grises entre 190-210, y el contador automático de partículas del programa Image J fue programado para cuantificar partículas de tamaño entre 30-100 μm (14-38 pixels²) y circularidad en 0,5-1, a fin de excluir la marca de células inmunomarcados para GAD o parvalbúmina, las cuales fueron cuantificadas de manera manual y a ciegas por el operador. El procedimiento de cuantificación automática de células positivas para c-Fos fue puesta a punto y publicada en el trabajo de Basmadjian y cols. (en revisión).

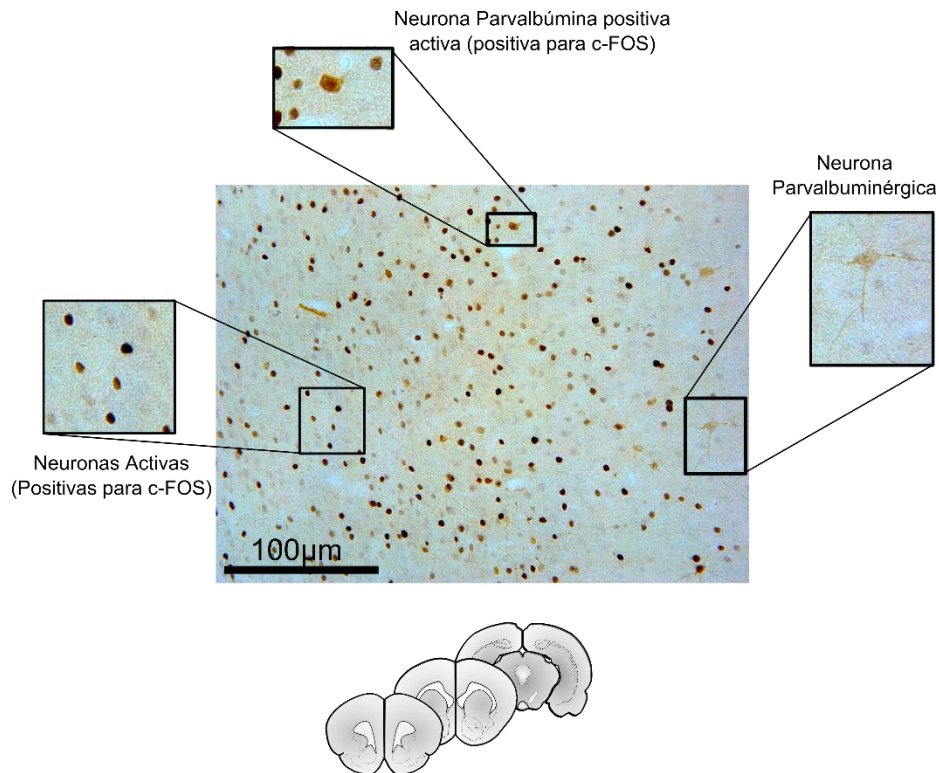


Figura 5: Microfotografía representativa de inmunomarcación para c-Fos (puntos densos oscuros) e interneuronas parvalbúmina positivas (cuerpos celulares y proyecciones en marrón).

Reactividad astrocitaria y microglial

De ambas inmunomarcaciones se obtuvieron imágenes a un aumento de 400x, lo que corresponde a un área de estudio de 0,09204 mm². A fin de determinar la reactividad glial se cuantificó el área ocupada por astrocitos o células de la microglía de forma automática, estableciéndose un umbral de grises entre 100-150, y se expresa como el porcentaje de área cubierta por glía en relación al área de la foto- 0,09204 mm² (Marchese et al. 2020; Basmadjian et al 2021 (en prensa)).

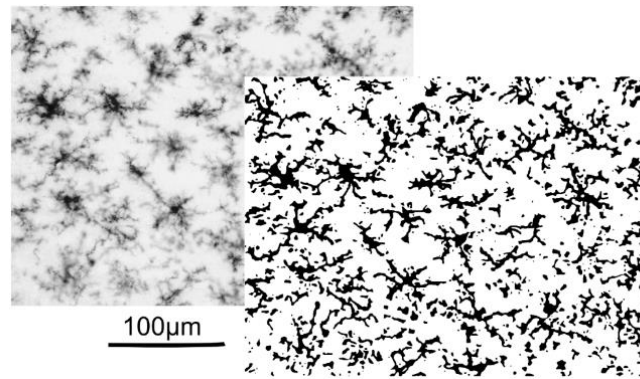


Figura 6: Microfotografía de inmunomarcación para CD11b (400x-izquierda) y equivalente binario (derecha). Con el programa Image J se cuantifica el área total cubierta (%) por células de la microglía.

Morfología de los astrocitos

El análisis de la morfología se llevó a cabo utilizando la extensión para el análisis de Sholl del programa Image J, normalmente utilizado para neuronas y adaptándolo a los astrocitos teniendo como referencia al trabajo de Auzmendi y cols. (2019). Utilizando las mismas imágenes que el punto anterior, se seleccionaron de manera aleatoria un máximo de 24 astrocitos, no solapados, por muestra. Las células que no mostraban un soma claro y reconocible fueron excluidas del análisis. Se selecciona la región de interés que contenga una única célula; estableciendo el umbral de grises entre 100-150, convertimos esa nueva imagen en binaria, y finalmente, se esqueletoniza obteniendo una imagen similar a la **Fig. 7C**. Para el análisis de Sholl, se selecciona el centro de la célula y se establece un radio de inicio entre 2,5 a 5 µm (10-20 píxeles) para enmarcar al soma. El programa toma círculos concéntricos de 5 µm (20 píxeles) de separación entre ellos y cuantifica el número de veces que el esqueleto de la célula cruza cada uno de los radios, es decir, el número de ramificaciones o brazos astrocitarios.

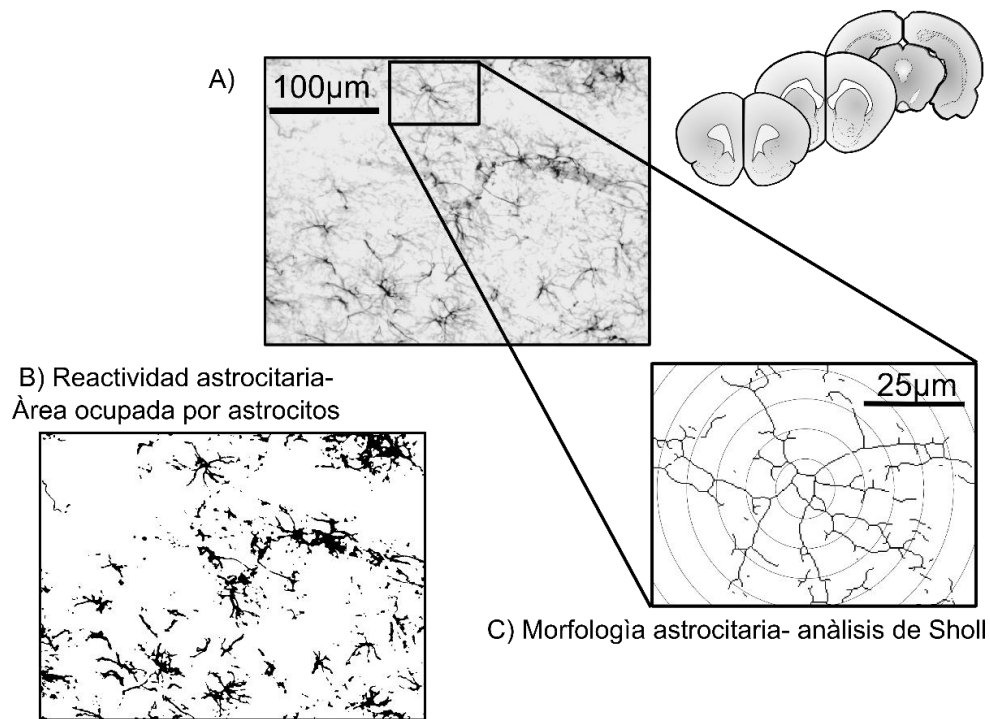


Figura 7: A) Microfotografía original de inmunomarcación para GFAP (400x), B) fotografía luego que se le aplique el umbral elegido e C) imagen representativa del análisis de Sholl (derecha). Con el programa Image J se analiza el área (%) total cubierta por astrocitos y el análisis de Sholl, el cual nos muestra el número de ramificaciones en radios cada 5µm.

Apoptosis celular

Se obtuvieron imágenes a un aumento de 400x correspondiente a un área de estudio de 0,09204 mm². Se cuantificaron de manera manual los cuerpos de Nissl, los que se observan como pequeños puntos amorfos de coloración muy oscura (Marchese et al. 2020).

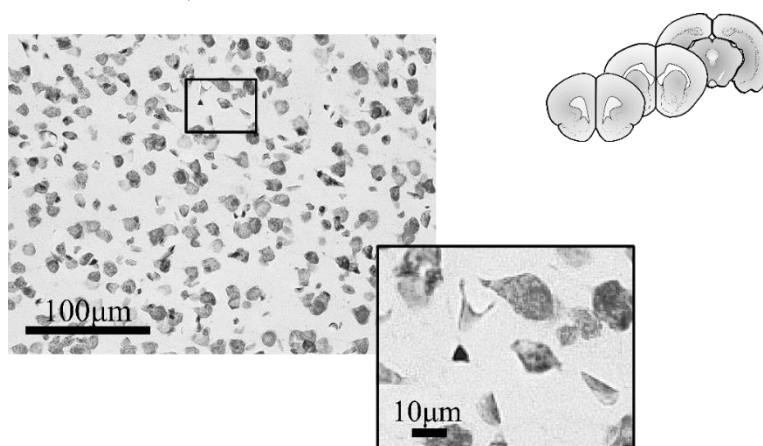


Figura 8: Microfotografía original de tinción de Nissl con cresil violeta (400x en blanco y negro) y magnificación de una célula apoptótica (1000x).

Arquitectura vascular

Para analizar la arquitectura vascular de la corteza prefrontal se obtuvieron imágenes a un aumento de 200x de las áreas Pre- e Infra-Límbica y el análisis se llevó a cabo con la extensión para análisis vascular del programa Image J. Para ello, se delimitan los microvasos de manera manual hasta generar una imagen binaria, a partir de la cual el programa determina de manera automática el área total ocupada por vasculatura, el diámetro vascular promedio, el número de puntos de ramificación y la tortuosidad promedio de los vasos (Marchese et al. 2020; Basmadjian et al 2021 (en prensa)).

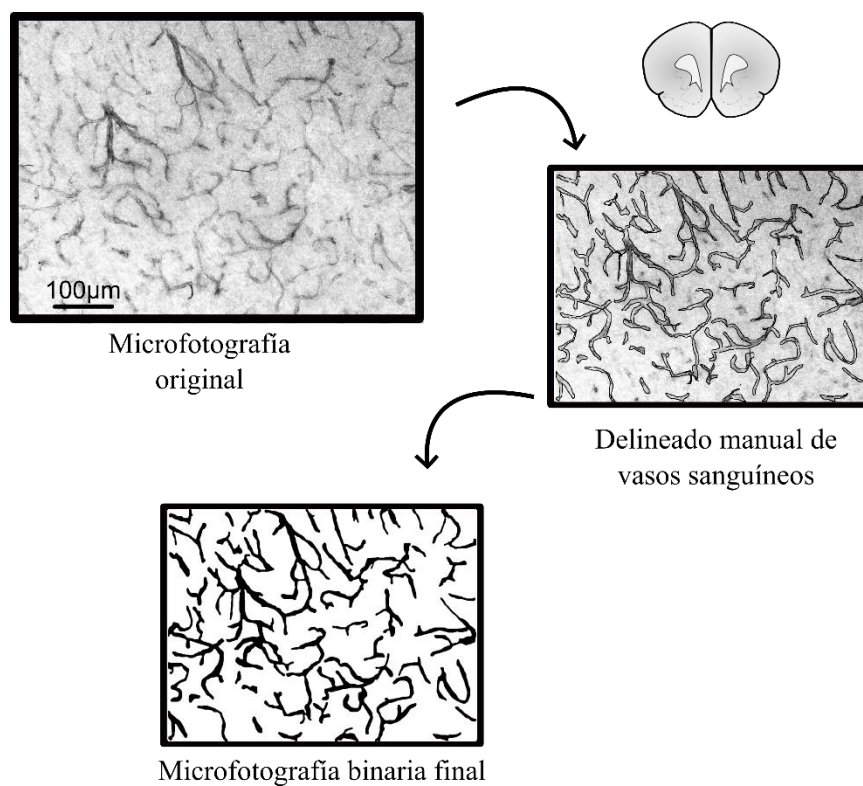


Figura 9: Microfotografías representativas de la inmunomarcación para el factor de von Willebrand (200x) y el proceso de análisis vascular.

Análisis del estrés oxidativo

Como observación complementaria para evaluar el microambiente oxidativo/inflamatorio cerebral, se llevó a cabo el análisis de estrés oxidativo en colaboración con la Dra. M. Jazmín Silvero y la Dra. M. Cecilia Becerra, del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET)

Departamento de Ciencias Farmacéuticas. Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Los animales se sacrificaron por decapitación el día 24, 90 minutos luego de la administración de la dosis desafío de ketamina, se tomaron muestras disecadas de corteza prefrontal, estriado y área tegmental ventral.

Los productos de oxidación avanzada de las proteínas (AOPP por sus siglas en inglés), son uno de los parámetros bioquímicos más utilizados para evaluar estrés oxidativo (Katerji et al., 2019). Los AOPP poseen varios grupos cromóforos, incluyendo pentosidina, carbonilos y proteínas croslinkadas con ditirosina, que muestran absorbancia a 340 nm y hay varios métodos analíticos para detectarlos. En este caso, la determinación de la concentración AOPP se basó en la detección espectrofotométrica según Katerji y cols, (2019) y Witko-Sarsat y cols, (1996). Brevemente, en distintos pocillos de una placa de microtitulación, se aplicaron 200 μ l de dilución de homogenato de las estructuras cerebrales antes mencionadas, 200 μ l de cloramina T (0-100 μ mol / L) para calibración y 200 μ l de PBS como blanco. A continuación, se añadieron a cada pocillo 10 μ l de yoduro de potasio 1,16 M y 20 μ l de ácido acético (glacial) y se leyó inmediatamente la absorbancia a 340 nm. La concentración de AOPP se expresó en unidades de cloramina (μ mol / L) por miligramo de proteína. La cantidad inicial de proteína se evaluó mediante el uso de reactivo de Bradford y leyendo la absorbancia a 595 nm.

El análisis de la peroxidación lipídica es comúnmente utilizado como indicador de daño mediado por ROS, siendo el malondialdehído (MDA) uno de los productos finales de la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados mejor estudiados y que más se utiliza para estimar las condiciones de estrés oxidativo en muestras clínicas (Katerji et al., 2019). Para la cuantificación de MDA, en un tubo *ependorf* con 100 μ l del homogeneizado no diluido, se añadieron 250 μ l de ácido tricloroacético y 250 μ l de ácido tiobarbitúrico. Inmediatamente después, las muestras se mantuvieron en agua hirviendo durante 10 minutos. Se realizó una centrifugación a 1000 rpm durante 10 min después de enfriar para eliminar el sobrenadante de las proteínas desnaturalizadas. La absorbancia se midió inmediatamente a 532 nm. Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico se cuantificaron utilizando un coeficiente de extinción de $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ y se expresaron como nanomol de MDA por miligramo de proteína. La cantidad

proteína total se calculó utilizando reactivo de Bradford como se detalló anteriormente.

Análisis conductual

Actividad Locomotora

Para analizar la actividad locomotora, los días 6 o 24 por la tarde, los animales se colocaron individualmente en una caja de acrílico transparente (largo 60 cm x ancho 40 cm x alto 50 cm) ubicada en una habitación tranquila, diferente a donde habitan, bajo luz tenue. La actividad de los animales se registró mediante una cámara ubicada sobre la caja durante tres horas: 1h *habitación*- para observar el efecto de la novedad-, 1h *salina*- se administró una inyección de solución salina i.p. para excluir el estrés derivado de la inyección y 1h ketamina. La actividad locomotora se analizó utilizando el software EthoWatcher® (Crispim Junior et al., 2012) y se expresó en metros (m).

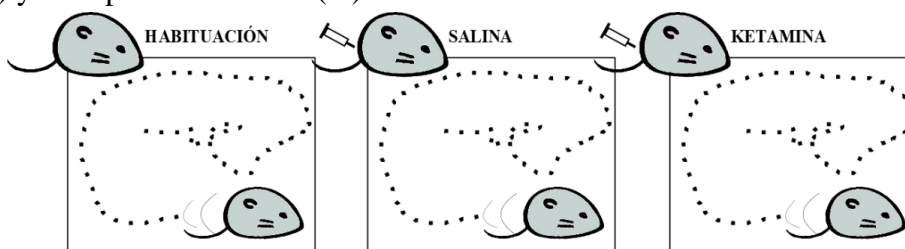


Figura 10: Esquema de la prueba de actividad locomotora en campo abierto. Los días 6 o 24 según corresponda, los animales son distribuidos individualmente en sus cajas para el análisis de la actividad locomotora. Se los deja a luz tenue durante una hora para habituación, seguido de una hora donde reciben una inyección i.p. de salina y finalmente una hora donde reciben la dosis de ketamina correspondiente.

Prueba de interacción social

Los dos días previos al día experimental, los animales fueron habituados individualmente en un campo abierto oscuro (largo 100 cm x ancho 100 cm x alto

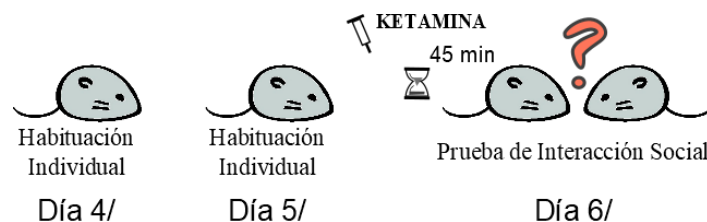


Figura 11: Esquema de la prueba de interacción social. Se realizan dos habituaciones individuales de 5min, en días consecutivos. El día de la prueba conductual (6 o 24 según corresponda) los animales, que nunca compartieron caja, son emparejados según tratamiento y dejados para libre interacción durante 5 min. En el caso del modelo de administración aguda o de la administración de la dosis desafío, 45 min previo a la prueba, ambos animales reciben la dosis correspondiente.

50 cm) en una habitación tranquila y bajo luz tenue, durante 5 min. En el día experimental (día 6 o 24), se colocaron en la caja dos animales desconocidos (nunca compartieron caja habitacional) que hayan recibido el mismo tratamiento, y se los dejó libres para explorar durante 5min, donde el operador no está presente en la sala. La actividad de los animales se registró utilizando una cámara ubicada sobre el campo abierto. En el caso del modelo de administración aguda de ketamina y de la dosis desafío de ketamina, su administración se llevó a cabo 45 min antes de la prueba conductual a fin de suprimir sus efectos psicomotores. El tiempo de interacción pasiva (tiempo en que la distancia entre los animales es menor a 20 cm) y la actividad locomotora de cada animal se analizaron utilizando el programa Tracker Video Analysis and Modeling Tool (Donelson et al., 2012). Tanto las habituaciones como la prueba fueron llevados a cabo por la tarde.

Prueba de reconocimiento de objetos

El día previo al experimento, los animales se habituaron individualmente en un campo abierto oscuro vacío (largo 60 cm x ancho 60 cm x alto 40 cm) en una habitación tranquila con luz tenue, en dos sesiones de 5 min y con un espacio de 90 min entre ellos. Tanto las habituaciones como la prueba fueron llevados a cabo por la tarde. En el día del experimento (día 6 o 24) se colocaron en campo abierto para explorar dos objetos idénticos, durante 5 min, ubicados al azar con una distancia de 10 cm entre ellos- sesión de familiarización. Para la sesión de prueba, se reemplazó un objeto de la sesión de familiarización por uno nuevo y diferente en textura y forma. La actividad de los animales se registró utilizando una cámara sobre el campo durante 3 minutos, y el tiempo invertido en explorar cada objeto se



Figura 12: Esquema de la prueba de reconocimiento de objetos. Se realizan dos habituaciones individuales de 5 min con una separación de 90 min entre ellas. Al día siguiente se lleva a cabo la prueba conductual (día 6 o 24 según corresponda). El animal pasa por un periodo de familiarización de 5 min con dos objetos exactamente iguales; 90 min después, se realiza la prueba de reconocimiento de objetos donde uno de los objetos es cambiado por uno novedoso. La administración de Ketamina (modelo agudo o dosis desafío) se administra 45min antes de la familiarización, a fin de evitar los efectos estimulantes motores

cuantificó en ambas sesiones utilizando el software EthoWatcher®. Los resultados se expresan como el índice de preferencia (IP- la relación entre el tiempo de exploración del nuevo objeto / el tiempo total de exploración) donde una relación superior a 0,5 muestra la preferencia por el nuevo objeto y, en consecuencia, la reminiscencia del antiguo. Se analizó IP para el objeto derecho en la sesión de familiarización y los animales con IP mayor que 0,7 o menor que 0,3 fueron excluidos del análisis.

Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos realizaron con Graph Pad PRISM 6 (USA). Cuando los datos cumplieron con las premisas de distribución normal y homogeneidad de varianza se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de una o dos vías o medidas repetidas (será aclarado en cada experimento). La administración de vehículo/candesartán se consideró como factor *Pre-tratamiento* y salina/ketamina, *Tratamiento*. A fin de poner en evidencia los efectos de la dosis desafío de ketamina, los grupos pre-tratados con vehículo y candesartán fueron analizados de forma separada, siendo el factor *Tratamiento* como la administración de salina/ketamina y factor *Desafío*, como la exposición o no al desafío. En caso de encontrar interacción, se realizó la prueba de Bonferroni. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$ y los valores de las variables se expresan como la media \pm error estándar (ES). Para el análisis de los datos de estrés oxidativo se llevó a cabo un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido de la prueba de Dunn. A fin de facilitar la lectura de esta tesis, los valores estadísticos fueron incluidos en tablas de resumen en la sección resultados y solo los factores de variación que muestran diferencia significativa, están incluidos en el texto y señalados con asterisco (*) en las tablas.

Resultados



Objetivo 1: *La administración repetida de ketamina, ¿altera el patrón de activación neuronal? ¿Participa el receptor AT₁?*

Tal como las teorías dopaminérgica y glutamatérgica lo indican, la esquizofrenia tiene una base fundamental en alteraciones en la activación de áreas claves para la toma de decisiones, percepción de sí mismo y del entorno, y los procesos cognitivos. En estos cambios en el patrón de activación juega un rol clave la neurotransmisión GABAérgica, y dentro de ésta, las interneuronas positivas para parvalbúmina. Estudios en pacientes con esquizofrenia mostraron una disfunción y reducción en el número de interneuronas parvalbuminérgicas en la corteza prefrontal (Benneyworth et al., 2011; Kaar et al., 2019; Lewis et al., 2012). En este sentido, se han encontrado en pacientes esquizofrénicos anomalías relacionadas con oscilaciones de alta frecuencia que se relacionan con la aparición y desarrollo de los síntomas de la enfermedad (Niklitschek et al., 2011).

Considerando estas evidencias, nos propusimos:

- Analizar el patrón de activación neuronal GABAérgica, y de su subpoblación parvalbuminérgica, luego de la administración repetida de ketamina en área tegmental ventral, estriado dorsal y corteza prefrontal.
- Cuantificar el número total de interneuronas GABAérgicas y parvalbuminérgicas, luego de la administración repetida de ketamina.
- Evaluar del rol de los receptores AT₁ en estas alteraciones inducidas por ketamina.

Se llevó a cabo una doble marcación mediante inmunohistoquímica detallado en la sección de materiales y métodos. Se cuantificó el número total de células positivas para c-Fos como activación neuronal total. El porcentaje de activación GABAérgica o parvalbuminérgica resulta del porcentaje de células positivas tanto para c-Fos como para GAD65 o parvalbúmina, respectivamente; en el total de células positivas para c-Fos.

Los resultados son expresados en media \pm error estándar y se reporta sólo el resultado estadísticamente significativo. Para más información estadística, ver la tabla 2 de resumen de valores estadísticos.



Figura 13: Esquema del protocolo para el análisis de la activación neuronal mediante inmunohistoquímica para c-Fos, GAD65 y parvalbúmina. El sacrificio de los animales se realiza 90min luego de la administración de la dosis desafío de Ketamina.

Resultados

Área tegmental ventral

La administración repetida de ketamina no produjo cambios significativos en el patrón de activación neuronal en área tegmental ventral. El análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas en la activación neuronal total (Fig. 14A), en el porcentaje de activación de interneuronas GABA (Fig. 14B). En el mismo sentido, la administración de ketamina no generó cambios en la expresión de interneuronas GABA ya que no se encontraron diferencias significativas en el número de las mismas (Fig. 14C).



Área Tegmental Ventral

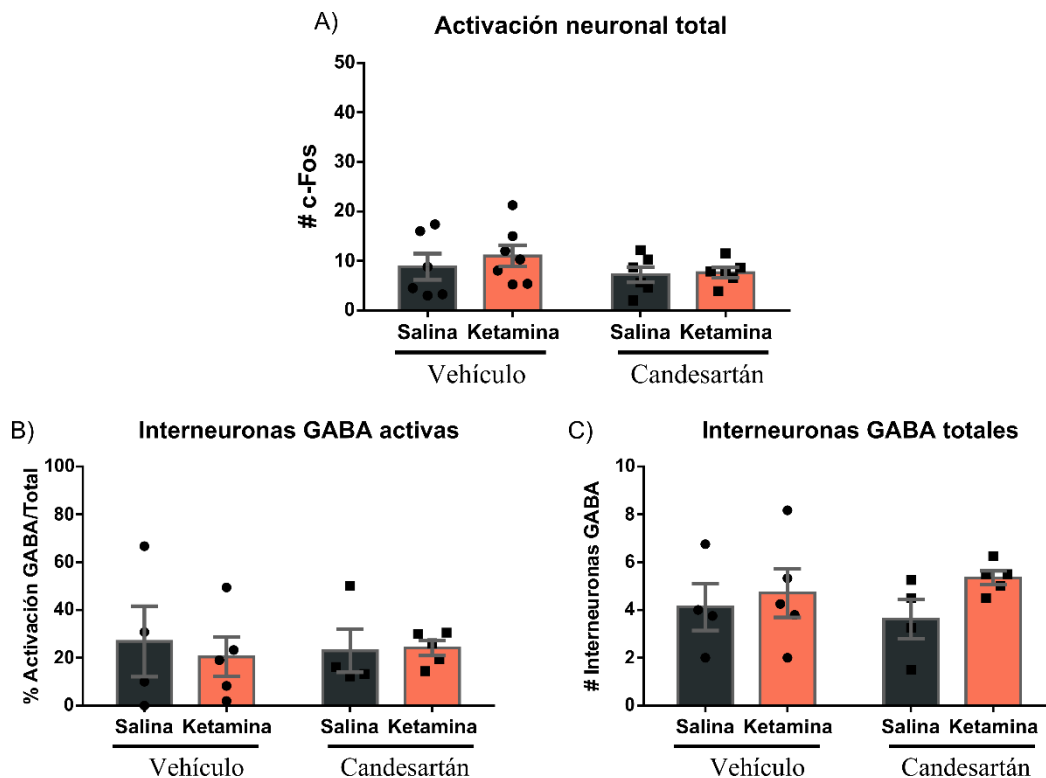


Figura 14: A) No se evidenciaron cambios estadísticamente significativos en la activación neuronal total en el área tegmental ventral, evidenciado como número total de células positivas para c-Fos. B) No se evidenciaron cambios estadísticamente significativos en la activación de Interneuronas GABA expresado como porcentaje de células positivas para GAD y c-FOS, en relación al total de la activación neuronal, C) ni en el número total de interneuronas GABA.

Estriado dorsal

La administración repetida de ketamina indujo una activación exacerbada en respuesta a la dosis desafío, que no se observa cuando se administra el antagonista de los receptores AT₁ (ANOVA *Interacción* $P = 0,0213$; Fig. 15A). El test a posteriori indica que el grupo vehículo-ketamina presenta una activación neuronal significativamente mayor comparado con todos los grupos experimentales (vehículo-salina $p = 0,0062$; candesartán-salina $p = 0,0175$; candesartán-ketamina $p = 0,0455$).

Cuando analizamos la activación de las interneuronas GABA, encontramos que el porcentaje de activación de estas interneuronas es significativamente menor en el grupo vehículo-ketamina (ANOVA *Interacción* $P = 0,0202$; Fig. 15B). El

análisis a posteriori muestra que la activación GABAérgica del grupo vehículo-ketamina es significativamente menor que el resto de los grupos experimentales (vehículo-salina $p=0,0081$; candesartán salina $p=0,0187$; candesartán-ketamina $p=0,0132$) sugiriendo que un aumento en la activación neuronal total no implica una activación similar en estas interneuronas inhibitorias. En el mismo sentido, observamos que la activación neuronal exacerbada no es acompañada por un aumento equivalente de la activación de las interneuronas parvalbuminérgicas (ANOVA *Interacción* $P = 0,0130$; Fig. 15C). La prueba de Bonferroni indica que el grupo vehículo-ketamina presenta una activación de las interneuronas parvalbuminérgicas en relación a la activación neuronal total significativamente menor al vehículo-salina ($p= 0,0263$). De manera similar a los mencionado anteriormente, el bloqueo de los receptores AT_1 no alcanza a prevenir este efecto ($p= 0,5757$ comparado con el vehículo-ketamina) sin embargo no es diferente de su propio control ($p > 0,9999$).

Estas alteraciones funcionales a largo plazo generadas por la administración repetida de ketamina no se ven reflejadas a nivel estructural ya que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos experimentales en el número total de interneuronas GABA ni en la subpoblación parvalbuminérgica (Fig. 15 D y E, respectivamente).

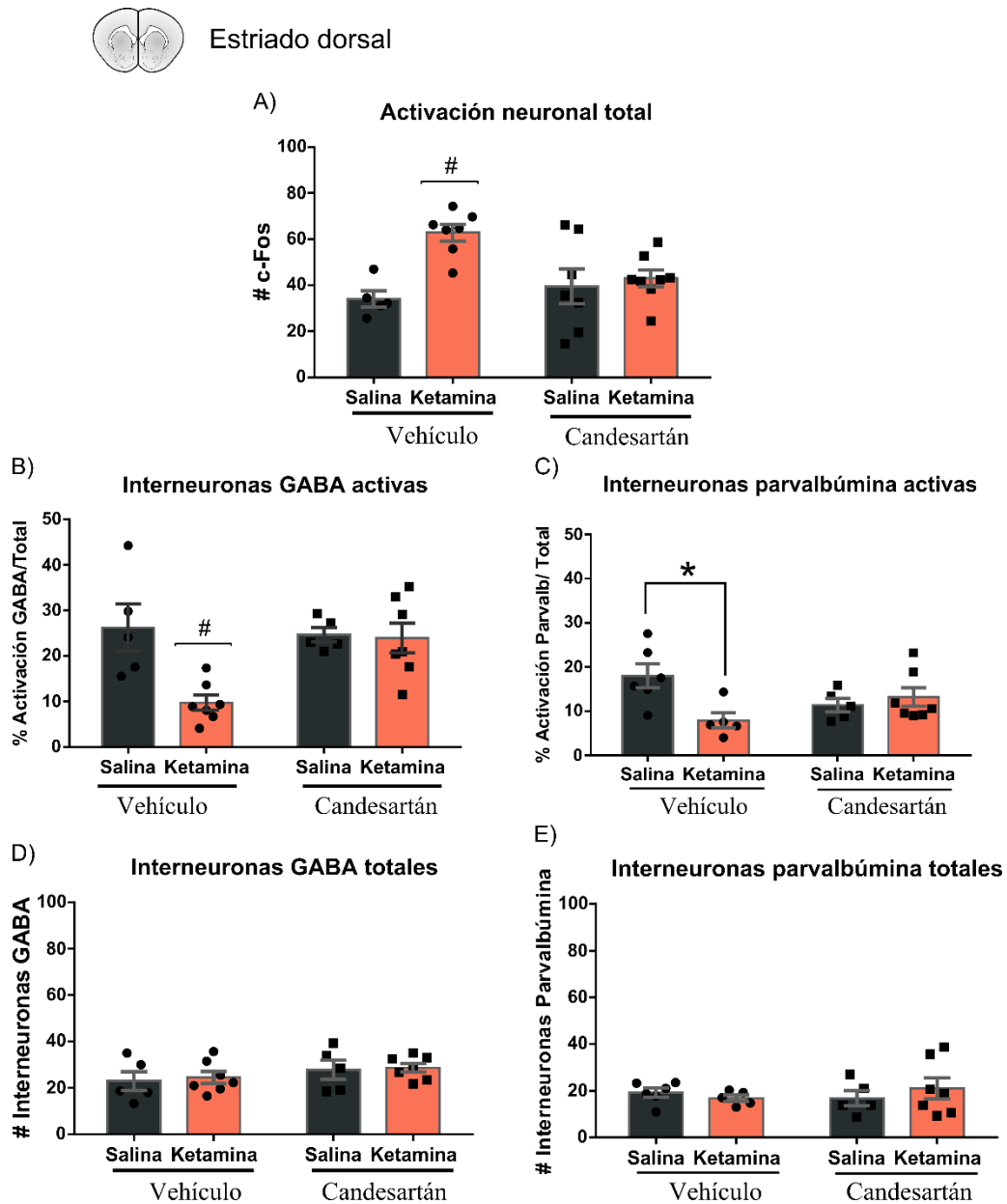


Figura 15: En estriado dorsal, la administración repetida de Ketamina produjo una neuroadaptación que no se observó en el grupo que recibió el antagonista AT₁, candesarán, sugiriendo un rol clave del receptor AT₁ y observada como una A) hiperactivación total y B) una disminución del porcentaje de activación GABAérgica en respuesta a la dosis desafío. C) La administración de Ketamina disminuye el porcentaje de activación parvalbuminérgica, mientras no se observan cambios en los animales tratados con el antagonista del receptor AT₁. No se observaron diferencias significativas en el número total de interneuronas D) GABA o E) de la subpoblación parvalbuminérgica. #*p<0,05, # diferente de todos los grupos experimentales.

Corteza prefrontal

A nivel de la corteza prefrontal encontramos que los cambios en el patrón de activación a largo plazo fueron región dependiente. En el área **Pre-Límbica**, no se observaron cambios en la activación neuronal total frente al desafío ketamina (Fig. 16A); sin embargo, la administración repetida de ketamina produjo una disminución en el porcentaje de activación GABAérgica de manera independiente al receptor AT₁ (ANOVA *Tratamiento* $P = 0,0223$; Fig. 16B). Curiosamente, cuando analizamos la subpoblación parvalbuminérgica observamos que el receptor AT₁ juega un rol crítico ya que previno la reducción del porcentaje de activación de estas interneuronas tras la administración repetida de ketamina (ANOVA *Interacción* $P = 0,0473$; Fig. 16C). En este sentido, la prueba a posteriori indica que el grupo vehículo-ketamina presenta una menor activación de las interneuronas parvalbúmina comparado al grupo vehículo-salina ($p = 0,0426$). El bloqueo de los receptores AT₁ no alcanza a prevenir esta alteración ($p = 0,4650$ con respecto al vehículo-ketamina) aunque no es significativamente diferente de su propio control ($p > 0,9999$).

Al analizar el número total de interneuronas GABAérgicas y parvalbuminérgicas, observamos que no hay diferencias significativas entre los grupos (Fig. 16 D y E, respectivamente).



Corteza Prefrontal Pre-límbica

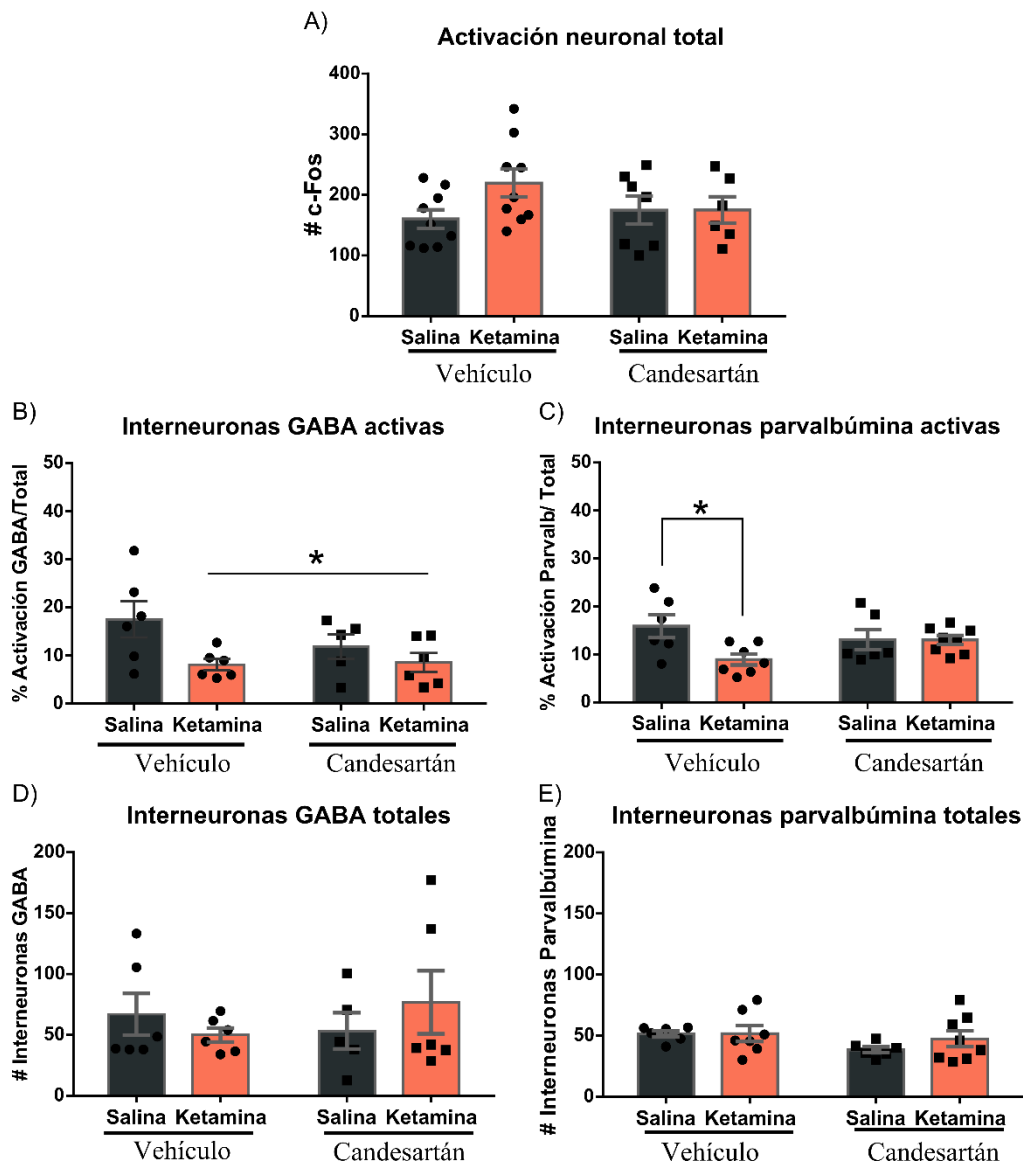


Figura 16: A) No se observaron diferencias significativas en la activación neuronal total en respuesta a la dosis desafío en corteza prefrontal Pre-Límbica. B) La administración repetida de ketamina generó una disminución en el porcentaje de activación GABAérgica independientemente del receptor AT₁. C) La activación de interneuronas de la subpoblación parvalbuminérgica es significativamente menor luego de recibir la ketamina repetida, lo que no se evidencia con el bloqueo del receptor AT₁. D, E) No se observaron diferencias significativas en el número total de interneuronas GABA. *p<0,05.

En el área **Infra-Límbica** se observó un aumento de la activación neuronal total inducida por la exposición repetida a ketamina y en respuesta al desafío ketamina (ANOVA *Interacción* P = 0,0202; Fig. 17A). La prueba a posteriori indica que el grupo vehículo-ketamina presenta una activación neuronal

significativamente mayor al vehículo-salina ($p= 0,0147$) lo cual fue prevenido por la administración previa del antagonista AT_1 ($p= 0,0091$).

Curiosamente, la administración de ketamina no produjo cambios en el porcentaje de activación de interneuronas GABAérgicas ni en la subpoblación parvalbuminérgica (Fig. 17 B y C, respectivamente).

Cuando se analizó el total de interneuronas, se observó un incremento estadísticamente significativo en el número de interneuronas GABAérgicas en los grupos que recibieron la administración repetida de ketamina, independientemente del bloqueo del receptor AT_1 (ANOVA *Tratamiento* $P = 0,0391$; Fig. 17D). Sin embargo, no se evidenciaron diferencias significativas en el número de interneuronas de la subpoblación parvalbuminérgica (Fig. 17E).



Corteza Prefrontal Infra-límbica

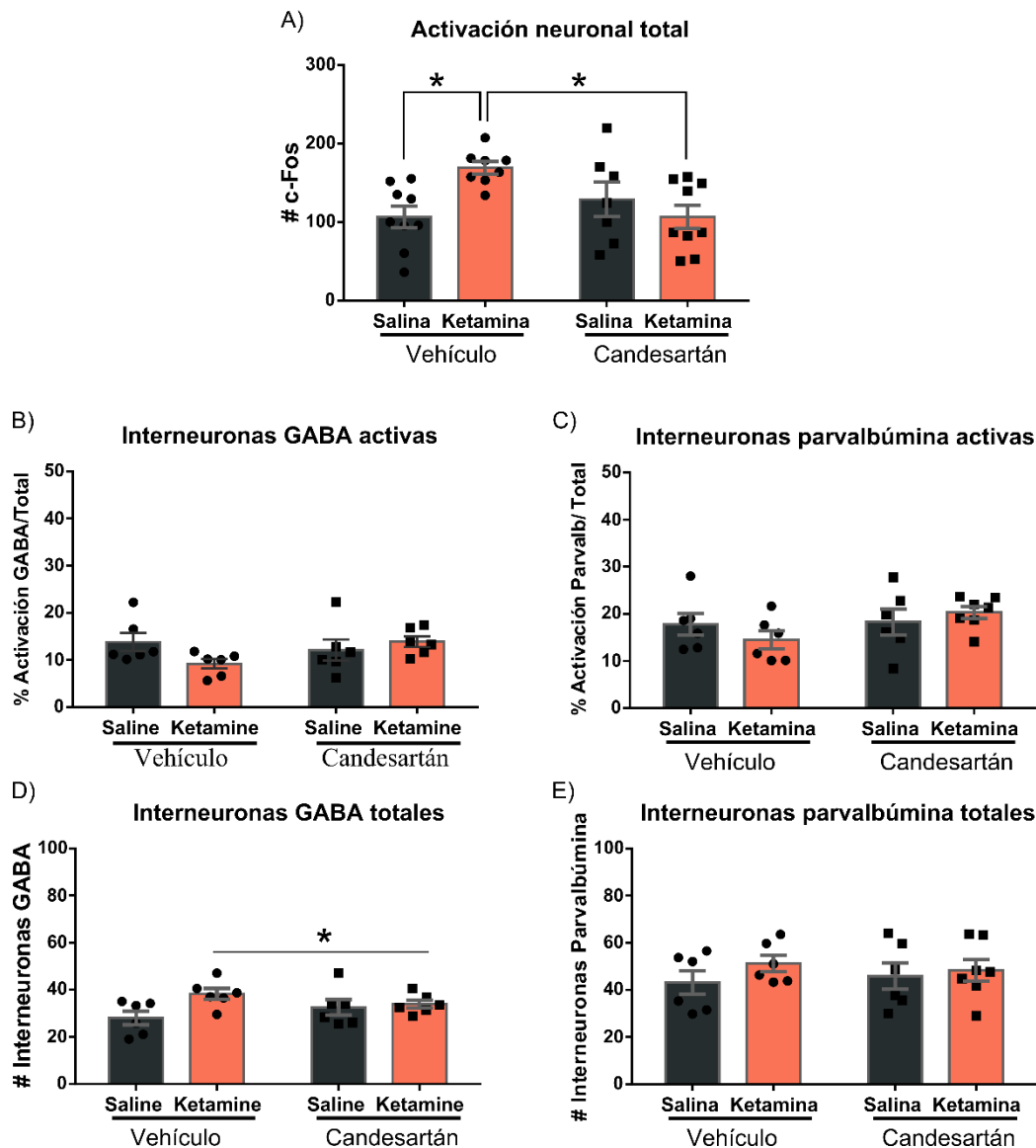


Figura 17: A) En corteza prefrontal Infra-Límbica, la administración repetida de ketamina produjo una neuroadaptación observada como una hiperactivación en respuesta a la dosis desafío, la cual fue prevenida por la administración del antagonista AT₁. B-C) No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de activación de interneuronas GABAérgica o de la subpoblación parvalbuminérgica, sugiriendo que la hiperactivación implicó un aumento equivalente de estas interneuronas inhibitorias. D) La administración repetida de ketamina indujo un aumento duradero en el número de interneuronas GABAérgicas. E) No se observaron diferencias significativas en el número total de interneuronas GABA. * $p < 0,05$.

Tabla 2 Resumen de valores estadísticos

Área tegmental ventral	Activación Neuronal Total		% Activación GABAérgica		% Activación parvalbuminér gica		# Interneuronas GABA		# Interneuronas Parvalbúmina	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F (1, 21) = 0,2050	P = 0,6553	F (1, 14) = 0,1752	P = 0,6818			F (1, 14) = 0,4808	P = 0,4994		
<i>Tratamiento</i>	F (1, 21) = 0,4506	P = 0,5094	F (1, 14) = 0,08636	P = 0,7732			F (1, 14) = 1,974	P = 0,1818		
<i>Pre-tratamiento</i>	F (1, 21) = 1,603	P = 0,2194	F (1, 14) = 0,000144	P = 0,9906			F (1, 14) = 0,00725	P = 0,9333		

Estriado dorsal

	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F (1, 23) = 6,110	*P=0,213	F (1, 20) = 6,366	*P = 0,0202	F (1, 19) = 7,512	*P= 0,0130	F (1, 20) = 0,01469	P = 0,9047	F (1, 19) = 0,9780	P = 0,335
<i>Tratamiento</i>	F (1, 23) = 1,972	P= 0,174	F (1, 20) = 7,510	*P = 0,0126	F (1, 19) = 0,09331	P= 0,7633	F (1, 20) = 0,1506	P = 0,7020	F (1, 19) = 0,08022	P = 0,780
<i>Pre-tratamiento</i>	F (1, 23) = 9,926	*P= 0,0045	F (1, 20) = 4,045	*P = 0,0580	F (1, 19) = 3,633	P= 0,0719	F (1, 20) = 2,126	P = 0,1603	F (1, 19) = 0,08022	P = 0,780

Prefrontal Pre-Límbica

	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F (1, 27) = 1,908	P = 0,1785	F (1, 19) = 1,436	P = 0,2455	F (1, 23) = 4,393	*P = 0,0473	F (1, 19) = 1,308	P = 0,2669	F (1, 23) = 0,6195	P = 0,439
<i>Tratamiento</i>	F (1, 27) = 1,955	P = 0,1735	F (1, 19) = 6,187	*P = 0,0223	F (1, 23) = 4,602	*P = 0,0427	F (1, 19) = 0,03502	P = 0,8535	F (1, 23) = 0,7141	P = 0,407
<i>Pre-tratamiento</i>	F (1, 27) = 0,4883	P = 0,4907	F (1, 19) = 1,033	P = 0,3222	F (1, 23) = 0,1378	P = 0,7138	F (1, 19) = 0,1362	P = 0,7162	F (1, 23) = 2,527	P = 0,126

Prefrontal Infra-Límbica

	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F (1, 26) = 6,126	*P = 0,0202	F (1, 20) = 3,722	P = 0,0680	F (1, 21) = 1,624	P = 0,2164	F (1, 20) = 2,781	P = 0,1110	F (1, 21) = 0,3597	P = 0,555
<i>Tratamiento</i>	F (1, 26) = 3,081	P = 0,0910	F (1, 20) = 0,7512	P = 0,3964	F (1, 21) = 0,09069	P = 0,7663	F (1, 20) = 4,876	*P = 0,0391	F (1, 21) = 1,241	P = 0,2779
<i>Pre-tratamiento</i>	F (1, 26) = 3,180	P = 0,0862	F (1, 20) = 0,8017	P = 0,3812	F (1, 21) = 2,300	P = 0,1443	F (1, 20) = 0,00057	P = 0,9812	F (1, 21) = 0,00015	P = 0,990

Objetivo 2: ¿Qué tipo de respuesta glial, inflamatoria y oxidativa es generada por la administración repetida de ketamina? ¿Tiene efecto la dosis desafío de ketamina? ¿Participan los receptores AT₁?

En los últimos años, se ha propuesto que los astrocitos tienen un rol central en el desarrollo de patologías como esquizofrenia, Parkinson, Alzheimer y depresión mayor debido a que alteraciones en la reactividad astrocitaria generan un desbalance en la homeostasis, desacoplamiento de la unidad neurovascular, neuroinflamación y muerte neuronal (Blanco-Suárez et al., 2017; Cragolini et al., 2020; McConnell et al., 2019; Phatnani & Maniatis, 2015). En este sentido, estudios postmortem en pacientes con esquizofrenia indicaron una reactividad astrocitaria crónica con hipertrofia celular, acompañado de un aumento en la densidad de células de microglía (Van Kesteren et al., 2017), generalmente, relacionados con el historial y la gravedad de la enfermedad (Arnold et al., 1996; Bernstein et al., 2015; Catts et al., 2014). Más aún, se ha propuesto que el daño oxidativo en los lípidos es un biomarcador temprano de esquizofrenia (Monte et al., 2013; Vasconcelos et al., 2015), mientras que los efectos antiinflamatorios de los fármacos antipsicóticos sustentan también la raíz inflamatoria en la etiopatología de la esquizofrenia (Tourjman et al., 2013).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos propusimos:

- Analizar de la respuesta glial e inflamatoria cortico-límbica a la administración de ketamina
 1. Astrocitos
 2. Microglía
 3. Apoptosis celular
 4. Estrés oxidativo
- Evaluar la participación del receptor AT₁ en las alteraciones gliales e inflamatorias generadas por la administración de ketamina

Se llevó a cabo una inmunomarcación para astrocitos y células de la microglía y tinción de Nissl para poner en evidencia los cuerpos apoptóticos. La reactividad astrocitaria y microglial se evalúa mediante el área ocupada por astrocitos o células de la microglía, respectivamente. El análisis del estrés oxidativo se llevó a cabo por detección espectrofotométrica.

Los resultados son expresados en media \pm error estándar y se reporta solo el P estadísticamente significativo. Para más información, ver las tablas 3, 4 y 5 (astrocitos, Microglía y apoptosis celular, respectivamente) de resumen de valores estadísticos.



Figura 18: Esquema del protocolo para el análisis de la reactividad astrocitaria (GFAP) y microglial (CD11b) y la apoptosis celular (Tinción de Nissl con cresil violeta). Se analizó en condiciones basales o 24hs después de una dosis desafío de Ketamina.

Objetivo 2^a: Astrocitos

Área tegmental ventral

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el área ocupada por astrocitos ni en el número de ramificaciones luego de la administración repetida de ketamina y/o del antagonista del receptor AT₁, o de la dosis desafío de ketamina (Fig. 19).



Área Tegmental Ventral

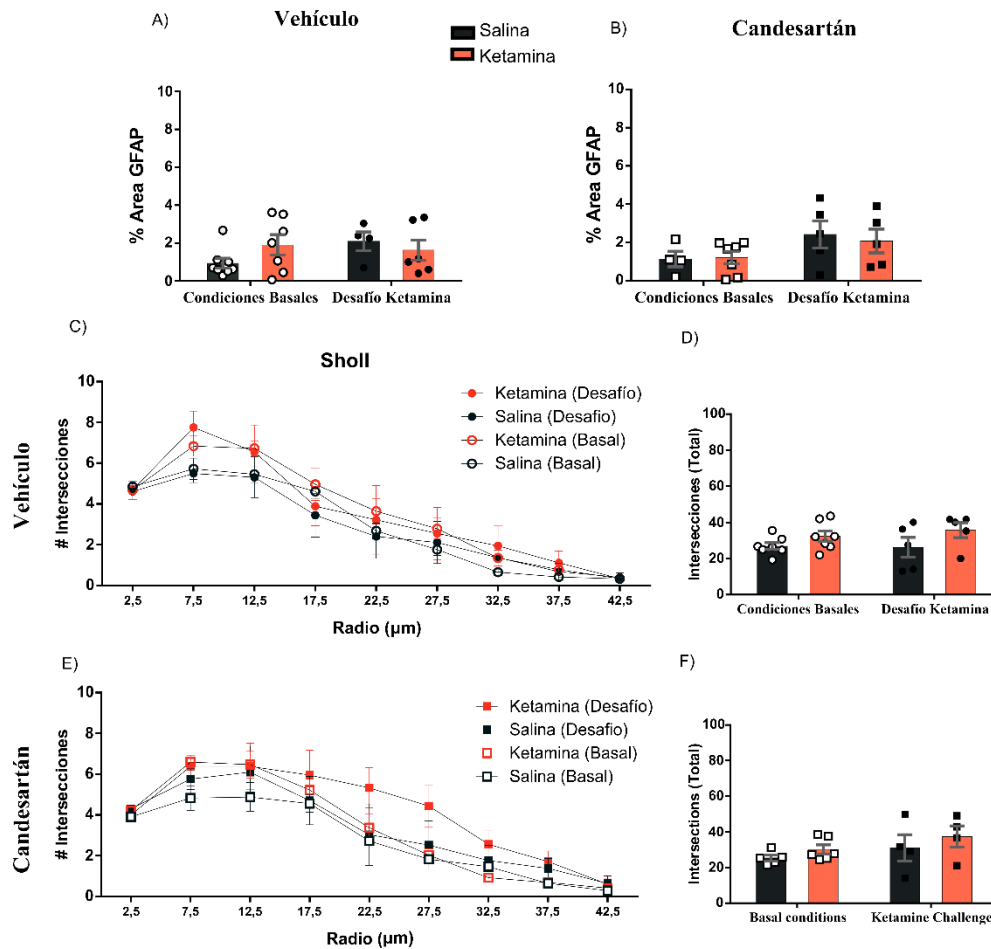


Figura 19: En el área tegmental ventral no se observaron cambios significativos en la reactividad (A-B) o morfología astrocitaria (C-F) después de la administración repetida de Ketamina, tanto en condiciones basales como luego del

Estriado dorsal

Observamos que la administración repetida produjo un aumento en la reactividad astrocitaria en el grupo vehículo (*Tratamiento* $P = 0,0254$). La dosis desafío de ketamina produjo una disminución en la reactividad astrocitaria independientemente del receptor AT_1 , ya que se evidencia tanto en el grupo vehículo (*Desafío* $P < 0,0001$; Fig. 20A) como en el tratado con candesartán (*Desafío* $P = 0,0226$; Fig. 20B). Es importante destacar que en el grupo vehículo aún se evidencia un aumento en el área ocupada por astrocitos luego de la administración de la dosis desafío, a pesar del efecto anti-gliótico de la misma.

Cuando analizamos la morfología de los astrocitos encontramos que la exposición repetida a ketamina no produjo cambios significativos en el grupo vehículo (Fig. 20 C y D). Curiosamente, cuando se bloquean los receptores AT₁, en el grupo candesartán el desafío con ketamina aumenta el número de ramificaciones de los astrocitos (Total de interacciones: *Desafío* P = 0,0122; Fig. 20 E y F).

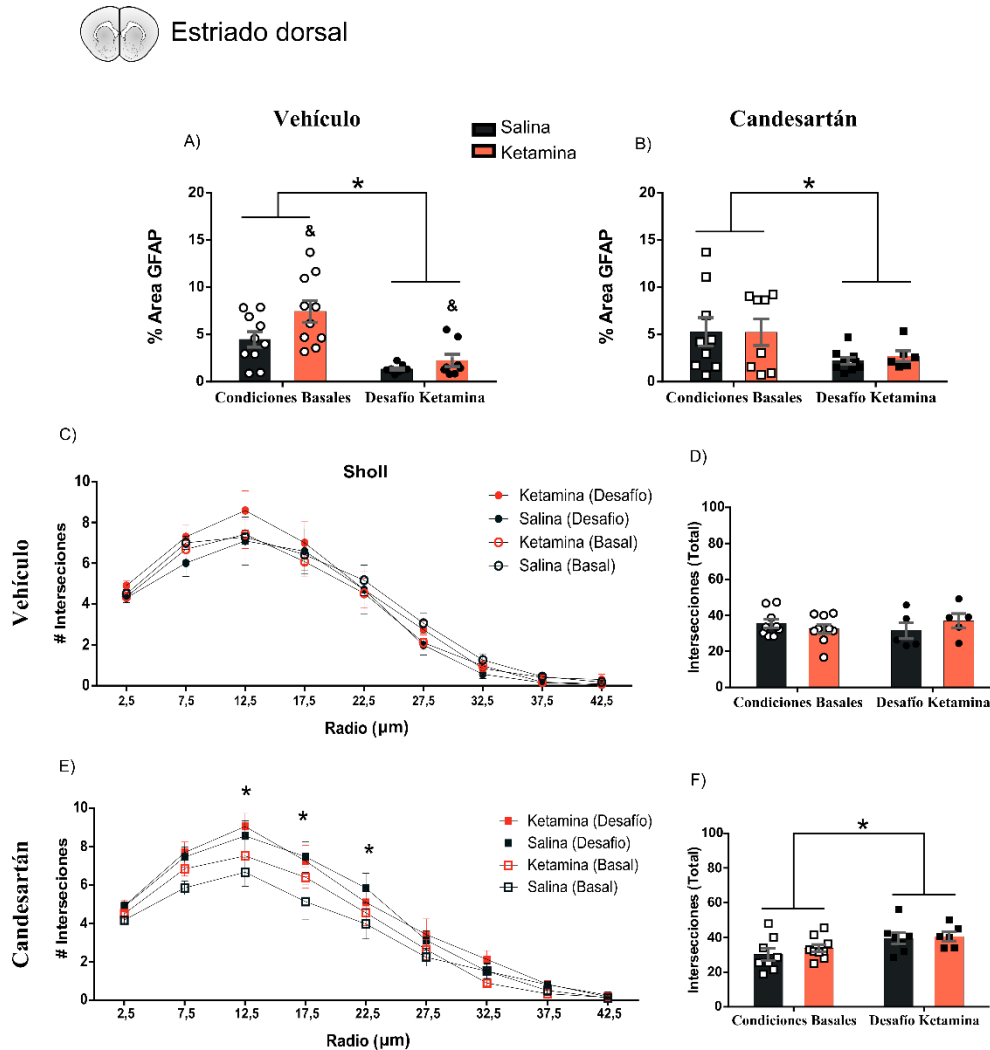


Figura 20: A-B) El desafío de Ketamina produce una disminución de la reactividad astrocitaria, independiente del bloqueo del receptor AT₁, así como de la exposición previa a Ketamina en estriado dorsal. La administración repetida de Ketamina genera un aumento a largo plazo en la reactividad astrocitaria, aún visible luego del efecto anti-gliótico de la dosis desafío (&), que depende de la participación del receptor AT₁. C-D) La administración repetida y aguda de Ketamina no produjo cambios significativos en la morfología astrocitaria *per se*, sin embargo, E-F) el bloqueo de los receptores AT₁ altera la respuesta frente al desafío con Ketamina, independientemente de la administración repetida de Ketamina. El análisis a posteriori para el análisis de Sholl, indica que los grupos salina (desafío) y Ketamina (desafío) presentaban mayor ramificación comparada con el grupo control (salina-Basal) en los radios 12,5; 17,7 y 22,5. De la misma forma, en los radios 12,5 y 17,5. *&p<0.05.

Corteza prefrontal

En la **Corteza prefrontal** encontramos una respuesta dependiente del área que analizamos. En el área **Pre-Límbica**, la administración repetida de ketamina generó un aumento de la reactividad glial, en condiciones basales, en el grupo vehículo (*Interacción* $P = 0,0276$; Fig. 21A). El desafío con ketamina redujo la astrogliosis independientemente de su tratamiento previo (vehículo: *Desafío* $P = 0,0012$; candesartán: *Desafío* $P = 0,0360$; Fig. 21B).

Al analizar la morfología de los astrocitos observamos que la administración de la dosis desafío de ketamina redujo el número de ramificaciones con respecto al control (Total intersecciones *Desafío* $P = 0,0234$; Fig. 21 C y D). Todas estas alteraciones estructurales fueron prevenidas por el bloqueo del receptor AT_1 ya que no se encontraron diferencias significativas dentro del grupo candesartán (Fig. 21 E y F).



Corteza Prefrontal Pre-límbica

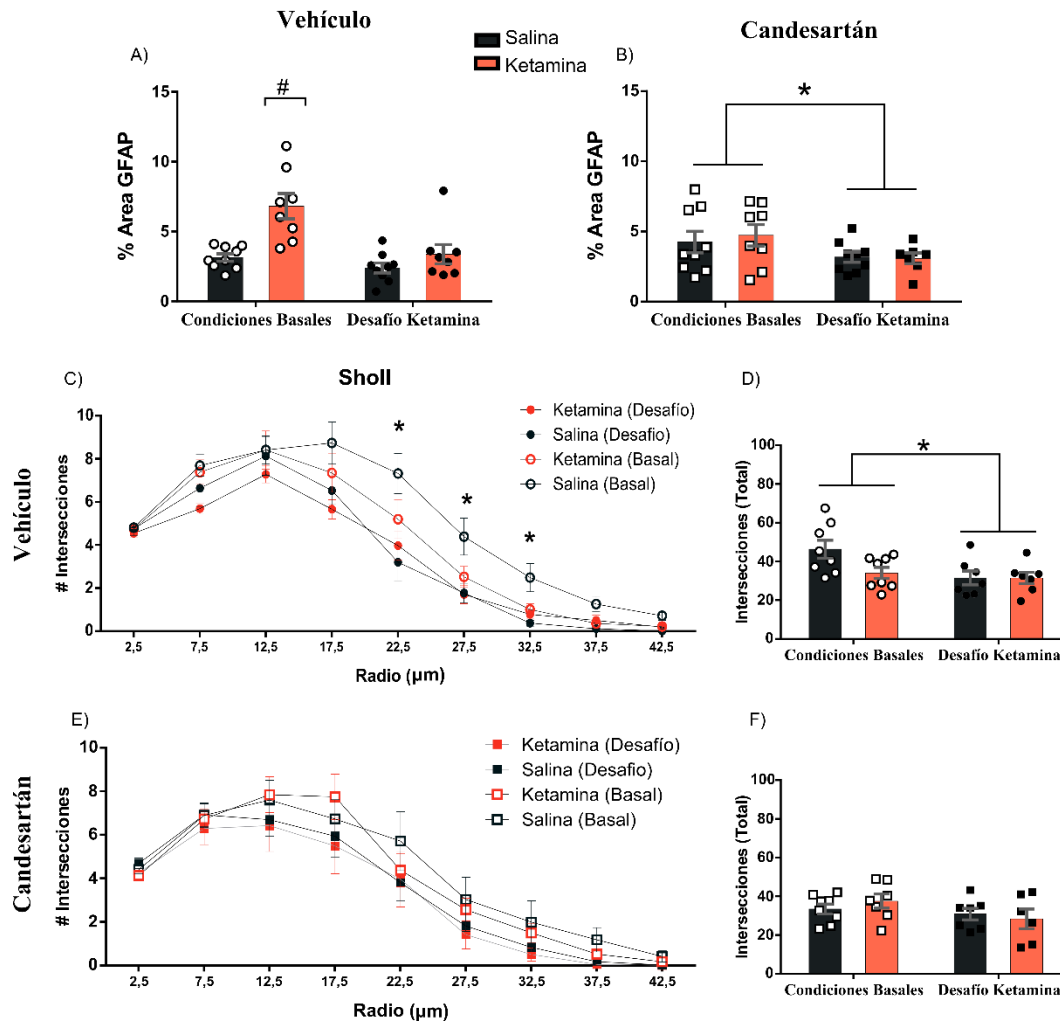


Figura 21: A-B) En el área prefrontal Pre-Límbica, la administración aguda de la dosis desafío de ketamina presenta un efecto anti-gliótico, independiente de la participación del receptor AT_1 y de la exposición previa a ketamina. La administración repetida de ketamina genera un incremento en la reactividad astrocitaria que depende de la participación del receptor AT_1 . El análisis a posteriori del grupo vehículo indica que el grupo tratado con ketamina, en condiciones basales, presenta mayor cantidad de área ocupada por astrocitos en comparación con los demás grupos experimentales. C-D) La administración de la dosis desafío reduce el número de ramificaciones de manera independiente al tratamiento previo con ketamina. El análisis a posteriori de Sholl en el grupo vehículo, indica que los grupos salina y ketamina (desafío) presentan menos ramificaciones que el grupo control, en los radios del 17,5 al 32,5. E-F) Las alteraciones morfológicas dependen de la participación del receptor AT_1 . *# $p < 0,05$. # Diferente de todos los grupos experimentales.

En el área **Infra-Límbica**, de manera similar a lo observado en Pre-Límbica, la exposición repetida de ketamina generó un incremento en la reactividad astrocitaria en el grupo vehículo (ANOVA *Interacción* $P = 0,0411$; Fig. 22A), lo

cual fue prevenido por el bloqueo del receptor AT₁, ya que no se observan diferencias significativas en el grupo candesartán. Nuevamente, la administración de la dosis desafío de ketamina redujo la astrogliosis de manera independiente a la administración previa de ketamina o al bloqueo del receptor AT₁ (vehículo *Desafío* P = 0,0017. Candesartán *Desafío* P = 0,0263; Fig. 22B).

Cuando analizamos la estructura de los astrocitos encontramos que la administración repetida de ketamina generó un aumento de las ramificaciones en condiciones basales, la cual fue revertida por el desafío con ketamina (Sholl: *Interacción* P = 0,0184. Total de intersecciones *Interacción* P = 0,0167, Fig. 22 C y D). Estas alteraciones morfológicas son dependientes del receptor AT₁ ya que no se observaron diferencias significativas en el grupo candesartán (Fig. 22 E y F).

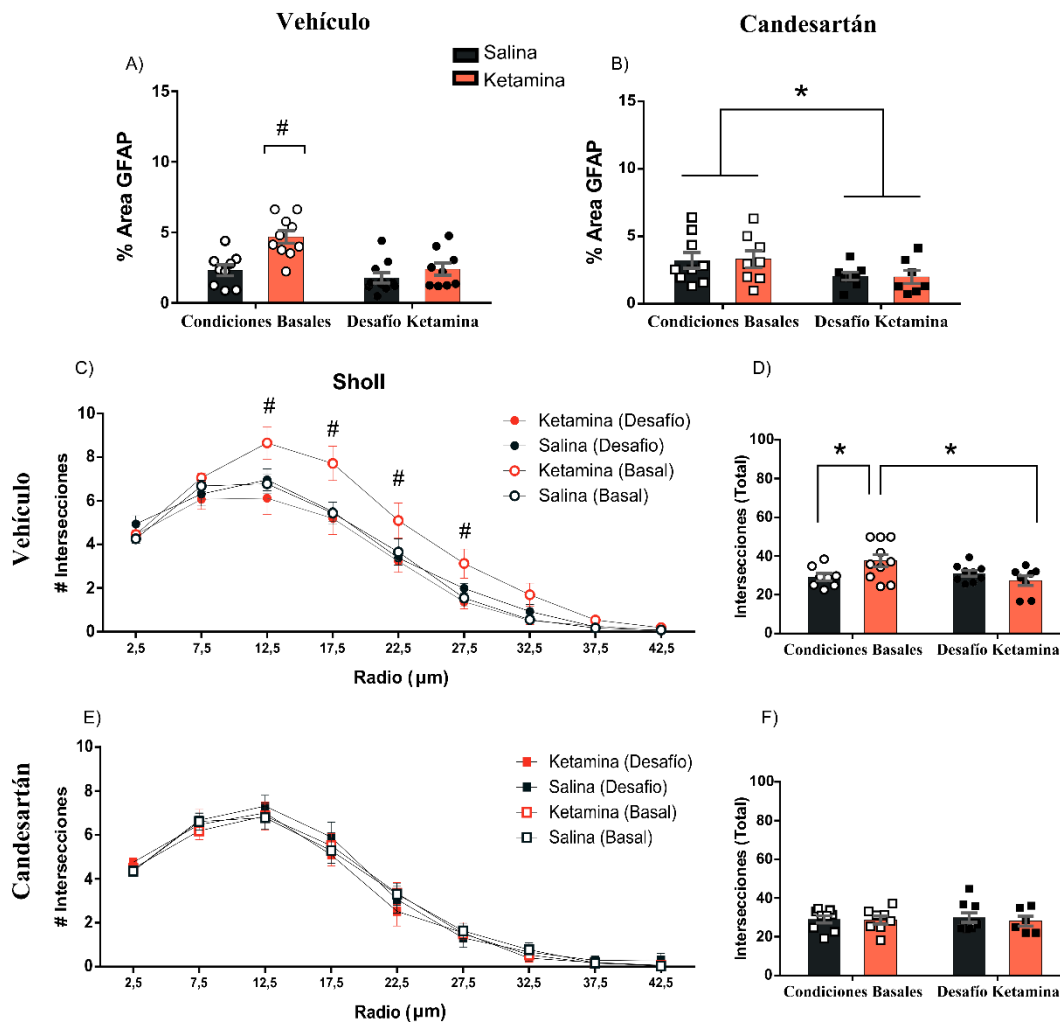
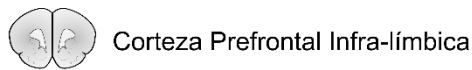


Figura 22: A-B) En el área prefrontal Infra-Límbica, la administración repetida de ketamina produjo un incremento de la reactividad astrocitaria a largo plazo, dependiente del receptor AT₁; mientras que la dosis desafío presenta un efecto anti-gliótico, independiente de la administración previa de ketamina o del antagonista AT₁. El análisis a posteriori indica en el grupo vehículo indica que el grupo ketamina, en condiciones basales, presenta mayor cantidad de área ocupada en comparación con los demás grupos experimentales. C-D) La administración repetida de ketamina generó un incremento en las ramificaciones a largo plazo. El análisis a posteriori en Sholl indica que entre los radios 12,5 y 27,5 el grupo ketamina (Basal) muestra mayor ramificación astrocitaria que los demás grupos experimentales. El análisis a posteriori del total de intersecciones indica que el grupo ketamina (basal) es significativamente más ramificado que el grupo control o que el grupo ketamina (desafío). E-F) Todas las alteraciones morfológicas fueron prevenidas por el antagonista AT₁. *#p<0,05. # Diferente de todos los grupos experimentales.

Tabla 3: Resumen de los valores estadísticos

Reactividad astrocitaria	<i>Área tegmental ventral</i>				<i>Estriado dorsal</i>			
	Vehículo		Candesartán		Vehículo		Candesartán	
	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F (1, 21) = 2,283	p= 0,1457	F (1, 17) = 0,1586	p= 0,6954	F (1, 33) = 1,586	p = 0,2168	F (1, 28) = 0,057	p = 0,8132
<i>Tratamiento</i>	F (1, 21) = 0,2748	p= 0,6056	F (1, 17) = 0,0642	p= 0,8030	F (1, 33) = 5,48	*p = 0,0254	F (1, 28) = 0,0429	p = 0,8373
<i>Desafío</i>	F (1, 21) = 0,8520	p= 0,3665	F (1, 17) = 4,172	p= 0,0569	F (1, 33) = 25,44	*p < 0,0001	F (1, 28) = 5,820	p = 0,0226
Total de Intersecciones	Vehículo		Candesartán		Vehículo		Candesartán	
	F	P	F	P	F	P	F	P
	<i>Interacción</i>	F (1, 20) = 0,4215	p=0,5236	F (1, 15) = 0,0276	p= 0,8701	F (1, 24) = 1,652	p = 0,211	F (1, 26) = 0,1854
<i>Tratamiento</i>	F (1, 20) = 4,294	p=0,0514	F (1, 15) = 1,591	p= 0,2264	F (1, 24) = 0,1526	p = 0,6995	F (1, 26) = 0,6163	p = 0,4395
<i>Desafío</i>	F (1, 20) = 0,08655	p= 0,7716	F (1, 15) = 2,197	p= 0,1589	F (1, 24) = 0,005410	p= 0,9420	F (1, 26) = 7,256	*p= 0,0122
Sholl	Vehículo		Candesartán		Vehículo		Candesartán	
	F	P	F	P	F	P	F	P
	<i>Interacción</i>	F (24, 144) = 1,114	p= 0,3362	F(24, 120)= 1,654	*p= 0,0408	F (24, 192) = 0,451	p= 0,9881	F (24, 200) = 1,208
<i>Tratamiento</i>	F (3, 18) = 0,8566	p= 0,4814	F 3, 15)= 1,362	p= 0,2923	F (3, 24) = 0,5274	p= 0,6677	F (3, 25) = 2,598	p = 0,0747
<i>Radio</i>	F (8, 144) = 106,3	*p<0,0001	F(8, 120)= 92,99	*p<0,0001	F (8, 192) = 168,1	*p<0,0001	F (8, 200) = 201,7	*p<0,0001
<i>Subjects</i>	F (18, 144) = 8,890	*p<0,0001	F(15, 120)= 10,99	*p<0,0001	F (24, 192) = 5,874	*p<0,0001	F (25, 200) = 6,543	*p<0,0001
<i>Bonferroni post hoc</i>					12,5µm			
					salina (CB) vs, salina (DK) p= 0,0441			
					salina (CB) vs, ketamina (DK) p= 0,0134			
					17,5µm			
					salina (CB) vs, salina (DK) p= 0,0057			
					salina (CB) vs, ketamina (DK) p= 0,0379			
					22,5µm			
					salina (CB) vs, salina (DK) p= 0,0465			
Desafío ketamina= DK Condiciones basales= CB								

Tabla 3: Resumen de los valores estadísticos (continuación)

Reactividad astrocitaria	<i>Infra-Límbica</i>				<i>Pre-Límbica</i>			
	Vehículo		Candesartán		Vehículo		Candesartán	
	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F (1, 34) = 4,507	*p=0,0411	F (1, 28) = 0,0171	p=0,8968	F (1, 30) = 5,365	*p= 0,0276	F (1, 29) = 0,0962	p= 0,7586
<i>Tratamiento</i>	F (1, 34) = 12,96	*p=0,001	F (1, 28) = 0,00125	p=0,9721	F (1, 30) = 16,09	*p= 0,0004	F (1, 29) = 0,2107	p= 0,6497
<i>Desafío</i>	F (1, 34) = 11,67	*p=0,0017	F (1, 28) = 5,504	*p=0,0263	F (1, 30) = 12,86	*p= 0,0012	F (1, 29) = 4,837	*p= 0,0360
<i>Bonferroni post hoc</i>	ketamina (CB)- salina (CB)		p= 0,0017		ketamina (CB)- salina (CB)		p=0,0006	
	ketamina (CB)- salina (DK)		p=< 0,0001		ketamina (CB)- salina (DK)		p=< 0,0001	
	ketamina (CB)- ketamina (DK)		p=0,0025		ketamina (CB)- ketamina (DK)		p=0,002	
Total de Intersecciones	Vehículo		Candesartán		Vehículo		Candesartán	
	F	P	F	P	F	P	F	P
	F (1, 31) = 6,398	*p = 0,017	F (1, 28) = 0,1078	p=0,7451	F (1, 26) = 2,858	p = 0,1029	F (1, 24) = 0,8736	p = 0,3593
F (1, 31) = 0,9354	p= 0,3409	F (1, 28) = 0,2232	p=0,6403	F (1, 26) = 2,88	p = 0,1015	F (1, 24) = 0,0515	p = 0,8225	
<i>Desafío</i>	F (1, 31) = 3,040	*p=0,0911	F (1, 28) = 0,00721	p=0,9329	F (1, 26) = 5,798	*p= 0,0234	F (1, 24) = 2,851	p = 0,1043
Sholl	Vehículo		Candesartán		Vehículo		Candesartán	
	F	P	F	P	F	P	F	P
	F(24, 240)= 1,758	*p= 0,0184	F(24, 224)= 0,4097	p= 0,9942	F(24, 216)= 2,352	*p= 0,0006	F (24, 184) = 0,726	p=0,8208
F(3, 30)= 4,221	*p= 0,0133	F(3, 28)= 0,1134	p= 0,9516	F(3, 27)= 3,405	*p= 0,0318	F (3, 23) = 0,8312	p= 0,4904	
F(8, 240)= 231,0	*p<0,0001	F(8, 224)= 253,7	*p<0,0001	F(8, 216)= 208,8	*p<0,0001	F (8, 184) = 116,4	*p<0,0001	
<i>Subjects</i>	F(30, 240)= 5,116	*p<0,0001	F(28, 224)= 4,828	*p<0,0001	F(27, 216) = 9,87	*p<0,0001	F (23, 184) = 10,00	*p<0,0001
<i>Bonferroni post hoc</i>	12,5µm				17,5µm			
	salina (CB) vs, ketamina (CB)		p=0,0074		salina (CB) vs, ketamina (CB)		p=0,2216	
	ketamina (CB) vs, salina (DK)		p=0,0144		salina (CB) vs, salina (DK)		p=0,0239	
	ketamina (CB) vs, ketamina (DK)		p=0,0001		salina (CB) vs, ketamina (DK)		p=0,0007	
	17,5µm				22,5µm			
	ketamina (CB) vs, salina (CB)		p=0,0008		salina (CB) vs, ketamina (CB)		p=0,0194	
	ketamina (CB) vs, salina (DK)		p=0,0008		salina (CB) vs, salina (DK)		p=< 0,0001	
	ketamina (CB) vs, ketamina (DK)		p=0,0002		salina (CB) vs, ketamina (DK)		p=0,0002	
	22,5µm				27,5µm			
	salina (CB) vs, ketamina (CB)		p=0,0594		salina (CB) vs, ketamina (CB)		p=0,0487	
	ketamina (CB) vs, salina (DK)		p=0,0132		salina (CB) vs, salina (DK)		p=0,0051	
	ketamina (CB) vs, ketamina (DK)		p=0,008		salina (CB) vs, ketamina (DK)		p=0,0038	
	27,5µm							
	salina (CB) vs, ketamina (CB)		p=0,0331					
	ketamina (CB) vs, salina (DK)		p=0,1742					
ketamina (CB) vs, ketamina (DK)		p=0,0142						

Objetivo 2b: Microglía

Cuando analizamos la reactividad de las células de la microglía, observamos que la administración de la dosis desafío con ketamina produjo una reducción significativa de la reactividad de la microglía independientemente del tratamiento previo en *estriado dorsal* (vehículo *Desafío* $P = 0,0001$. Candesartán *Desafío* $P = 0,0003$) y en ambas áreas de la *corteza prefrontal: Pre-límbica* (vehículo *Desafío* $P = 0,0329$. Candesartán *Desafío* $P = 0,0081$) e *Infra-límbica* (vehículo *Desafío* $P = 0,0017$. Candesartán *Desafío* $P = 0,0023$). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas a nivel del *Área tegmental ventral*

Tabla 4: Resumen de valores estadísticos

<u>Reactividad microglial</u>	Área tegmental ventral				Estriado dorsal			
	Vehículo		Candesartán		Vehículo		Candesartán	
	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F(1, 19)= 2.134	p= 0.1604	F(1, 15)= 0.8990	p= 0.3581	F (1, 29) = 0,0479	p = 0,8283	F (1, 23) = 0,368	p = 0,5499
<i>Tratamiento</i>	F(1, 19)= 0.4394	p= 0.5154	F(1, 15)= 0.00384	p= 0.9514	F (1, 29) = 4,135	p = 0,0512	F (1, 23) = 7,827e-006	p = 0,9978
<i>Desafío</i>	F(1, 19)= 0.2804	p= 0.6026	F(1, 15)= 1.500	p= 0.2395	F (1, 29) = 19,42	*p = 0,0001	F (1, 23) = 18,14	*p = 0,0003

	Infra-Límbica				Pre-Límbica			
	Vehículo		Candesartán		Vehículo		Candesartán	
	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F(1, 31)= 0.000076	p= 0.9931	F(1, 29)= 0.02584	p= 0.8734	F(1, 29)= 0.6825	p= 0.4155	F(1, 29)= 0.1951	p= 0.6619
<i>Tratamiento</i>	F(1, 31)= 0.02599	p= 0.8730	F(1, 29)= 0.008244	p= 0.9283	F(1, 29)= 0.5573	p= 0.4614	F(1, 29)= 0.3802	p= 0.5423
<i>Desafío</i>	F(1, 31)= 11.87	*p= 0.0017	F(1, 29)= 11.17	*p= 0.0023	F(1, 29)= 5.017	*p= 0.0329	F(1, 29)= 8.079	*p= 0.0081

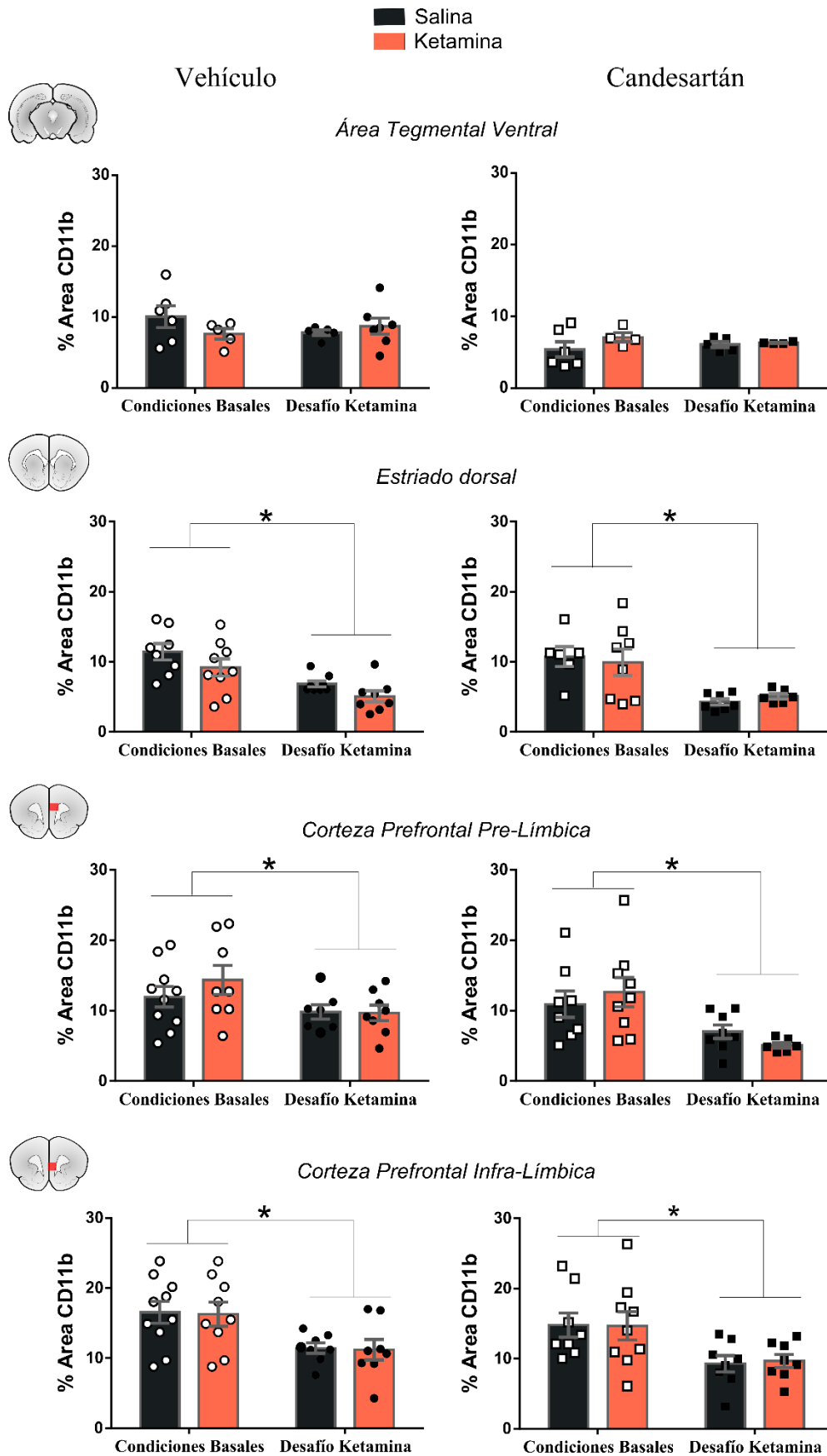


Figura 23: La dosis desafío de Ketamina produjo una disminución en la reactividad microglial, independientemente del tratamiento previo. * $p < 0,05$

Objetivo 2c: Apoptosis celular

La administración de la dosis desafío de ketamina indujo un aumento de los cuerpos apoptóticos de manera independiente del tratamiento previo recibido en **estriado dorsal** (vehículo *Desafío* $P = 0,0052$. Candesartán *Desafío* $P = 0,0040$) y **corteza prefrontal Pre-Límbica** (vehículo *Desafío* $P = 0,0094$. Candesartán *Desafío* $P = 0,0025$).

Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en **corteza prefrontal Infra-Límbica** o en el **área tegmental ventral**.

Tabla 5: Resumen de valores estadísticos

<u>Apoptosis celular</u>	Área tegmental ventral				Estriado dorsal			
	Vehículo		Candesartán		Vehículo		Candesartán	
	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F(1, 23)= 0.03358	p= 0.8562	F(1, 19)= 0.3667	p= 0.5520	F(1, 30)= 0.4982	p= 0.4857	F(1, 27)= 1.46	p= 0.2371
<i>Tratamiento</i>	F(1, 23)= 0.3856	p= 0.5407	F(1, 19)= 0.2995	p= 0.5906	F(1, 30)= 0.3944	p= 0.5347	F(1, 27)= 0.7319	p= 0.3998
<i>Desafío</i>	F(1, 23)= 0.00525	p= 0.9429	F(1, 19)= 1.484	p= 0.2380	F(1, 30)= 9.089	*p= 0.0052	F(1, 27)= 9.881	*p= 0.004
	Infra-Límbica				Pre-Límbica			
	Vehículo		Candesartán		Vehículo		Candesartán	
	F	P	F	P	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F(1, 26)= 1.231	p= 0.2773	F(1, 22)= 0.2320	p= 0.6348	F(1, 27)= 0.1703	p= 0.6831	F(1, 26)= 0.0661	p= 0.7991
<i>Tratamiento</i>	F(1, 26)= 0.2614	p= 0.6135	F(1, 22)= 0.0095	p= 0.9234	F(1, 27)= 0.0629	p= 0.8039	F(1, 26)= 0.0331	p= 0.8571
<i>Desafío</i>	F(1, 26)= 0.6234	p= 0.4369	F(1, 22)= 1.787	p= 0.1949	F(1, 27)= 7.831	*p= 0.0094	F(1, 26)= 11.21	*p= 0.0025

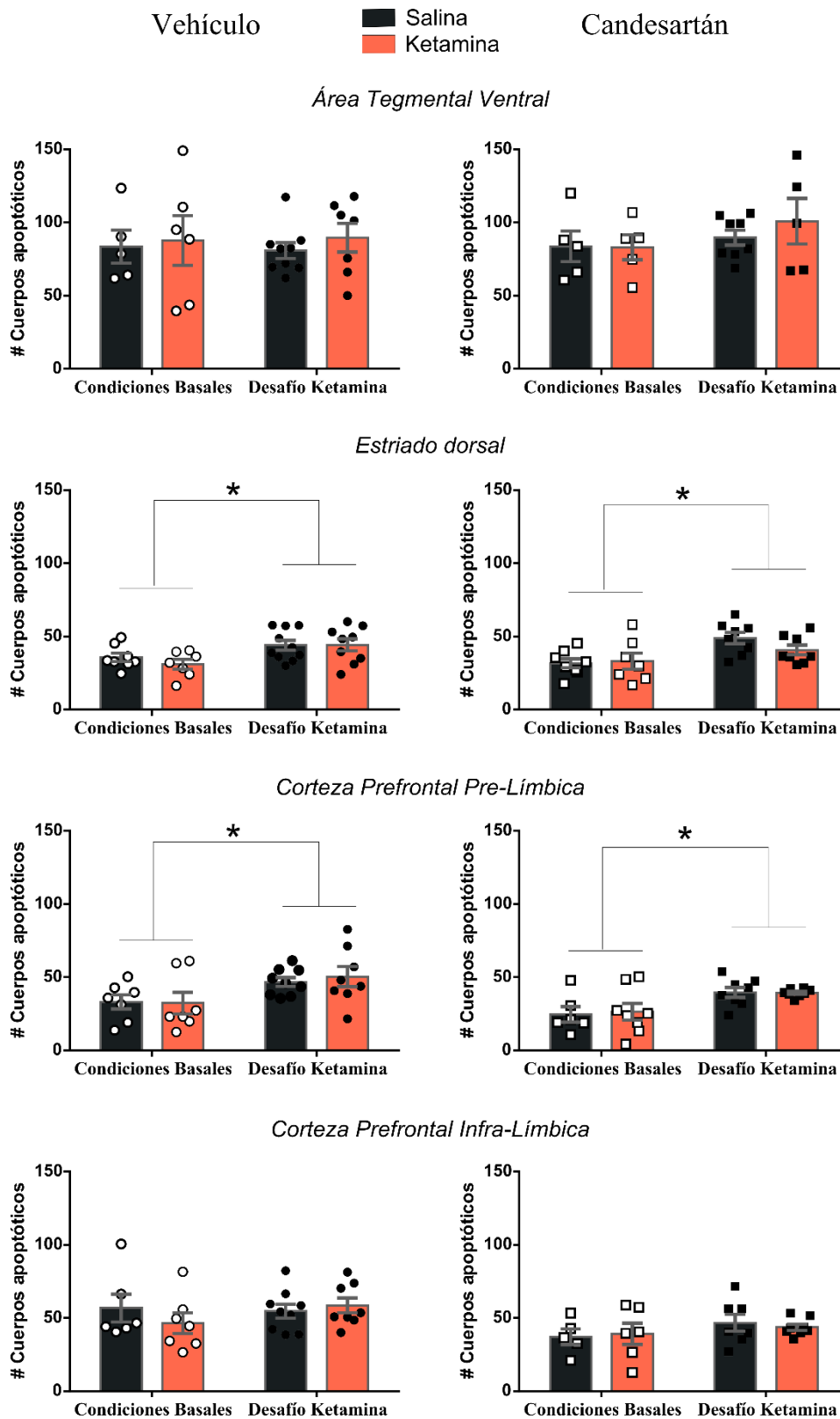


Figura 24: La dosis desafío de ketamina produjo un aumento significativo en el número de cuerpos apoptóticos en corteza prefrontal Pre-Límbica y estriado dorsal, de manera independiente a la administración previa de ketamina o del bloqueo de los receptores AT₁. *p<0,05

Análisis suplementario: Estrés Oxidativo

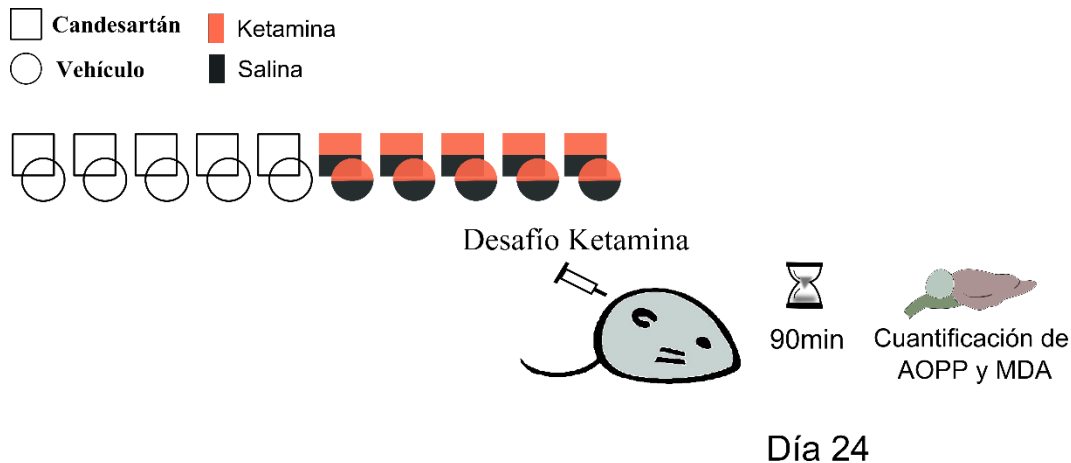


Figura 25: Esquema del protocolo para el análisis de estrés oxidativo. Los animales fueron sacrificados 90min luego de la administración de la dosis desafío de Ketamina. Se cuantificó la concentración de AOPP (Productos de la Oxidación Avanzada De Proteínas) y MDA (Malondialdehido) como marcadores de estrés oxidativo.

La administración repetida de ketamina indujo una respuesta exacerbada de estrés oxidativo frente a la dosis desafío en todas las áreas analizadas, el cual fue prevenido por el bloqueo de los receptores AT₁.

Corteza prefrontal, el análisis de Kruskal-Wallis para concentración de AOPP indica * $p= 0,0019$. La prueba de Dunn indica que el vehículo-ketamina presenta una concentración de AOPP significativamente mayor al vehículo-salina ($p= 0,0561$), mientras que no es significativamente diferente al grupo Candesartán-ketamina ($p= 0,6747$) el cual no es diferente de su grupo control ($p= 0,6162$).

Con respecto a la concentración de MDA el análisis de Kruskal-Wallis indica * $p= 0,0019$. La prueba de Dunn indica que el vehículo-ketamina presenta una concentración de MDA significativamente mayor al vehículo-salina ($p= 0,0561$), mientras que no es significativamente diferente al grupo Candesartán-ketamina ($p= 0,6747$) el cual no es diferente de su grupo control ($p= 0,6162$).

Estriado, el análisis de Kruskal-Wallis para concentración de AOPP indica * $p= 0,0014$. La prueba de Dunn indica que el vehículo-ketamina presenta una concentración de AOPP significativamente mayor al vehículo-salina ($p= 0,0340$), mientras que no es significativamente diferente al grupo candesartán-ketamina ($p= 0,6747$) el cual no es diferente de su grupo control ($p= 0,8332$).

Con respecto a la concentración de MDA el análisis de Kruskal-Wallis indica $*p= 0,0010$ sin embargo la prueba de Dunn indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales.

Área tegmental ventral, el análisis de Kruskal-Wallis para concentración de AOPP indica $*p= 0,0081$ La prueba de Dunn indica que el vehículo-ketamina presenta una concentración de AOPP significativamente mayor al vehículo-salina ($p= 0,0200$), mientras que no es significativamente diferente al grupo candesartán-ketamina ($p= 0,2388$) el cual no es diferente de su grupo control ($p >0,9999$).

Con respecto a la concentración de MDA el análisis de Kruskal-Wallis indica $*p= 0,0148$. La prueba de Dunn indica que el vehículo-ketamina presenta una concentración de MDA significativamente mayor al vehículo-salina ($p= 0,0374$), mientras que no es significativamente diferente al grupo candesartán-ketamina ($p= 0,3551$).

Objetivo 3: *La administración repetida de ketamina, ¿modifica la arquitectura de la red vascular? ¿Participa el receptor AT₁?*

Se han observado repetidamente alteraciones del flujo sanguíneo cerebral en personas con esquizofrenia mediante el uso de técnicas como la resonancia magnética funcional, particularmente en la corteza prefrontal por lo que se ha propuesto que una disfuncionalidad de esta área podría tener un rol clave en el desarrollo de los signos conductuales típicos de la esquizofrenia (Fitzsimmons et al., 2013; Zhou et al., 2015) En el mismo sentido, existe evidencia de que la demencia vascular puede provocar psicosis, a menudo con un curso fluctuante tal como se ve en la esquizofrenia; que en conjunto con las alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral de pacientes esquizofrénicos, ha dado sustento a la teoría inflamatoria-vascular de la esquizofrenia, la cual reúne factores genéticos, perinatales y ambientales (Hanson & Gottesman, 2005). En coherencia con estos antecedentes, nuestro grupo de trabajo ha reportado alteraciones en la arquitectura de la red vascular en la corteza prefrontal en un modelo de esquizofrenia inducido por la administración de anfetamina (Marchese et al., 2020; Basmadjian et al., en prensa).

Teniendo en cuenta estas evidencias es que nos propusimos:

- Analizar la arquitectura de la red vascular en la corteza prefrontal, luego de la administración repetida de ketamina.
- Evaluar la participación del receptor AT₁ en el efecto de ketamina sobre la arquitectura vascular.

Se llevó a cabo una inmunomarcación contra el factor de von Willebrand que permite evidenciar las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Los resultados son expresados en media \pm error estándar y se reporta solo el P estadísticamente significativo. Para más información, ver tabla 6 de resumen de valores estadísticos.

Modelo de administración repetida



□ Candesartán ■ Ketamina
○ Vehículo ■ Salina

Inmunohistoquímica
para factor de von Willebrand
25

Figura 27: Esquema del protocolo para el análisis de arquitectura vascular. Con el programa ImageJ se analiza el área total cubierta por vasos sanguíneos, el diámetro promedio, el número de ramificaciones y la tortuosidad de los mismos.

Resultados

No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros analizados en ninguna de las áreas de la *corteza prefrontal*.

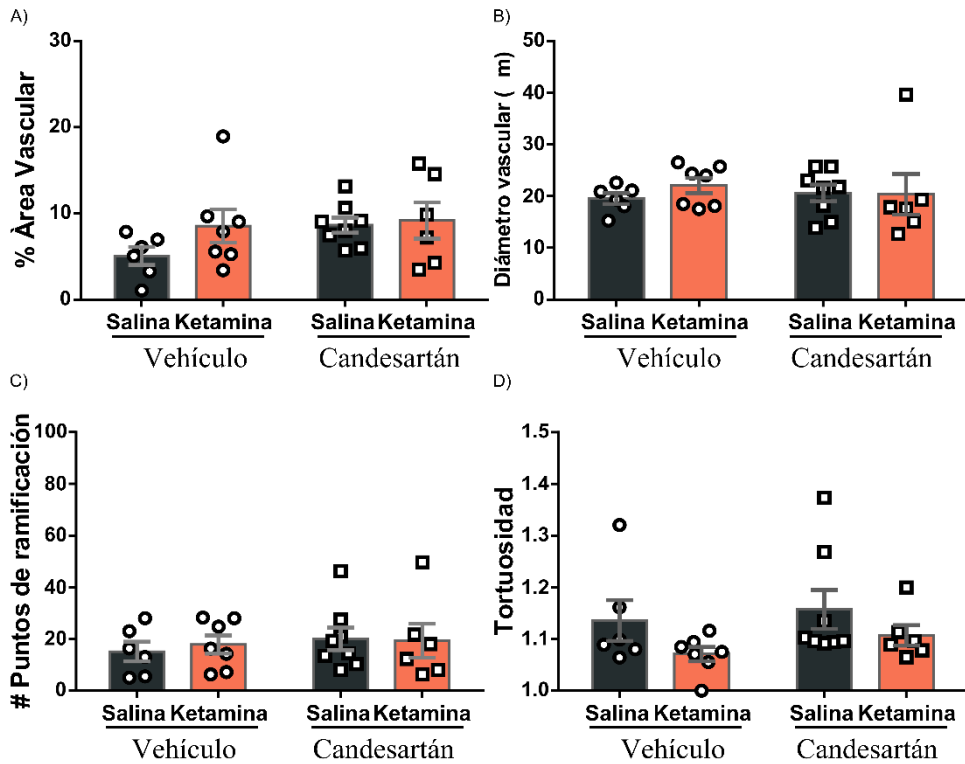
Tabla 6: Resumen de valores estadísticos

Arquitectura de la red vascular

Área	Infra-Límbica		Pre-Límbica	
	F	P	F	P
Interacción				
Pre-tratamiento	$F_{(1, 23)} = 0.9074$	$p = 0.3507$	$F_{(1, 18)} = 1.647$	$p = 0.2156$
Tratamiento	$F_{(1, 23)} = 1.882$	$p = 0.1833$	$F_{(1, 18)} = 0.1005$	$p = 0.7549$
Diámetro				
Pre-tratamiento	$F_{(1, 23)} = 1.719$	$p = 0.2027$	$F_{(1, 18)} = 0.05743$	$p = 0.8133$
Tratamiento	$F_{(1, 23)} = 0.4068$	$p = 0.5299$	$F_{(1, 18)} = 0.03593$	$p = 0.8518$
Pre-tratamiento	$F_{(1, 23)} = 0.02392$	$p = 0.8784$	$F_{(1, 18)} = 4.210$	$p = 0.0550$
Tratamiento	$F_{(1, 23)} = 0.2685$	$p = 0.6093$	$F_{(1, 18)} = 2.805$	$p = 0.1112$
Puntos de ramificación				
Pre-tratamiento	$F_{(1, 23)} = 0.1378$	$p = 0.7139$	$F_{(1, 18)} = 0.9144$	$p = 0.3516$
Tratamiento	$F_{(1, 23)} = 0.4680$	$p = 0.5007$	$F_{(1, 18)} = 0.4157$	$p = 0.5272$
Pre-tratamiento	$F_{(1, 23)} = 0.04640$	$p = 0.8314$	$F_{(1, 18)} = 0.09937$	$p = 0.7562$
Tortuosidad				
Pre-tratamiento	$F_{(1, 23)} = 0.05739$	$p = 0.8128$	$F_{(1, 18)} = 0.2805$	$p = 0.6029$
Tratamiento	$F_{(1, 23)} = 0.8730$	$p = 0.3598$	$F_{(1, 18)} = 1.495$	$p = 0.2371$
Pre-tratamiento	$F_{(1, 23)} = 3.498$	$p = 0.0742$	$F_{(1, 18)} = 3.949$	$p = 0.0623$



Corteza Prefrontal Infra-límbica



Corteza Prefrontal Pre-límbica

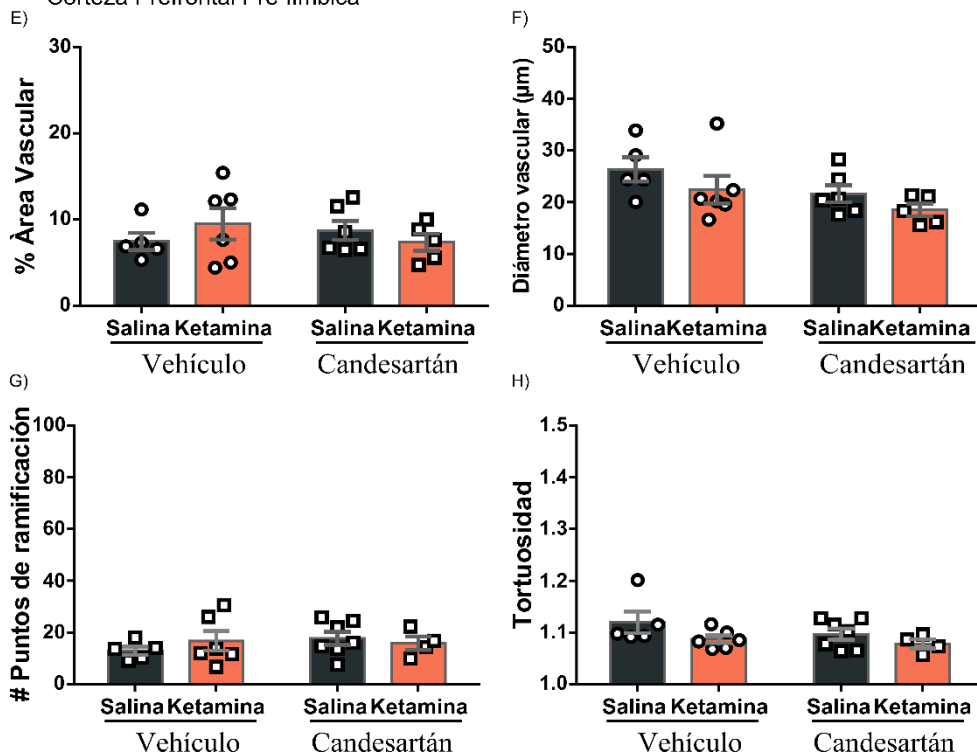


Figura 28: No se observaron diferencias significativas en A,E) área ocupada por las vasculatura, B,F) diámetro promedio de los vasos, C,G) número total de puntos de ramificación o D,H) tortuosidad vascular, entre los grupos experimentales.

Objetivo 4: Nuestro protocolo de administración de ketamina, ¿recrea los signos conductuales típicos de la esquizofrenia? ¿Participa el receptor AT₁? ¿Qué ocurre en el caso de una administración aguda de ketamina?

Los signos conductuales de la esquizofrenia tienen su equivalente etológico que permite el estudio de la patología en modelos animales. Los signos positivos pueden observarse en los animales evaluando su actividad locomotora ya que las áreas que se activan en ambos casos son las mismas. Al tener comportamiento gregario, los roedores nos permiten evaluar la conducta social, siendo un marcador clave para validar modelos animales ya que es uno de los signos negativos más típicos de la patología. Finalmente, podemos evaluar la memoria de reconocimiento de objetos como equivalente de la memoria declarativa en humanos. Como hemos mencionado anteriormente, la administración aguda y repetida de ketamina es un modelo validado de esquizofrenia (Adell et al., 2012). Antecedentes previos del grupo de trabajo muestran la participación del receptor AT₁ en alteraciones conductuales a largo-plazo inducidas por la administración de anfetamina, no así en el efecto psicoestimulante agudo (Marchese et al., 2016, 2020; Paz et al., 2011, 2013)

Considerando estos antecedentes es que nos propusimos:

- a- Recrear equivalentes etológicos de los signos conductuales característicos de la esquizofrenia mediante el protocolo de administración repetida de ketamina y evaluar la participación del receptor AT₁ en alteraciones a largo plazo
- b- Evaluación de la participación de los receptores AT₁ en el efecto conductual inmediato luego de la administración aguda de ketamina.

Para evaluar las tres categorías conductuales típicas de la esquizofrenia se llevó a cabo una prueba de actividad locomotora, de interacción social y de reconocimiento de objeto novedoso. Los resultados son expresados en media \pm error estándar y se reporta solo el P estadísticamente significativo. Para más información, ver las tablas 7, 8, 9 y 10 de resumen de valores estadísticos.

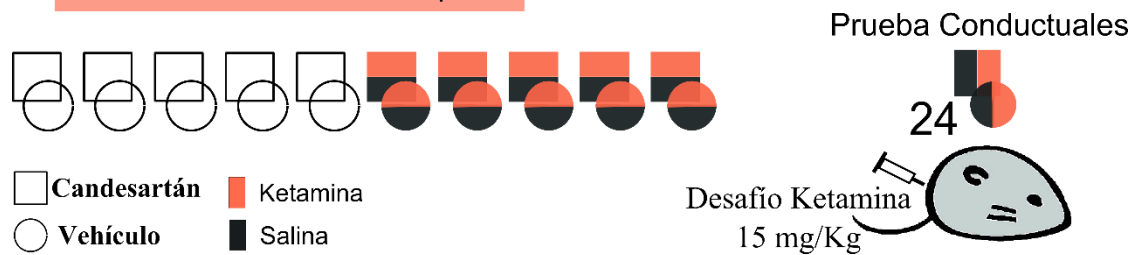
Objetivo 4a**Modelo de administración repetida**

Figura 29: Esquema del protocolo administración repetida de ketamina: las pruebas conductuales se llevaron a cabo el día 24, en condiciones basales o luego de una dosis desafío de ketamina (15 mg/Kg).

Signos positivos- Actividad locomotora en campo abierto

A pesar de no encontrar diferencias significativas en condiciones basales (desafío salina, Fig. 30A), la administración repetida de ketamina produjo una sensibilización conductual observada como una actividad locomotora exacerbada en respuesta a un desafío de ketamina (15mgkg) en los animales previamente tratado con ketamina. El bloqueo de los receptores AT₁ previno el desarrollo de la sensibilización a ketamina, no observándose cambios en el total recorrido entre ambos grupos tratados previamente con el antagonista AT₁ (ANOVA *Interacción* P = 0,0117; Fig. 30B). El análisis Bonferroni indica diferencias significativas entre los grupos vehículo-salina y vehículo-ketamina (p < 0,0001). Ver tabla 7.

Cuando analizamos la distancia recorrida cada 10 min, el análisis estadístico se llevó a cabo en forma conjunta si bien los gráficos de la distancia en el tiempo muestran los grupos vehículo y candesartán por separado. Nuevamente podemos evidenciar que la administración repetida de ketamina genera una sensibilización locomotora en respuesta a la dosis desafío que no se observa con la administración previa del antagonista del receptor AT₁ (Fig. 30C-D). El análisis a posteriori indica que el grupo vehículo-ketamina muestra una mayor actividad locomotora, significativamente diferente del grupo vehículo-salina y candesartán-ketamina (ver tabla). Este último presenta un incremento momentáneo en la actividad locomotora, diferente significativamente del grupo vehículo-salina, pero no del candesartán-salina, que luego desaparece y se comporta como un control. Ver tabla 7.

Modelo de administración repetida

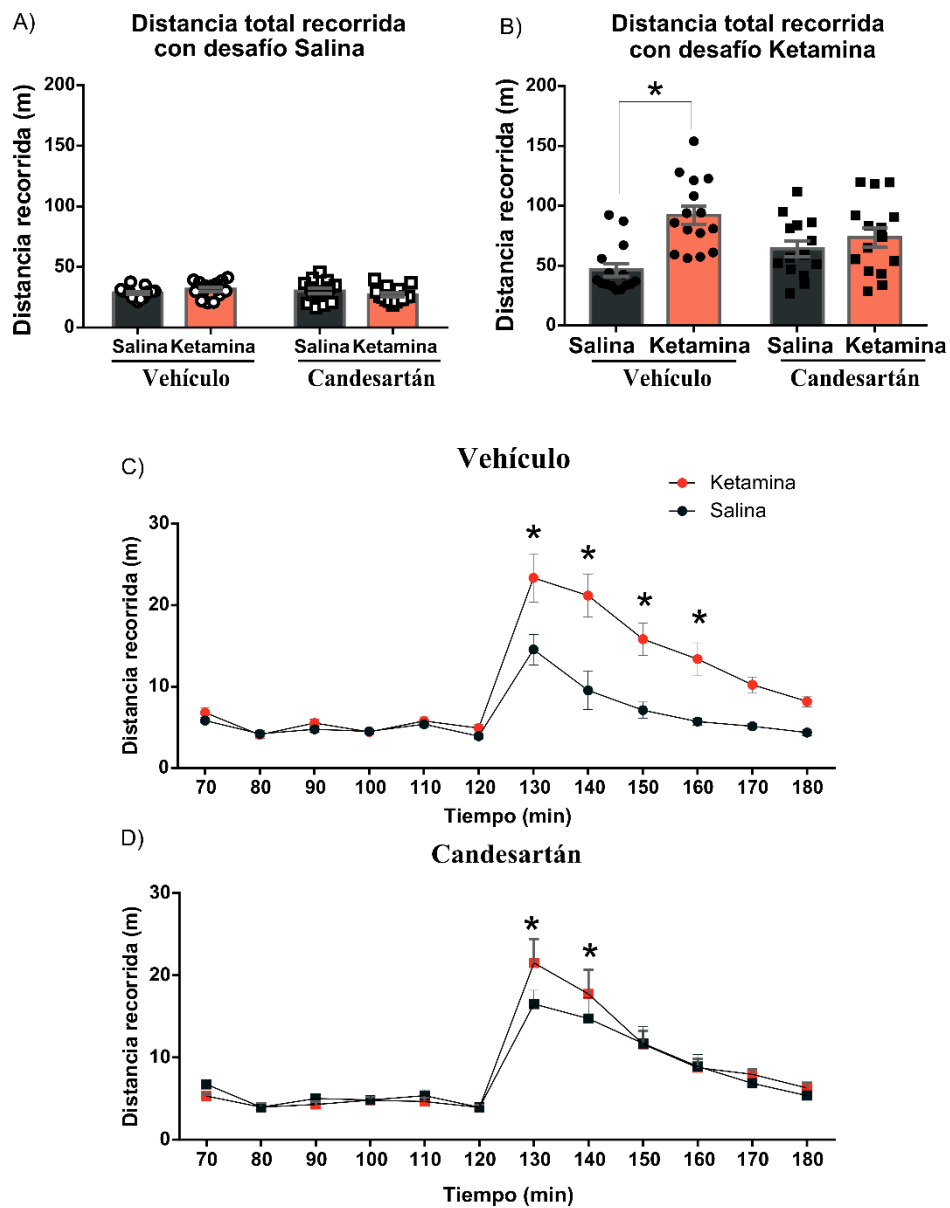


Figura 30: A, B) La administración repetida de ketamina produjo una sensibilización conductual observada como un incremento de la actividad locomotora en respuesta a la dosis desafío de ketamina, que no se observa en condiciones basales (desafío salina). El desarrollo de esta sensibilización motora fue prevenido por el bloqueo de los receptores AT₁. C, D) Actividad locomotora a lo largo del tiempo. *p<0.05 con respecto al grupo control.

Tabla 7: Resumen de valores estadísticos

<u>Distancia recorrida total</u>	Actividad locomotora			
	Desafío salina		Desafío ketamina	
	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F (1, 55) = 2,806	p = 0,0996	F (1, 55) = 6,797	*p = 0,0117
<i>Tratamiento</i>	F (1, 55) = 0,001134	p = 0,9733	F (1, 55) = 15,81	*p = 0,0002
<i>Pre-tratamiento</i>	F (1, 55) = 0,9702	p = 0,3289	F (1, 55) = 0,001493	p = 0,9693

Bonferroni pos-hoc p

Veh-Ket vs	Veh-Sal	< 0.0001
	Cand-Ket	< 0.0001

<u>Distancia vs Tiempo</u>	F	P
<i>Interacción</i>	F (33, 605) = 2.583	P < 0.0001
<i>Tiempo</i>	F (11, 605) = 68.41	P < 0.0001
<i>Tratamiento</i>	F (3, 55) = 7.770	P = 0.0002
<i>Subjects</i>	F (55, 605) = 3.185	P < 0.0001

Bonferroni pos-hoc p

130	Veh-Sal vs Veh-Ket	<0,0001
	Cand-Ket	0,0042
140	Veh-Sal vs Veh-Ket	<0,0001
	Cand-Ket	0,0002
150	Veh-Sal vs Veh-Ket	<0,0001
160	Veh-Sal vs Veh-Ket	0,0008

Signos negativos- Prueba de interacción social

La administración repetida de ketamina redujo el tiempo de interacción social, lo cual fue revertido por la administración de la dosis desafío de ketamina (ANOVA **Interacción* P = 0,0047; Fig. 31A). La prueba de Bonferroni indica que, en condiciones basales, el grupo vehículo-ketamina presentó un menor tiempo de interacción social pasiva (p= 0,0059) que el grupo control, lo que es revertido por la administración de la dosis desafío (p= 0,0385). Es importante remarcar que estas alteraciones conductuales inducidas por la administración de ketamina dependen de la participación del receptor AT₁ ya que no se observaron cambios en el porcentaje del tiempo de interacción social en los animales previamente tratados con el antagonista AT₁ (Fig. 31B). Ver tabla 8.

Cuando se analizó la actividad locomotora se encontró que el grupo vehículo-ketamina y candesartán-ketamina presentaron un incremento de la distancia recorrida luego de la dosis desafío de ketamina (Fig. 31 C y D). Este resultado era esperable en base a lo expuesto en el punto anterior. Cabe destacar que el incremento de la actividad locomotora no impidió que se reestablezcan los porcentajes de interacción social en el grupo vehículo ni modificó el tiempo de interacción en el grupo candesartán, sustentando la idea que el incremento de la actividad locomotora no afecta a la interacción entre los individuos si no hay una motivación para ello. Ver tabla 8.

Modelo de administración repetida

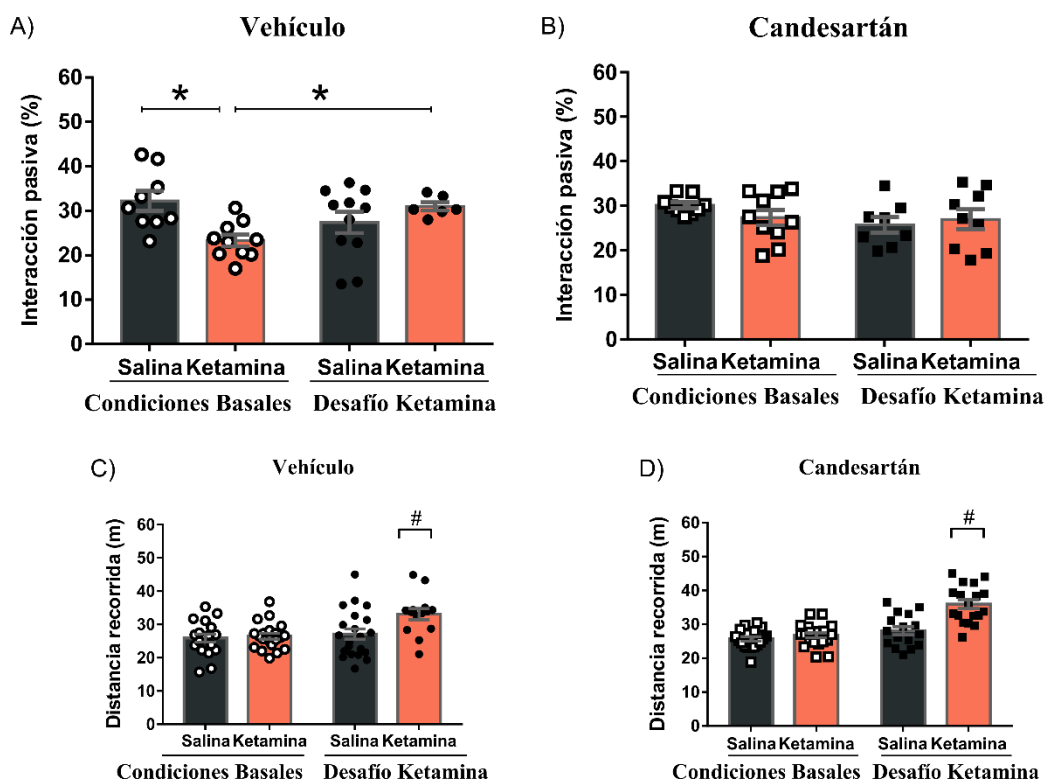


Figura 31: A) La administración repetida de ketamina redujo el tiempo de interacción social, visible incluso 14 días después de su última administración, la cual fue revertida por la dosis desafío. B) El antagonismo de los receptores AT_1 previno el desarrollo de alteraciones a largo plazo en la conducta social generados por la administración repetida de ketamina. C-D) La administración de ketamina produjo un incremento de la actividad locomotora, sin embargo, ésta no interfiere con la conducta social.

Tabla 8: Resumen de valores estadísticos

Porcentaje de interacción social pasiva	Prueba de interacción social			
	vehículo		Candesartán	
	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F (1, 32) = 9.236	*P = 0.0047	F (1, 32) = 1.437	P = 0.2395
<i>Tratamiento</i>	F (1, 32) = 1.637	P = 0.2100	F (1, 32) = 0.1919	P = 0.6643
<i>Desafío</i>	F (1, 32) = 0.4609	P = 0.5021	F (1, 32) = 1.973	P = 0.1697
Bonferroni pos-hoc p				
	Veh-Ket (DK) vs Veh-Sal (CB)	0.0059		
			Veh-Ket (CB)	0.0385
Actividad motora	vehículo		Candesartán	
	F	P	F	P
	<i>Interacción</i>	F (1, 68) = 4.088	*P = 0.0471	F (1, 68) = 11.58
<i>Tratamiento</i>	F (1, 68) = 5.822	*P = 0.0185	F (1, 68) = 20.00	*P < 0.0001
<i>Desafío</i>	F (1, 68) = 8.149	*P = 0.005	F (1, 68) = 33.90	*P < 0.0001
Bonferroni pos-hoc p				
	Veh-Ket (DK) vs Veh-Sal (CB)	0.0064	Veh-Ket (DK) vs Veh-Sal (CB)	<0,0001
			Veh-Ket (CB)	<0,0001
Desafío ketamina= DK			Veh-Sal (DK)	<0,0001
Condiciones basales= CB				

Déficit cognitivo- Prueba de reconocimiento de objeto novedoso

La administración repetida de ketamina no produjo alteraciones cognitivas en condiciones basales, pero cuando el sistema es forzado con una re-exposición al psicotrópico, se hace evidente una disminución en la capacidad de reconocer el objeto familiar en los animales tratados con ketamina (ANOVA *Interacción* P = 0,0476; Fig. 32A). El análisis de Bonferroni muestra que el grupo vehículo-ketamina presenta menor índice de reconocimiento del objeto familiar, luego de la administración del desafío, en comparación con los demás grupos experimentales. Es importante destacar, que estas alteraciones conductuales son dependientes de la participación del receptor AT₁ ya que las mismas no se observaron en los grupos tratados previamente con Candesartán (Fig. 32B). Ver tabla 9.

El índice de preferencia durante la familiarización también fue analizado como parámetro control, no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales (Fig. 32 C y D). Ver tabla 9.

Modelo de administración repetida

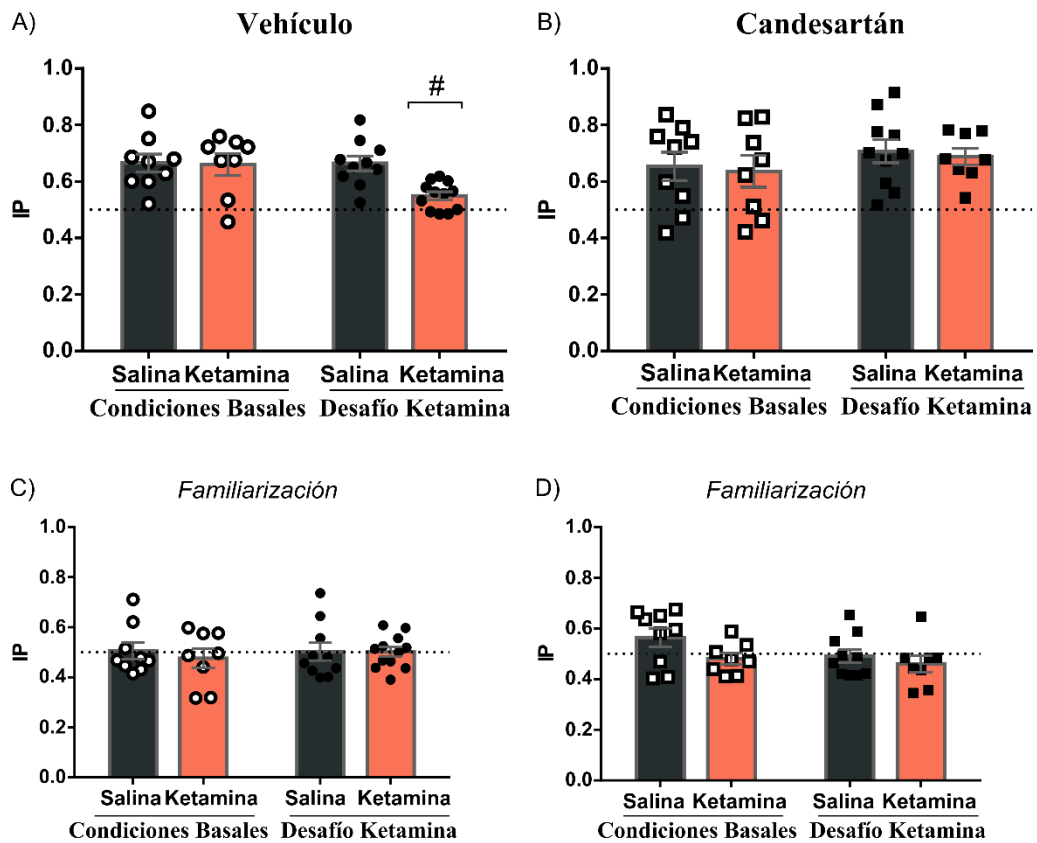


Figura 32: A) La administración repetida de ketamina generó alteraciones subyacentes que pudieron ser evidenciadas luego de la administración de la dosis desafío. B) Los receptores AT_1 tienen un rol crítico en el desarrollo de las alteraciones a largo plazo en los procesos de memoria inducidos por la administración repetida de ketamina. C-D) No se evidencian diferencias significativas en el IP durante la familiarización. * $\# < p < 0.05$. # Diferente de todos los grupos experimentales.

Tabla 9: Resumen de valores estadísticos

Prueba de reconocimiento de objeto novedoso				
	vehículo		Candesartán	
	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F (1, 35) = 4,213	*P = 0,0476	F (1, 31) = 5,83e-005	P = 0,9940
<i>Tratamiento</i>	F (1, 35) = 4,932	P = 0,329	F (1, 31) = 0,1684	P = 0,6844
<i>Desafío</i>	F (1, 35) = 4,354	P = 0,0443	F (1, 31) = 1,357	P = 0,253
Bonferroni pos-hoc				
		p		
	Veh-Ket (DK) vs Veh-Sal (CB)	0,0193		
Desafío ketamina= DK	Veh-Ket (CB)	0,035		
Condiciones basales= CB	Veh-Sal (DK)	0,0161		
<u>Familiarización</u>				
	vehículo		Candesartán	
	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F (1, 35) = 0,2042	P = 0,6542	F (1, 31) = 0,7748	P = 0,3855
<i>Tratamiento</i>	F (1, 35) = 0,2408	P = 0,6267	F (1, 31) = 3,674	P = 0,0645
<i>Desafío</i>	F (1, 35) = 0,1217	P = 0,7293	F (1, 31) = 2,440	P = 0,1284

Objetivo 4b: ¿participa el receptor AT_1 de las alteraciones conductuales en un modelo de administración aguda de ketamina?

Modelo de administración aguda

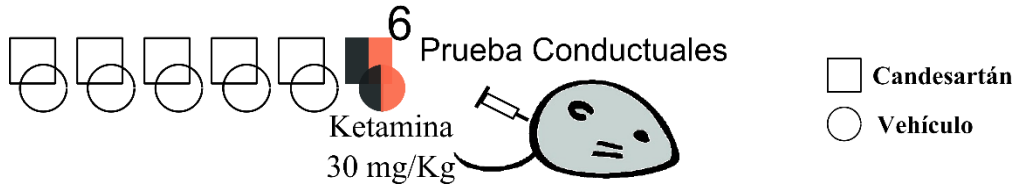


Figura 33: Esquema del protocolo de administración agudo. Las pruebas conductuales se llevaron a cabo el día 6, luego de una única administración de ketamina (30 mg/Kg).

Signos positivos- Actividad locomotora en campo abierto

La administración aguda de ketamina produjo un aumento de la actividad locomotora, independientemente del receptor AT_1 . Cuando analizamos la distancia recorrida cada 10 min, abarcando los periodos del desafío salina y ketamina, el ANOVA de dos vías con medidas repetidas hace evidente el incremento de la locomoción en respuesta al desafío con ketamina sin mostrar diferencias entre los grupos (Fig. 34A). El análisis estadístico (t-Test) evidenció que no existen diferencias entre los animales tratados con vehículo o antagonista AT_1 en la distancia total recorrida en respuesta al desafío con ketamina ($p=0,3572$, Fig. 34B). Ver tabla 10.

Modelo de administración aguda

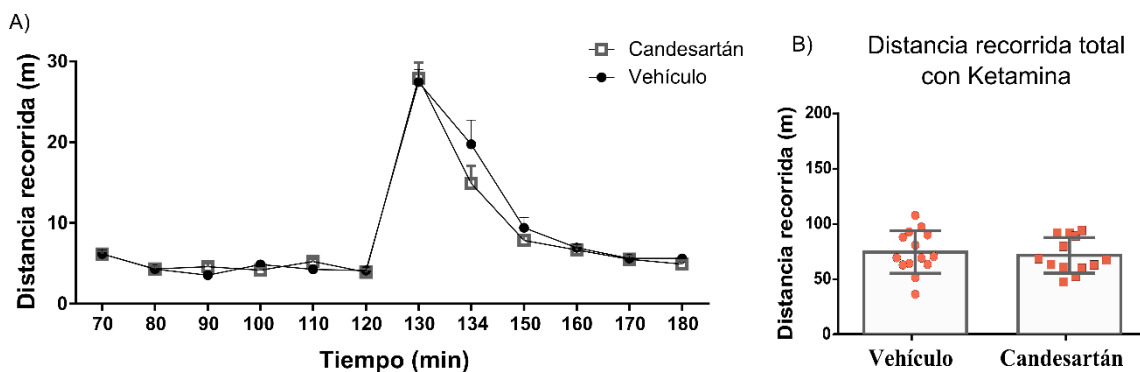


Figura 34: A-B) La administración de ketamina reprodujo los signos positivos de esquizofrenia, observados como un incremento en la actividad locomotora. La administración del antagonista del receptor AT_1 no tuvo impacto en el efecto psicomimético agudo de la ketamina.

Signos negativos-Prueba de interacción social

La administración aguda de ketamina redujo el tiempo de interacción pasiva, que no se observó en el grupo que previamente fue tratado con el antagonista AT₁ (ANOVA *Interacción* P = 0,0363; Fig. 35A). La prueba a posteriori indica que el grupo vehículo-ketamina muestra una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de interacción social cuando se compara con el vehículo-salina (p= 0,0186), sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con los grupos tratados con el antagonista AT₁, así como tampoco entre ellos.

La prueba conductual fue realizada 45min después de la administración de ketamina, de modo de evitar los efectos estimulantes motores de ketamina y, a modo de control, se analizó la actividad locomotora individual donde no se evidenciaron diferencias entre los grupos experimentales (Fig. 35B). Ver tabla 10

Modelo de administración aguda

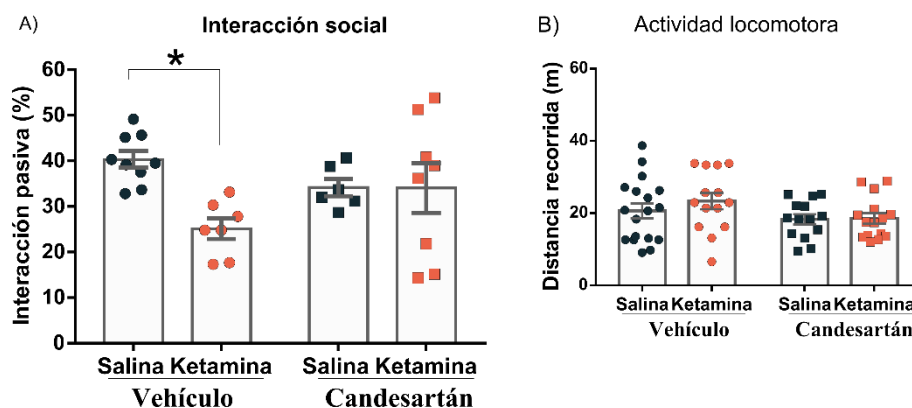


Figura 35: A) La administración aguda de ketamina redujo el tiempo de interacción social, mientras que cuando se administra con el antagonista AT₁, no muestra diferencia significativa con su control. B) No hay diferencias significativas en la actividad entre los grupos experimentales.

Déficit cognitivo- Prueba de reconocimiento de objeto novedoso

La administración aguda de ketamina generó un déficit cognitivo, independientemente del bloqueo de los receptores AT₁, impidiendo la adquisición de la memoria al ser administrado antes de la familiarización (ANOVA *Tratamiento* P < 0,0001; Fig. 36A). Como mencionamos anteriormente, a modo de control se analiza que

no exista preferencia entre los objetos durante la familiarización, donde no se encontraron diferencias significativas entre todos los grupos experimentales (Fig. 36B). Ver tabla 10

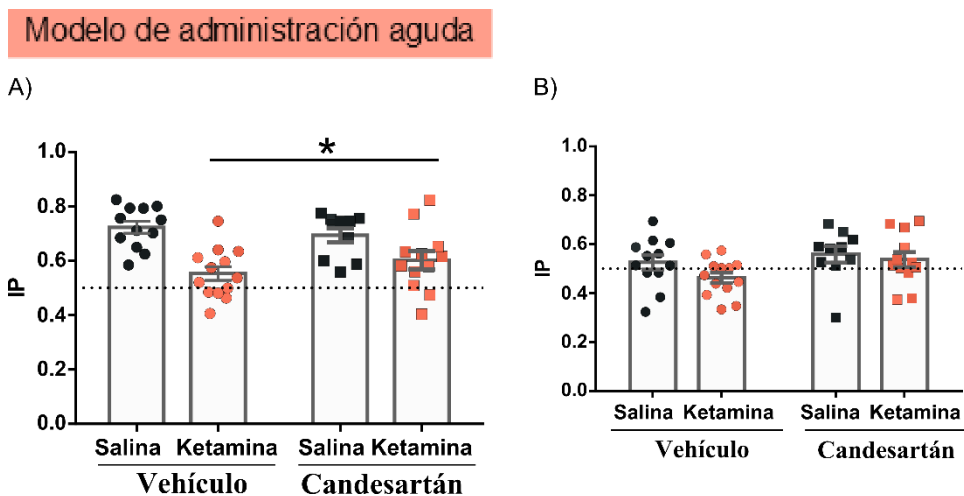


Figura 36: A) La administración aguda de ketamina produjo un déficit en la adquisición de la memoria, independientemente del receptor AT₁. B) No se evidencian diferencias significativas en el IP durante la familiarización.

Tabla 10: Resumen de valores estadísticos

<u>Actividad locomotora</u>	<u>Distancia recorrida vs tiempo</u>	
	F	P
<i>Interacción</i>	F (11, 297) = 1,227	p = 0,2683
<i>Tiempo</i>	F (11, 297) = 105,0	*p < 0,0001
<i>Tratamiento</i>	F (1, 27) = 0,8558	p = 0,3631
<i>Subjects</i>	F (27, 297) = 1,699	p = 0,0187

<u>Interacción social</u>	<u>% tiempo de interacción social</u>		<u>Actividad motora</u>	
	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F (1, 26) = 4,876	*p = 0,0363	F (1, 57) = 0,4226	p = 0,5182
<i>Tratamiento</i>	F (1, 26) = 5,016	*p = 0,0339	F (1, 57) = 0,6071	p = 0,4391
<i>Pre-tratamiento</i>	F (1, 26) = 0,1625	p = 0,6902	F (1, 57) = 3,611	p = 0,0625

<u>Reconocimiento de objetos</u>	<u>Indice de preferencia</u>		<u>IP Familiarización</u>	
	F	P	F	P
<i>Interacción</i>	F (1, 43) = 2,060	p = 0,1585	F (1, 43) = 0,5577	p = 0,4592
<i>Tratamiento</i>	F (1, 43) = 22,82	*p < 0,0001	F (1, 43) = 2,201	p = 0,1452
<i>Pre-tratamiento</i>	F (1, 43) = 0,1265	p = 0,7239	F (1, 43) = 3,576	p = 0,0654

Discusión



Alteración del patrón de activación neuronal: foco en la función parvalbuminérgica y el rol del receptor AT₁

Estriado dorsal

A modo de recordatorio, a nivel del estriado dorsal, observamos una hiperactivación neuronal, la cual no fue acompañada de una activación GABAérgica proporcionada, incluyendo la subpoblación parvalbuminérgica. El estriado dorsal tiene un papel central en la toma de decisiones, especialmente en la selección e iniciación de acciones en base a la convergencia de información sensoriomotora, cognitiva y motivacional (Do et al., 2013). Recibe inervación glutamatérgica desde corteza prefrontal y dopamina desde sustancia nigra. Por otro lado, desde esta área parten neuronas GABAérgicas que inervan la sustancia nigra y otras áreas subcorticales (neuronas espinosas medianas-NEMs). Cuando las vías glutamatérgicas corticales estimulan al estriado, las vías GABAérgicas son inhibidas permitiendo la selección de la acción y el movimiento (Do et al., 2013). Se ha descrito que el desbalance excitatorio/inhibitorio tendría un rol preponderante en el desarrollo de los signos característicos de la esquizofrenia, así como en diversas patologías asociadas a disfunción en el movimiento (como las enfermedades de Huntington y Parkinson o el desorden de déficit de atención con hiperactividad). Además de las NEMs- que representan alrededor del 95% de las neuronas GABAérgicas estriatales- encontramos las neuronas “vecinas” que presentan una fuerte inhibición sobre las NEMs y entre las que encontramos a las interneuronas positivas para parvalbúmina. Estas interneuronas son las primeras en responder al estímulo glutamatérgico de la corteza inhibiendo las NEMs para comenzar el movimiento y son las encargadas de mediar la comunicación a través de las ondas gamma entre corteza y estriado. En este sentido, se ha mostrado que alteraciones en la inervación glutamatérgica cortical, tras la administración de ketamina o MK801, conlleva a alteraciones en las ondas gamma en diversas áreas cerebrales, incluyendo al estriado dorsal (Do et al., 2013; Hakami et al., 2009). La sincronización de la actividad neuronal es crítica para el procesamiento de la información en diferentes niveles de los sistemas sensoriales y motores, y cambios en la actividad oscilatoria han sido relacionados con la fisiopatología de las enfermedades neurológicas y psiquiátricas (Nicolás et al., 2011). Por otro lado, se ha mostrado que dopamina incrementa la actividad de las interneuronas parvalbúmina, potenciando su actividad inhibitoria sobre las NEMs y, por lo tanto, incrementando la locomoción. En este sentido, se observó un aumento en los disparos de interneuronas parvalbúmina

positivas en respuesta a la administración de anfetamina en estrecha relación con el incremento en la actividad locomotora (Wiltschko et al., 2010). Teniendo en cuenta esta información y las evidencias encontradas en esta tesis, podemos proponer que la administración repetida de ketamina produjo un cambio neuroadaptativo a largo plazo observado como una hiperactivación estriatal frente a la dosis desafío y consecuente inhibición de las vías GABAérgicas, subyaciendo la sensibilización motora (hiperlocomoción-discutido más adelante).

Es importante destacar el rol clave del receptor AT₁ en estos cambios neuroadaptativos a largo plazo generados por la administración repetida de ketamina. Una gran cantidad de evidencia mostró una estrecha interacción entre AngII y dopamina que involucra células neuronales y no neuronales. En este sentido, se ha demostrado la presencia de heterómeros funcionales conformados por receptores AT₁ y D₂ en cuerpo estriado (Martinez-Pinilla et al., 2015), así como una contra regulación donde AngII modula la liberación de dopamina estriatal a través de receptores AT₁ presinápticos (Brown et al., 1996). Por el lado contrario, la hiperactivación y el agotamiento dopaminérgico aumentan la actividad de AngII y la expresión de receptores AT₁ en la vía nigro-estriatal (Mertens et al., 2010; B Villar-Cheda et al., 2010; Begoña Villar-Cheda et al., 2012). Antecedentes de nuestro grupo de trabajo muestran que el antagonismo del receptor AT₁ mitigó el efecto facilitador de anfetamina sobre la liberación de dopamina en el cuerpo estriado (Paz et al., 2011), mientras que la administración de anfetamina genera alteraciones funcionales a largo plazo del receptor AT₁ (Casarsa et al., 2015). Considerando el rol preponderante de la dopamina como modulador de la actividad estriatal, la estrecha relación entre dopamina y el receptor AT₁ podría explicar el rol clave de este último en el desarrollo de cambios neuroadaptativos a largo plazo generados por la administración de ketamina.

Corteza prefrontal

Interesantemente, la administración repetida de ketamina produjo una neuroadaptación a largo plazo región-dependiente que se observa como una hiperactivación en Infra-Límbica y una disminución del porcentaje de activación GABAérgico, incluyendo la subpoblación parvalbuminérgica, en Pre-Límbica. Previamente, Lindfors y cols. (1997) mostraron que la administración diaria de ketamina genera una disminución en la actividad dopaminérgica e incremento de la serotoninérgica

a nivel de corteza prefrontal, mientras que los niveles de GABA se mantuvieron estables (siendo evaluado inmediatamente luego de la última administración de la droga). Teniendo en cuenta el rol clave de estas interneuronas en el modelo de esquizofrenia, resulta interesante que la administración de ketamina genere una alteración en la activación GABAérgica en Pre-Límbica, así como el incremento sostenido en el tiempo del número de interneuronas GABAérgicas en Infra-Límbica. Con respecto a esto último, este aumento perdurable en el número de interneuronas GABAérgica es, posiblemente, un proceso neuroadaptativo compensatorio a un desbalance en la actividad Infra-Límbica provocado por la administración repetida de ketamina, lo que permite una respuesta funcional al desafío con ketamina similar a los grupos controles. Previamente se ha descrito que la administración repetida de ketamina produce hipofrontalidad (Dawson et al., 2013), altera las interconexiones entre corteza prefrontal e hipocampo (Gass et al., 2014), tálamo y vías subcorticales ascendentes (Dawson et al., 2013), así como las oscilaciones gamma en la corteza prefrontal (McNally et al., 2013). Particularmente, se ha propuesto que la hipoactivación en el área prefrontal Pre-Límbica, generada por la administración repetida de ketamina, conlleva a un déficit en la memoria de trabajo, no así en la memoria a corto plazo (Enomoto & Floresco, 2009). En coherencia con estos antecedentes, no observamos déficit en la memoria declarativa en condiciones basales (discutido más adelante). Por otro lado, los cambios en la funcionalidad de Infra-Límbica han sido asociados a un trasfondo más motivacional y emocional, por lo que los cambios en el patrón de activación de esta área podrían estar estrechamente relacionados con las alteraciones en la conducta social. En este sentido, se ha propuesto que un incremento de la actividad glutamatérgica prefrontal podría ser la causa de los efectos antidepresivos de dosis mínimas de ketamina en pacientes con depresión mayor (Abdallah et al., 2018). Se ha señalado que una mejora de la neurotransmisión glutamatérgica y serotoninérgica en Infra-Límbica subyace a los efectos similares a los antidepresivos de la ketamina en ratas (Gasull-Camos et al., 2017). Resulta interesante que la hiperactivación Infra-Límbica en respuesta a la dosis desafío de ketamina puede explicar los efectos tipo antidepresivos, observados en la prueba de interacción social, donde el efecto anti-social de la administración repetida de ketamina es revertido por la dosis desafío (discutido más adelante). Además, existe una contra regulación entre estas áreas de la corteza prefrontal, donde el área Infra-Límbica ejerce un control inhibitorio sobre la Pre-Límbica (Ji & Neugebauer, 2012), que podría explicar la hiperactivación neuronal observada en la primera pero no en esta última, descrita en esta tesis.

Es importante destacar que el antagonismo del receptor AT₁ previno el desarrollo de estos cambios neuroadaptativos en Infra-Límbica, lo que condice con los resultados de la prueba de interacción social. Curiosamente, el receptor AT₁ parece tener un rol clave en la activación de las interneuronas parvalbúmina positivas, no así en la generalidad de las interneuronas GABAérgicas. Si bien la relación entre las interneuronas positivas para parvalbúmina y el receptor AT₁ aún no ha sido descrita, Oroszova *y cols.* (2017) reportó que interneuronas parvalbuminérgicas de la médula espinal expresan receptores AT₁ que juegan un rol neuroprotector en un modelo de dolor neuropático; de manera similar a los resultados obtenidos con inhibidores de la ECA en sustancia nigra en un modelo de neurodegeneración inducido por la administración de MPTP (Kurosaki *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha descrito previamente que AngII presenta un efecto modulador sobre la función GABAérgica en las respuestas al estrés (Saavedra *et al.*, 2006) y el control de la presión arterial (Légat *et al.*, 2019); sin embargo la disminución del porcentaje de activación GABAérgico en Pre-Límbica, así como el incremento perdurable del número de interneuronas GABAérgicas en Infra-Límbica, generados por la administración de ketamina fueron independientes del receptor AT₁.

En conclusión, la administración repetida de ketamina produjo un cambio neuroadaptativo a largo plazo que involucra al receptor AT₁ y se evidencia como un patrón de activación neuronal alterado en respuesta a la dosis desafío. Curiosamente, esta respuesta al antagonista NMDA, así como la participación del receptor AT₁, no es homogénea y presenta características regionales particulares sustentando las respuestas conductuales. Por otro lado, resulta interesante que los cambios funcionales inducidos por la administración repetida de ketamina no involucran cambios en el número de interneuronas parvalbuminérgicas, lo que concuerda con bibliografía donde el mismo protocolo de administración de ketamina no altera la expresión parvalbuminérgica en corteza frontal o hipocampo (Benneyworth *et al.*, 2011).

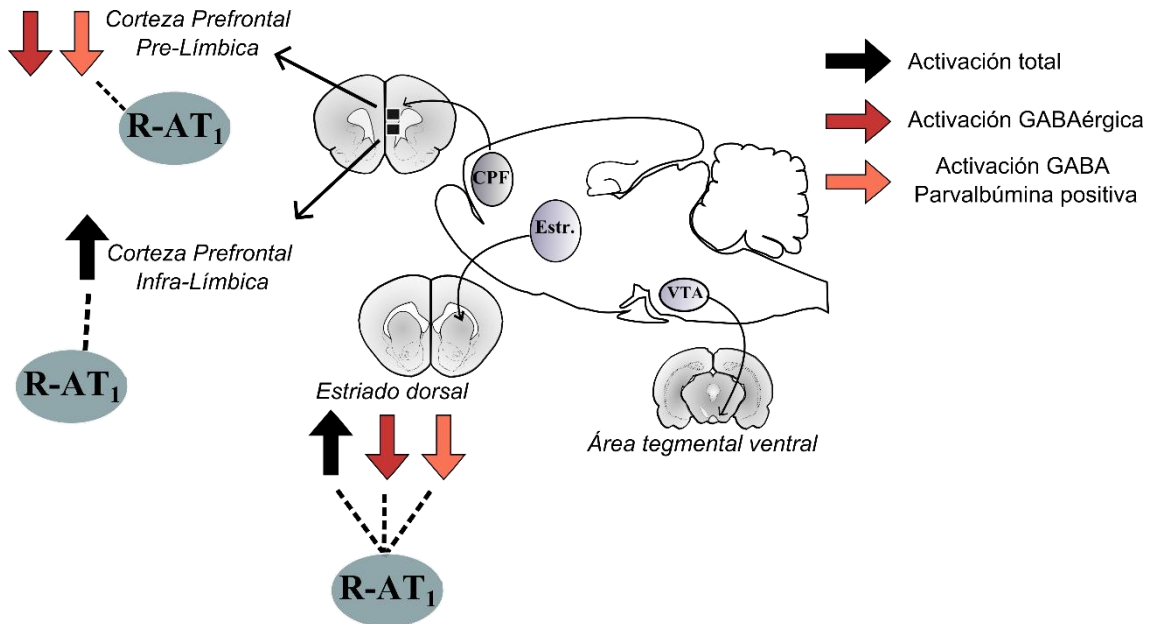


Figura 37: La administración repetida de Ketamina produjo cambios neuroadaptativos región-dependiente, donde el receptor AT_1 mostró tener una participación crítica y diferencial en su desarrollo. Las flechas indican el cambio en la activación neuronal generada por la administración repetida de Ketamina, y evidenciada por la dosis desafío de Ketamina. Los casos donde el patrón de activación no cambió no fueron incluidos en la figura. Cabe destacar, que la disminución del número de interneuronas GABAérgicas generado por la administración de Ketamina independientemente del receptor AT_1 , tampoco fue incluida en la figura para centrarnos en la respuesta funcional.

Efecto dual de ketamina y el rol de Angiotensina II

Efecto pro y antiinflamatorio de la ketamina en la unidad neurovascular

El aumento en la reactividad astrocitaria en corteza prefrontal y estriado dorsal, generado por la administración repetida de ketamina, coincide con estudios postmortem de pacientes con esquizofrenia que reportan una comorbilidad entre la presencia de astrogliosis y neuroinflamación (Catts et al., 2014), donde los signos de gliosis están distribuidos regionalmente y, por lo general, estrechamente relacionados con el historial y la gravedad de la enfermedad (Bernstein et al., 2015; Rajkowska et al., 2002). En este sentido, Arnold y cols. (1996) informaron de la presencia de gliosis solo en un subgrupo de pacientes que presentaban una alta prevalencia de deterioro cognitivo grave y discapacidad funcional. A diferencia de estos antecedentes clínicos, nuestros resultados muestran que el incremento en la reactividad astrocitaria generado por la administración repetida de ketamina no fue acompañado por su equivalente en las células de la microglía. La ausencia de microgliosis en condiciones basales coinciden con el trabajo de Hou y cols. (2013) donde demostraron que la administración repetida ketamina generaba lesiones neuronales y aumento del estrés oxidativo en la corteza prefrontal e hipocampo, en ausencia de microgliosis. Al igual que estos autores, observamos un incremento exacerbado de estrés oxidativo en respuesta a la reexposición a ketamina. La supervivencia celular resultó ser independiente de la historia previa con ketamina, así como del receptor AT₁, y presentó diferencias regionales ya que observamos apoptosis celular en estriado dorsal y corteza prefrontal Pre-Límbica después del desafío con ketamina. Estos resultados difieren de estudios previos de nuestro grupo que mostraron un aumento de la apoptosis celular, astrogliosis y microgliosis después de la administración repetida de anfetamina en la corteza cerebral, incluyendo las dos áreas de la corteza prefrontal y dos áreas de la corteza somatosensorial (Marchese et al., 2020; Occhieppo et al., 2017). Dado que la ketamina induce citotoxicidad a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Bai et al., 2013; Ye et al., 2018), el estrés oxidativo observado en el cuerpo estriado y la corteza prefrontal podría conducir a una mayor muerte celular en estas áreas. Sin embargo, dado que este aumento de la apoptosis celular no se ha observado en el área Infra-Límbica, se podría pensar que la adaptación glial inducida por ketamina en esta área ejerce un efecto protector celular que previene la apoptosis celular inducida por estrés oxidativo. Se ha descrito que los astrocitos, a través del fenotipo A2, tienen función neuroprotectora frente al estrés

oxidativo y citotoxicidad glutamatérgica (Mahmoud et al., 2019), aumentando la recaptación de glutamato y regulando al alza la expresión de genes neurotróficos que favorecen la supervivencia neuronal (Miller, 2018). Curiosamente, Ardalán y cols (2017) mostraron que los cambios morfológicos de los astrocitos, observados como un aumento de la ramificación 24 h después de una sola administración de ketamina, promueven la neurogénesis y angiogénesis del hipocampo y modifican el microambiente sináptico, que a su vez se ha asociado con efectos antidepresivos de la ketamina. Dado que hemos encontrado una astrogliosis reactiva moderada y que el fenotipo proinflamatorio A1 se observa como astrocitos hipertróficos (Miller, 2018), nuestros resultados sugieren que los astrocitos reactivos podrían estar desempeñando un papel similar al fenotipo A2. Curiosamente, en estriado dorsal y en el área Pre-Límbica no se observaron alteraciones morfológicas en condiciones basales, sustentando la teoría de que las glio-adaptaciones observadas en Infra-Límbica podrían tener un efecto neuroprotector frente al estrés oxidativo exacerbado. A partir de esta evidencia, pudimos corroborar que la administración repetida de ketamina no solo produjo cambios neuroadaptativos a nivel neuronal, modificando los patrones de activación como discutimos anteriormente; sino que también cambió la respuesta astrocitaria y de estrés oxidativo a futuros desafíos, en este caso evaluado como una reexposición al psicotrópico.

Por otro lado, se observó una disminución en la reactividad microglial con la administración de la dosis desafío de ketamina de manera independiente de la región analizada y el tratamiento previo recibido. Estos resultados están de acuerdo con la bibliografía que apoya la estrecha relación entre la actividad antiinflamatoria y los efectos antidepresivos de ketamina. Dado que la producción de citoquinas proinflamatorias y las alteraciones en la neurotransmisión glutamatérgica se consideran factores de riesgo asociados a la depresión, se ha propuesto que los efectos de los fármacos antidepresivos se deben en parte a su acción antiinflamatoria (Ho et al., 2019). En consecuencia, se ha demostrado que la fluoxetina induce la apoptosis microglial como mecanismo compensador para aliviar la liberación de glutamato y D-serina de la microglía activada (Dhami et al., 2019). En el mismo sentido, se ha informado que la ketamina aguda mejora la microgliosis inducida por los lipopolisacáridos y regula la liberación de mediadores inflamatorios, como el óxido nítrico y la interleucina 1 β , que desempeñan un papel importante en la respuesta inmune (Chang et al., 2009; Ho et al., 2019). Particularmente, esta evidencia invita a preguntarnos si el incremento en la apoptosis celular observada en

Pre-Límbica y estriado puede deberse a un efecto antiinflamatorio agudo de ketamina asociado a apoptosis microglial más que a una secuela del estrés oxidativo exacerbado. De esta forma, encontramos que mientras la administración repetida genera un ambiente pro-oxidativo/proinflamatorio, la administración aguda de una dosis mínima de ketamina presenta un efecto antiinflamatorio.

La ausencia de alteraciones en la unidad neurovascular en el área tegmental ventral, a pesar del estrés oxidativo exacerbado generado por la administración de ketamina, concuerda con resultados obtenidos previamente que muestran cambios estructurales en la corteza después del tratamiento con anfetamina, mientras que las áreas subcorticales solo evidenciaron alteraciones funcionales (Marchese et al., 2015, 2020). En línea con nuestros resultados se ha descrito una susceptibilidad regional de la corteza a los procesos neurodegenerativos donde los astrocitos tienen un papel clave (Acosta-Cabronero et al., 2017; Cragolini et al., 2020), similar a la vulnerabilidad regional observada en pacientes esquizofrénicos (Hamm et al., 2017; Matuszko et al., 2017).

Finalmente, analizamos la arquitectura microvascular a fin de abarcar todos los componentes de la unidad neurovascular. Antecedentes previos del grupo de trabajo mostraron cambios duraderos en la red vascular cortical, inducidos por la administración repetida de anfetamina y en estrecha relación con alteraciones gliales e inflamación (Marchese et al., 2020; Occhieppo et al., 2017; Basmadjian et al., en prensa). Considerando estos antecedentes, en esta tesis nos centramos en analizar la microvasculatura en corteza prefrontal en condiciones basales donde, finalmente, no se observaron diferencias significativas luego de la administración de ketamina, a pesar de la reactividad glial. A la luz de esta evidencia, se podría sugerir que la anfetamina genera efectos vasculares más fuertes, ya sea actuando directamente sobre la misma a través del receptor de trazas de amina (Broadley, 2010), o indirectamente al aumentar la neurotransmisión de dopamina y los marcadores proinflamatorios subyacentes a las alteraciones vasculares que no se observan después de la administración de ketamina.

En resumen, los resultados encontrados en esta tesis ponen en evidencia el efecto inflamatorio dual de la ketamina, así como la susceptibilidad regional a desarrollar cambios glio-adaptativos a largo plazo en respuesta a la administración repetida de este psicofármaco. Parte de estos resultados fueron publicados en Occhieppo y cols., ejn 2020.

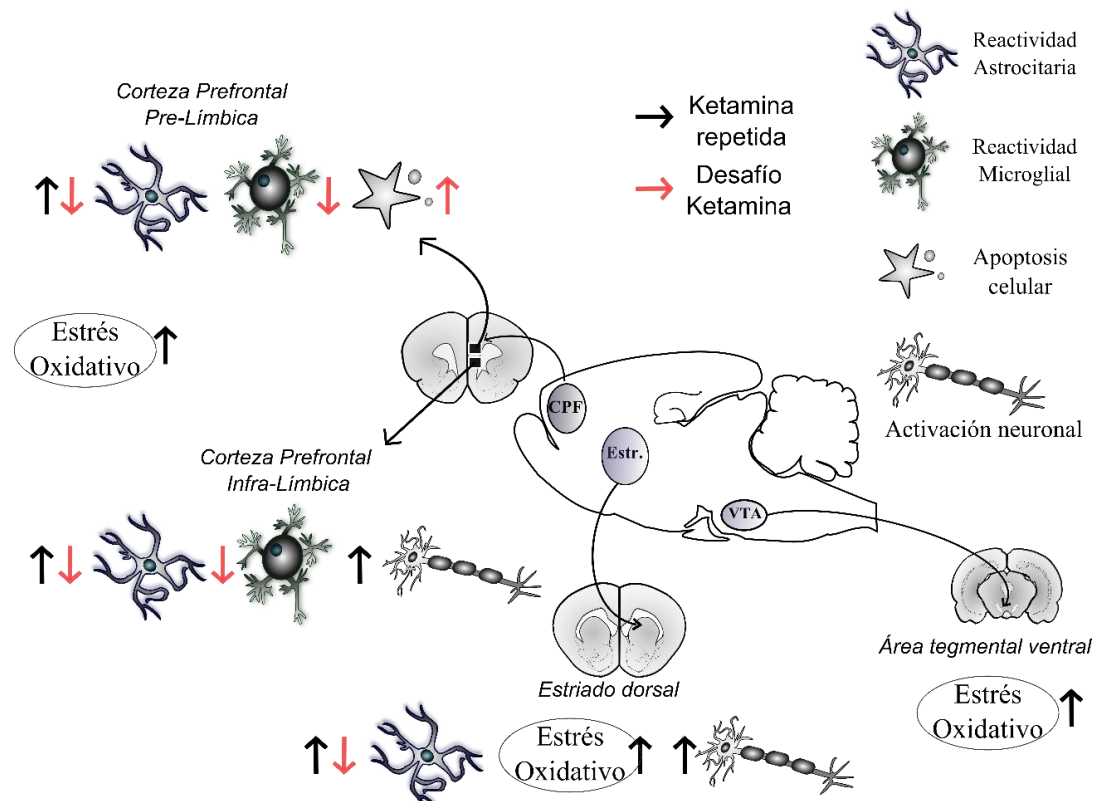


Figura 38: La administración repetida de Ketamina generó un ambiente proinflamatorio/pro-oxidativo que conlleva una adaptación dependiente del área analizada y a largo plazo ya que podemos observar después de 14 días libre de drogas o como un cambio en la respuesta a la dosis desafío (reexposición de la droga). Por otro lado, la administración de una dosis mínima (desafío) presenta un efecto antiinflamatorio agudo independiente del tratamiento previo y muy similar en todas las áreas analizadas. Los parámetros donde no se observaron cambios significativos, así como la arquitectura vascular, no fueron incluidos en la imagen para facilitar su lectura e interpretación.

Rol del receptor AT₁ en los efectos de la ketamina sobre los componentes de la unidad neurovascular

El antagonismo del receptor AT₁ previno el desarrollo de la reactividad astrocitaria y los cambios morfológicos a largo plazo inducidos por ketamina; en coherencia con nuestros hallazgos anteriores que muestran que la participación del receptor AT₁ en la respuesta glial duradera inducida por la administración de amfetamina. En este sentido, previamente encontramos que el bloqueo AT₁ previno el estrés oxidativo y celular, la astrogliosis y microgliosis inducida por amfetamina después de un período de abstinencia, en condiciones basales o como una respuesta exacerbada después de la exposición a amfetamina (Marchese et al., 2020; Occhieppo et al., 2017). De manera similar, en este trabajo observamos que el bloqueo del receptor AT₁ impidió el desarrollo de cambios

neuroadaptativos inducidos por ketamina, evidenciados como hiperactivación neuronal en el área Infra-Límbica y estrés oxidativo exacerbado en respuesta al desafío de ketamina. De acuerdo con estos resultados, previamente se ha mostrado que los antagonistas del receptor AT₁ inhiben la generación de ROS, la expresión de NADPH oxidasa y la peroxidación de lípidos; posiblemente mediante la activación de receptores PPAR- γ (Fujita et al., 2012; Liu et al., 2016). En este sentido, candesartán es un agonista PPAR- γ (Villapol et al., 2012) mientras que la activación de esta vía reduce el estrés oxidativo y la expresión del receptor AT₁ (Ibarra-Lara et al., 2012). Por otro lado, encontramos que la administración de ketamina o del antagonista AT₁ no influyó en la disminución de la reactividad microglial y astrogliar ni en el aumento de la apoptosis celular, evaluado 24 h después de la administración de la dosis desafío de ketamina. Por lo tanto, los efectos agudos del desafío con ketamina no parecen estar asociados con las alteraciones duraderas inducidas por la administración repetida de ketamina y mediadas por el receptor AT₁. Es importante destacar que el antagonista AT₁ (candesartán) ya no está presente cuando se administró el desafío con ketamina. Todos estos resultados sugieren que el bloqueo del receptor AT₁ previene los efectos proinflamatorios a largo plazo inducidos por la administración repetida de ketamina mientras que no afecta el efecto antiinflamatorio de la dosis aguda de ketamina.

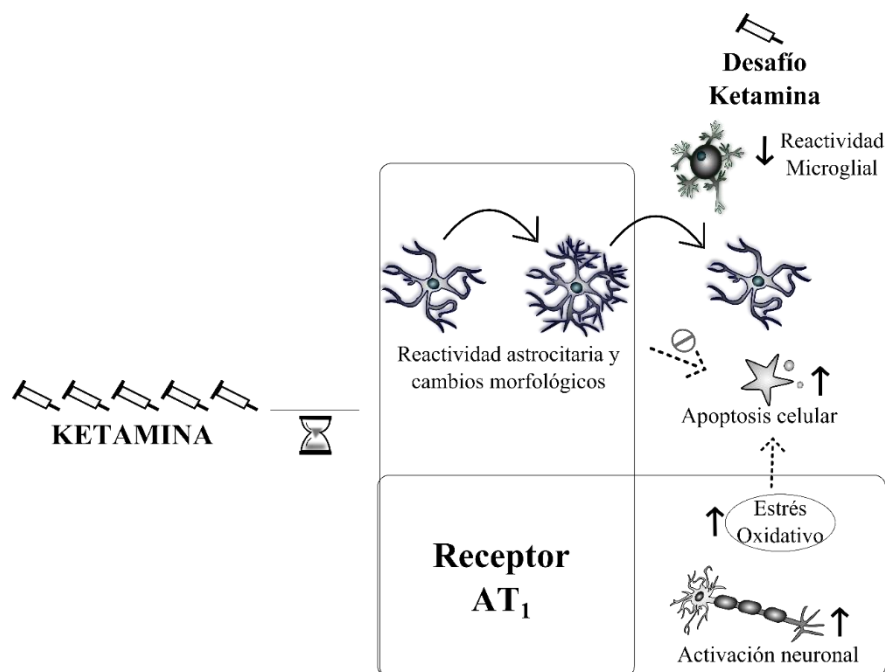


Figura 39: El receptor AT₁ participa en las alteraciones proinflamatorias a largo plazo generadas por la administración repetida de Ketamina, mientras que el bloqueo AT₁ no impide los efectos agudos antiinflamatorios del psicofármaco.

¿Es el proceso de ramificación de astrocitos un mecanismo antiinflamatorio o es independiente de señalización inflamatoria/oxidativa?

Cuando analizamos la morfología astrocitaria, observamos que la exposición a ketamina induce cambios duraderos diferenciales según el área analizada. En este sentido, a pesar que se observó reactividad de astrocitos en ambas sub-áreas de la corteza prefrontal y estriado, cuando se analizó la arquitectura celular, la administración repetida de ketamina indujo alteraciones diferenciales y duraderas en cada una. El aumento de la expresión de GFAP y la respuesta morfológica tan heterogénea observada en el presente trabajo, podría considerarse como una astrogliosis reactiva moderada la cual ha sido descrita como una expresión de GFAP proporcional a la gravedad, acompañada de grados variables de hipertrofia (Anderson et al., 2014). Curiosamente, el receptor AT₁ tiene un rol clave en las alteraciones observadas en las áreas Infra- y Pre-Límbica mientras que, en estriado dorsal, los cambios morfológicos necesitaron del bloqueo previo de los receptores AT₁ para expresarse. Sin embargo, aún no está claro si estas adaptaciones gliales son un mecanismo antiinflamatorio, una cicatriz o, incluso, si están directamente relacionados con procesos inflamatorios/oxidativos.

Por un lado, observamos que el aumento de las ramificaciones de los astrocitos en el área Infra-Límbica, inducido por la administración repetida de ketamina, podría proporcionar un microambiente particular que condicionó la respuesta al desafío de ketamina, observado como un aumento de la activación neuronal y ausencia de apoptosis. Esto no se observó en el área Pre-Límbica, donde la administración aguda y repetida de ketamina indujo una disminución en el número de ramificaciones de los astrocitos y no se observaron diferencias significativas en la activación neuronal total después del desafío con ketamina. Más aún, Ardalan y cols. (2017) mostraron que cambios en la morfología astrocitaria tendría un rol clave en la plasticidad sináptica del hipocampo como un posible mecanismo subyacente a los efectos antidepressivos de la ketamina, y apoyando la interrelación entre la respuesta estructural astrocitaria y una respuesta funcional neuronal. Por otro lado, la ausencia de apoptosis en Infra-Límbica sugiere que estas adaptaciones gliales podrían ser una respuesta neuroprotectora frente al microambiente pro-oxidativo generado por la administración repetida de ketamina (Hou et al. 2013). En línea con estos resultados, se ha propuesto que la oxidación de la dopamina podría ser la causa de la hipertrofia astrocitaria observada en la enfermedad de Parkinson (Booth et al., 2017). Apoyando la idea que las alteraciones morfológicas responden a un estímulo oxidativo,

en ambas áreas de la corteza prefrontal, observamos que la ausencia de estos cambios estructurales va de la mano con la prevención de la respuesta oxidativa incrementada en el grupo que previamente recibió el antagonista AT₁. Se sabe que AngII ejerce un efecto proinflamatorio aumentando el estrés oxidativo y la reactividad de las células gliales (Hammer et al., 2017; O'Connor & Clark, 2019), sustentando los efectos antioxidantes y antiinflamatorios de los antagonistas AT₁ (Prusty et al., 2017; Saavedra, 2017; Villapol & Saavedra, 2015). Sorprendentemente, el bloqueo AT₁ permitió el efecto anti-gliótico agudo de la dosis desafío de ketamina, que acompaña a su función antiinflamatoria, atributo compartido con otros fármacos con actividad antidepresiva (Dhami et al., 2019; Ho et al., 2019). En base a estos resultados podríamos sugerir que el bloqueo previo de los receptores AT₁ generaría adaptaciones gliales duraderas que condicionan su futura respuesta a la administración de dosis mínimas de ketamina, posiblemente como un mecanismo antiinflamatorio y antioxidante inducido por el antagonismo AT₁.

Sin embargo, este supuesto no se cumple en estriado dorsal donde las alteraciones en la ramificación de los astrocitos se observan en respuesta a la dosis desafío y solo en el grupo que recibió el pretratamiento con el antagonista AT₁, a pesar que éste previene el estrés oxidativo exacerbado. Galloway y cols., (2018) han demostrado que la oxidación de dopamina aumenta el área de GFAP sin producir cambios en la estructura astrocitaria; y que, de hecho, el aumento de los niveles de dopamina extracelular sería responsable de promover la ramificación de los astrocitos. Como mencionamos anteriormente (ver introducción) existen muchas evidencias bibliográficas y antecedentes propios del grupo de trabajo soportan la estrecha relación entre AngII, a través de sus receptores AT₁, y dopamina. Más aún, nuestro grupo de trabajo ha mostrado la participación del receptor AT₁ en alteraciones inducidas por la exposición a anfetamina a nivel de todos los componentes de la unidad neurovascular, sumando evidencias que soportan la estrecha relación entre estos dos sistemas, así como los horizontes que alcanza (Marchese et al., 2020; Occhieppo et al., 2017). Es importante resaltar que estas alteraciones morfológicas, además de ser regionalmente diferentes, parecen estar relacionadas con terminales dopaminérgicos considerando su ausencia en área tegmental ventral. En estriado dorsal, observamos un aumento de la ramificación de astrocitos provocada por la dosis desafío de ketamina, independientemente la exposición previa a ketamina. Esto podría deberse al aumento de la liberación de dopamina en el cuerpo estriado después de la administración de la dosis desafío con ketamina, en coherencia con Galloway y cols. (2018) quienes reportaron que el proceso de ramificación se observó en cultivos de astrocitos primarios

tratados con altas concentraciones de dopamina. Curiosamente, los cambios morfológicos en estriado se observaron solo en el grupo candesartán. Considerando este escenario y las evidencias previas es que podemos sugerir que el bloqueo del receptor AT₁, así como la administración de fármacos psicotrópicos, puede inducir cambios duraderos en el equilibrio AngII/dopamina y, en consecuencia, en los procesos futuros relacionados con estos sistemas como la ramificación de astrocitos. Por otro lado, las alteraciones en corteza prefrontal pudieron observarse en condiciones basales donde observamos que la administración repetida de ketamina producía un aumento duradero de la ramificación astrocitaria en Infra-Límbica, mientras que la disminuye en Pre-Límbica. Linderfost (1997) mostró que la administración aguda y repetida de ketamina generaba un incremento transitorio en la liberación de dopamina en corteza prefrontal, la cual no era observable frente a la reexposición a ketamina. Esto sugiere que las neuroadaptaciones generadas por la administración repetida de ketamina podrían ser la base de las respuestas gliales región-dependientes observadas en condiciones basales. Sin embargo, la dosis desafío generó una marcada disminución en el número de brazos en ambas áreas, independientemente de la administración previa de ketamina, lo que posiblemente se deba a que la dosis desafío no genera incremento en la neurotransmisión dopaminérgica en corteza prefrontal.

Teniendo en cuenta esta evidencia, a partir de este punto podemos agregar la estrecha relación entre el receptor AT₁ y dopamina como requisito para esta variación regional en las respuestas de los astrocitos a la administración de ketamina, más que la alteración en el microambiente o la señalización inflamatoria. Sorprendentemente, estos resultados refuerzan la idea de que el bloqueo AT₁ no interfiere en los efectos agudos de la ketamina, mientras que las alteraciones duraderas inducidas por la ketamina están asociadas con el desequilibrio de AngII/dopamina, ya sea generado por administración de antagonistas del receptor AT₁ o fármacos psicotrópicos. Es imperativo la realización de más estudios para comprender la participación del receptor AT₁ en el desarrollo de los efectos a largo plazo de la administración de ketamina y su posible uso como un objetivo de los tratamientos farmacológicos en los trastornos relacionados con el desequilibrio dopaminérgico.

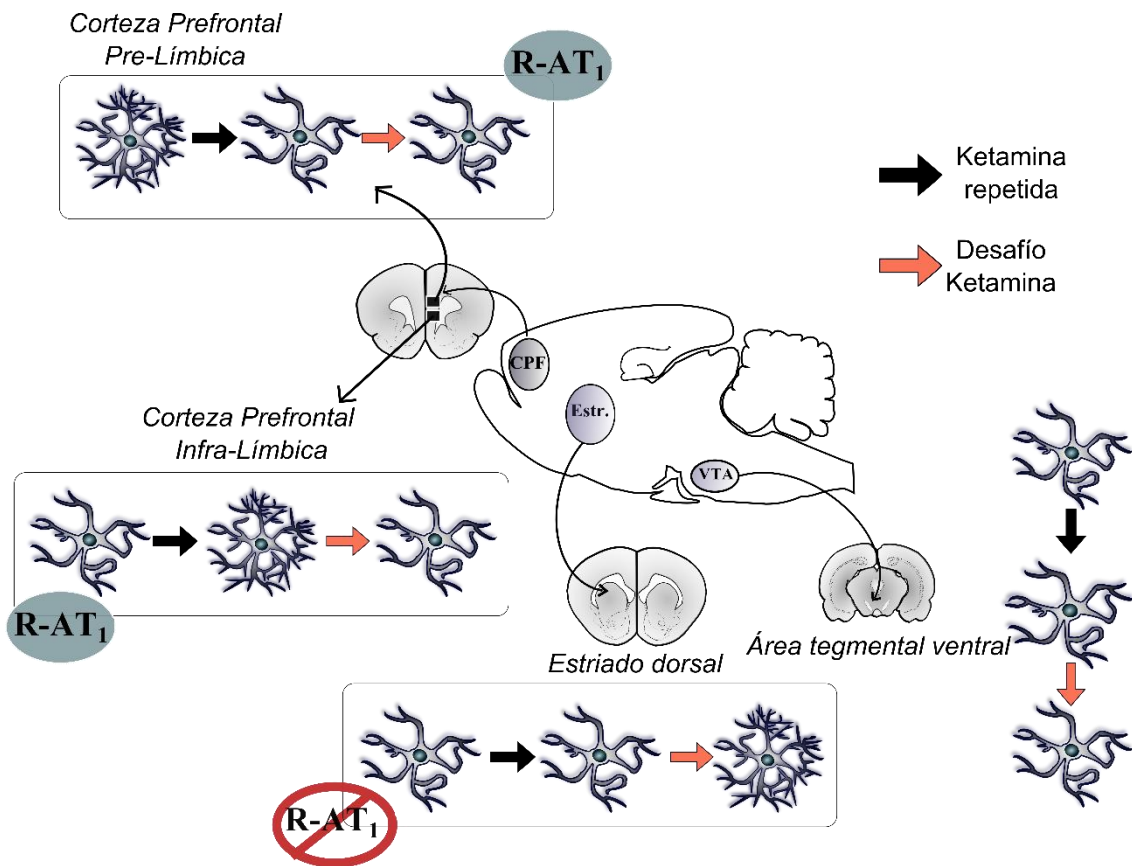


Figura 40: las respuestas estructurales de los astrocitos a la administración aguda y repetida de ketamina muestra una distribución regional en estrecha relación con el equilibrio AngII/ Dopamina. En la corteza prefrontal, el receptor AT_1 participa activamente en los cambios morfológicos, a pesar que éstos muestran una respuesta diferente entre IL y PL. Por otro lado, en estriado dorsal se necesita del bloqueo del receptor AT_1 para que ocurra un cambio morfológico frente a la administración aguda de ketamina. IL: Infra-Límbica. PL: Pre-Límbica

La administración de ketamina recrea los equivalentes etológicos de los signos conductuales característicos de la esquizofrenia

Ambos protocolos de administración de ketamina recrearon los signos característicos de la esquizofrenia, lo que está en concordancia con gran cantidad de evidencia bibliográfica que sostiene que la validez de apariencia como modelo de esquizofrenia. Es importante destacar que el protocolo de administración repetida de ketamina utilizado para esta tesis no se ha publicado previamente, al menos según nuestro conocimiento, y el mismo se propuso en base a diferentes fuentes bibliográficas combinando dosis, periodos de administración de la droga y libre de drogas, así como la dosis y tiempo de administración de la dosis desafío (Becker et al., 2003; Kandratavicius et al., 2015; Schumacher et al., 2016).

El incremento de la actividad locomotora es el equivalente etológico a los signos positivos de la esquizofrenia al presentar una raíz común en la hiperactivación dopaminérgica en las vías nigro-estriada/ meso-límbica. La administración aguda de una dosis subanestésica de ketamina genera un incremento de la locomoción, tal como pudimos observar en nuestros resultados, lo que ha sido directamente asociado un aumento en la liberación de dopamina en el estriado (Chatterjee et al., 2012; Usun et al., 2013). Por otro lado, la administración repetida de ketamina generó sensibilización conductual observada como locomoción exacerbada en respuesta a la dosis desafío de ketamina, después de 14 días libre de droga. Nuestros resultados son coherentes con estudios previos que muestran que esta sensibilización conductual es observable hasta tres semanas después de la última administración de la droga y se la asociada a cambios neuroadaptativos, principalmente a una hiperactividad dopaminérgica y serotoninérgica en el cuerpo estriado (Chatterjee et al., 2012; Yamamoto et al., 2016). En este sentido, nuestros resultados evidenciaron una hiperactivación en estriado dorsal, con una consecuente disminución de la actividad GABAérgica (ver alteración del patrón de activación), que podrían explicar la actividad locomotora exacerbada. En conjunto, nuestros resultados muestran que la administración repetida de ketamina recrea las alteraciones conductuales características de la esquizofrenia, así como las neuroquímicas subyacentes a estos, reforzando la validez de apariencia y constructo del modelo utilizado en esta tesis.

Con respecto a los signos negativos, tanto la administración aguda como repetida de ketamina provocaron una marcada asociabilidad y, como hemos mencionado anteriormente, el análisis de la interacción social en roedores es un punto crítico para la validación del modelo de ketamina (Adell et al., 2012). Además de la hipo-dopaminergia cortical, estas alteraciones han sido asociadas a cambios en la neurotransmisión serotoninérgica, lo que explicaría la leve mejora obtenida con antipsicóticos atípicos (Holuj et al., 2015). En este sentido, se ha descrito que la administración crónica de ketamina produce una disminución de los niveles de serotonina y glicina corticales, a los que se le ha atribuido los síntomas negativos (Chatterjee et al., 2012). En el mismo sentido, en nuestros resultados observamos una alteración en el patrón de activación en ambas áreas de la corteza prefrontal, particularmente en Infra-Límbica, la cual tiene un rol preponderante en las conductas motivacionales, evidenciando un proceso neuroadaptativo a largo plazo que podría ser la base del déficit en la conducta social observada en condiciones basales. Como un hallazgo interesante, hemos observado que la administración de la dosis desafío de ketamina revierte la asociabilidad del grupo tratado con ketamina sin afectar la actividad social de los otros grupos experimentales. En línea con este resultado, se ha demostrado que la administración aguda de dosis mínimas (~15mg/Kg) de ketamina presenta efectos antidepresivos (García et al., 2009). Estas evidencias sostienen que la administración repetida de ketamina recrea los signos negativos de la esquizofrenia a nivel conductual y neuroquímico reforzando la validez como modelo preclínico, mientras que ponen en evidencia el gran abanico de efectos de la ketamina, así como sus posibles aplicaciones terapéuticas dado que estas alteraciones son compartidas con otras patologías psiquiátricas como la depresión.

Finalmente, referido a los signos cognitivos encontramos que la ketamina posee efectos diferenciales ya que la administración aguda impidió la adquisición de la memoria; mientras que la administración de la dosis desafío no generó un impedimento en la adquisición fue necesario forzar al sistema mediante la dosis desafío para desenmascarar el déficit cognitivo a largo plazo. Como mencionamos anteriormente, la memoria declarativa de los humanos tiene su equivalente etológico en los roedores en el test de reconocimiento de objetos el cual permite el estudio de la memoria episódica visual del animal (Meltzer et al., 2013; Nikiforuk et al., 2013). Pudimos observar que la administración aguda de ketamina produce un déficit en la adquisición de la memoria cuando se lo administra 45 min previo a la familiarización, lo que coincide con estudios

previos que muestran que la administración de dosis subanestésicas de ketamina produce daño en la adquisición y evocación de la memoria en humanos y animales (Eldufani et al., 2018; Pitsikas & Markou, 2014). En este sentido, se ha descrito que la administración de ketamina produce déficit en la memoria a corto plazo, generalmente asociado a sus efectos amnésicos durante la anestesia, y cuando pasa el efecto de ketamina, los procesos cognitivos regresan a su estado normal (Eldufani et al., 2018). Curiosamente, la administración de la dosis desafío no produjo un impedimento en la adquisición de la memoria en el grupo control- posiblemente se deba a la dosis-, mientras que desenmascaró el déficit cognitivo en el grupo tratado con ketamina. La importancia de estos resultados radica en que, a pesar de no mostrar deficiencias en la memoria en condiciones basales, un desafío (en este caso farmacológico) fue capaz de impedir los procesos de aprendizaje en los animales expuestos previamente a la ketamina, lo que sugiere el desarrollo de cambios neuroadaptativos a largo plazo que alteran el procesamiento de la información y generación de memoria, incluso tiempo después de la última exposición a psicotrópico. En un marco clínico, los efectos a largo plazo y/o generados por la administración repetida de ketamina, por ejemplo en el marco de tratamiento para el dolor crónico, aún no han sido esclarecidos (Eldufani et al., 2018; Niesters et al., 2014). La bibliografía sugiere que la administración de ketamina induce déficit en la memoria declarativa en modelos animales, similares a los observados en pacientes con esquizofrenia (Hauser et al., 2017; Meltzer et al., 2013); sin embargo, fallas en la memoria espacial, verbal y de trabajo se han visto asociadas a la administración aguda de ketamina más que a un consumo crónico (Cheng et al., 2018; Morgan & Curran, 2006; Newcomer et al., 1999; Rowland et al., 2005). La memoria de reconocimiento, así como la memoria verbal a largo plazo, tiene su base en las cortezas retrospinal, perirhinal y prefrontal (Meltzer et al., 2013); por lo que la alteración en el reconocimiento de objetos podría estar estrechamente relacionada a los cambios neuroadaptativos duraderos en ambas áreas de la corteza prefrontal que se ponen en manifiesto como alteraciones en el patrón de activación y que hemos discutido anteriormente.

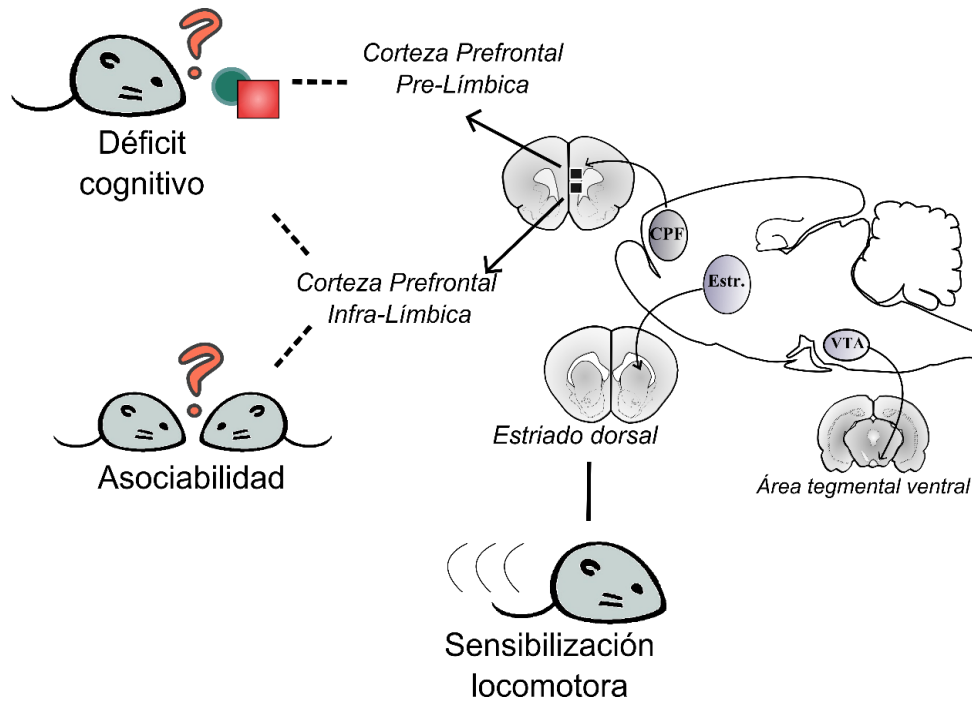


Figura 41: La sensibilización locomotora (signos positivos) generada por la administración repetida de ketamina tiene su base en la hiperactivación dopaminérgica estriatal, lo que coincide con la hiperactivación estriatal- acompañada de una disminución de la activación GABAérgica- observada en nuestros resultados. La corteza prefrontal Infra-Límbica tiene un rol clave en la motivación y estados de ánimo, por lo que la alteración en el patrón de activación en esta área podría explicar los cambios en la conducta social promovidas. Finalmente, considerando que la corteza prefrontal participa activamente en los procesos cognitivos, podemos suponer que el déficit en la memoria declarativa, desenmascarado por la dosis desafío de ketamina, podría estar estrechamente relacionada a los cambios neuroadaptativos a largo plazo evidenciados en Pre- e Infra-Límbica. A pesar que la elección de las áreas analizadas se basó en bibliografía, debemos ser conscientes que las mismas no son suficientes para explicar la complejidad cerebral que subyace a la conducta de un animal.

El receptor AT₁ participa de las alteraciones conductuales a largo plazo generadas por la administración repetida de ketamina

El receptor AT₁ tiene un rol clave en el desarrollo de neuroadaptaciones generadas por ketamina, ya que la administración del candesartán previno las alteraciones conductuales a largo plazo; no así en el efecto agudo de la ketamina. La exposición repetida a ketamina produjo cambios neuroadaptativos a largo plazo que pueden evidenciarse por ese incremento exacerbado de la locomoción en respuesta a una dosis menor de la droga psicoestimulante, después de un periodo de abstinencia de la droga, lo que se conoce como sensibilización conductual. Antecedentes previos del grupo de trabajo demostraron que el bloqueo de los receptores AT₁ previene el desarrollo de la

sensibilización a anfetaminas. Más aún, considerando el rol clave del estriado en el proceso de sensibilización, antecedentes de nuestro grupo de trabajo mostraron que el bloqueo AT₁ local en el estriado impedía la expresión de la sensibilización por anfetaminas. Es importante recalcar que, al igual que lo observado en nuestros resultados, el bloqueo del AT₁ no impide el efecto agudo del psicoestimulante (Paz et al., 2011, 2014).

Resulta interesante que estas alteraciones en la conducta social no se observaron en los animales que recibieron el antagonista AT₁. Previamente se ha demostrado que el candesartán presenta actividad ansiolítica donde la administración del fármaco aumenta el tiempo en brazos abiertos en laberinto en cruz elevada (Saavedra et al., 2005) así como también la administración de Losartán presenta actividad ansiolítica frente a estrés inducido por nado forzado (Ranjbar et al., 2018). Si bien no existen diferencias entre los grupos tratados con el candesartán, parece que su acción no alcanza para prevenir en su totalidad el aislamiento social inducido por la administración aguda de ketamina. Sin embargo, observamos que la administración de candesartán previno el aislamiento social a largo plazo. De esta manera podemos demostrar que los receptores AT₁ participan en el desarrollo de alteraciones neuroquímicas a largo plazo que subyacen a la conducta, y que las respuestas observadas no se deben a los posibles efectos ansiolíticos del candesartán, dado que han pasado 14 días desde la última administración del antagonista AT₁ y el mismo no se encuentra en el sistema al momento de la prueba conductual. Por otro lado, la administración de la dosis desafío revirtió el aislamiento social inducido por la administración repetida de ketamina. Previamente se ha descrito que la administración de ketamina induce aislamiento social en dosis subanestésicas, mientras que, en dosis mínimas, presenta un efecto contrario. Como se menciona anteriormente, la administración de ketamina en dosis mínimas presenta efectos antidepressivos, incluso a nivel del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (Garcia et al., 2009; Zanos & Gould, 2018). Esta dualidad dosis dependiente de la ketamina resulta coherente con nuestros resultados donde el antagonismo del receptor AT₁ previene los efectos deletéreos a largo plazo de ketamina sobre la conducta social, mientras no bloquea sus efectos agudos tipo-antidepressivo.

Finalmente, en nuestros resultados pudimos corroborar que la administración del antagonista AT₁ no modifica el efecto agudo de ketamina sobre los procesos cognitivos, mientras que previene el desarrollo de los cambios neuroadaptativos a largo plazo que

Discusión

subyacen a al déficit cognitivo frente a un desafío, en coherencia con las evidencias encontradas en las otras pruebas conductuales. En este sentido, a pesar que en condiciones basales no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, la exposición a una dosis desafío revela el déficit cognitivo en los animales que tratados con ketamina y que no se observaron en los grupos que recibieron el antagonista del receptor AT₁. Antecedentes previos del grupo de trabajo muestran que el bloqueo de estos receptores previene las alteraciones cognitivas inducidas por la administración de anfetamina (Marchese et al., 2016; Marchese et al., 2020). Interesantemente, se ha reportado que algunos antipsicóticos atípicos producen una mejora en la velocidad de procesamiento, la memoria semántica y la declarativa solo en el 25-50% de los pacientes (Meltzer *et al*, 2013), lo que refuerza la necesidad de buscar nuevos blancos terapéuticos; y dados nuestros antecedentes, el receptor AT₁ presenta gran potencialidad.

Conclusión



Conclusión

El receptor AT₁ participa en los cambios neuroadaptativos, proinflamatorios/pro-oxidativos y conductuales a largo plazo generados por la administración repetida de ketamina; sin embargo, no participa en las respuestas agudas del antagonista NMDA. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis son de gran relevancia dado que no existen datos en la bibliografía en relación al rol de los receptores AT₁ de Angiotensina II en un cuadro de desbalance glutamatérgico/dopaminérgico inducido por ketamina, mientras que aportan evidencias al gran espectro de acción ya descrito para este psicotrópico. Con respecto a esto último, nuestros resultados sustentan un efecto dual de la ketamina que, con solo modificar la dosis, duración del periodo de administración o de abstinencia, puede recrear los signos psicóticos de la esquizofrenia o mostrar efectos antidepresivos.

Dado que el modelo preclínico de esquizofrenia utilizado en este trabajo está ampliamente validado, nuestro trabajo abre una nueva perspectiva donde los receptores AT₁ podrían considerarse como blanco terapéutico tanto en esta patología como en desórdenes relacionados. Más aún, teniendo en cuenta la ausencia de una terapéutica efectiva para el tratamiento de los signos negativos de la esquizofrenia, nuestros resultados a este respecto son más que alentadores. En este sentido, disponer de un abordaje terapéutico integral como el que proporciona la manipulación del sistema angiotensinérgico, el cual permite modular la neurotransmisión dopaminérgica, glutamatérgica y las respuestas neuroinflamatorias, mejorando así la performance conductual, es muy prometedor.

Nuestro trabajo, consideramos, abre el camino a nuevos estudios que colaboren en brindare alivio a los individuos que padecen una patología invalidante como la esquizofrenia.

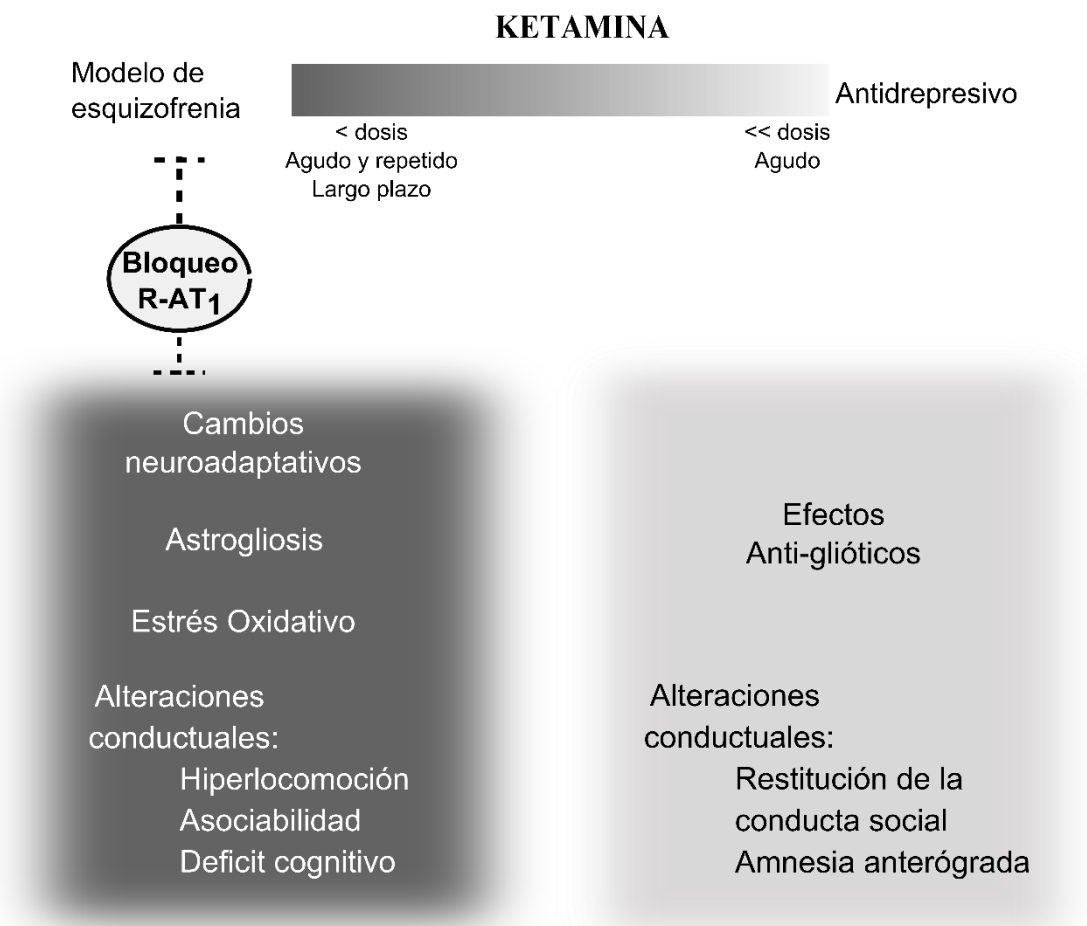


Figura 42: El bloqueo del receptor AT₁ previene las alteraciones a largo plazo generadas por la administración repetida de Ketamina, mientras que carece de impacto en sus efectos agudos tipo-antidrespresivos. La gran versatilidad de la Ketamina permite obtener efectos completamente opuestos con solo modificar la dosis, duración del periodo de administración o de abstinencia.

Bibliografía



Bibliografía

- Abdallah, C. G., De Feyter, H. M., Averill, L. A., Jiang, L., Averill, C. L., Chowdhury, G. M. I., Purohit, P., de Graaf, R. A., Esterlis, I., Juchem, C., Pittman, B. P., Krystal, J. H., Rothman, D. L., Sanacora, G., & Mason, G. F. (2018). The effects of ketamine on prefrontal glutamate neurotransmission in healthy and depressed subjects. *Neuropsychopharmacology*, *43*(10), 2154–2160. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0136-3>
- Acosta-Cabronero, J., Cardenas-Blanco, A., Betts, M. J., Butryn, M., Valdes-Herrera, J. P., Galazky, I., & Nestor, P. J. (2017). The whole-brain pattern of magnetic susceptibility perturbations in Parkinson's disease. *Brain*, *140*(1), 118–131. <https://doi.org/10.1093/brain/aww278>
- Adell, A., Jimenez-Sanchez, L., Lopez-Gil, X., & Romon, T. (2012). Is the acute NMDA receptor hypofunction a valid model of schizophrenia? *Schizophr Bull*, *38*(1), 9–14. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbr133>
- Albrecht, D., Broser, M., Krüger, H., & Bader, M. (1997). Effects of angiotensin II and IV on geniculate activity in nontransgenic and transgenic rats. *European Journal of Pharmacology*, *332*(1), 53–63. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(97\)01062-5](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(97)01062-5)
- Anderson, M. A., Ao, Y., & Sofroniew, M. V. (2014). Heterogeneity of reactive astrocytes. *Neurosci Lett*, *565*, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.12.030>
- Ardalan, M., Rafati, A. H., Nyengaard, J. R., & Wegener, G. (2017). Rapid antidepressant effect of ketamine correlates with astroglial plasticity in the hippocampus. *Br J Pharmacol*, *174*(6), 483–492. <https://doi.org/10.1111/bph.13714>
- Arnold, S. E., Franz, B. R., Trojanowski, J. Q., Moberg, P. J., & Gur, R. E. (1996). Glial fibrillary acidic protein-immunoreactive astrocytosis in elderly patients with schizophrenia and dementia. *Acta Neuropathologica*, *91*(3), 269–277. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8834539>
- Aschrafi, A., Berndt, A., Kowalak, J. A., Gale, J. R., Gioio, A. E., & Kaplan, B. B. (2019). Angiotensin II mediates the axonal trafficking of tyrosine hydroxylase and dopamine β -hydroxylase mRNAs and enhances norepinephrine synthesis in primary sympathetic neurons. *Journal of Neurochemistry*, *150*(6), 666–677. <https://doi.org/10.1111/jnc.14821>
- Auzmendi, J., Moffatt, L., & Ramos, A. J. (2019). Predicting Reactive Astroglial Propagation by Bayesian Computational Modeling: the Repeater Stations Model. *Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-01749-9>
- Bai, X., Yan, Y., Canfield, S., Muravyeva, M. Y., Kikuchi, C., Zaja, I., Corbett, J. A., & Bosnjak, Z. J. (2013). Ketamine enhances human neural stem cell proliferation and induces neuronal apoptosis via reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Anesth Analg*, *116*(4), 869–880. <https://doi.org/10.1213/ANE.0b013e3182860fc9>
- Basmadjian, O. M., Occhieppo, V. B., Marchese, N. A., Baiardi, G., & Bregonzio, C. (2017). Brain Angiotensin II Involvement in Chronic Mental Disorders. *Protein & Peptide Letters*, *24*(9), 817–826. <https://doi.org/10.2174/0929866524666170728144801>
- Becker, A., & Grecksch, G. (2004). Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. Test of predictive validity. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *28*(8), 1267–1277. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2004.06.019>
- Becker, A., Peters, B., Schroeder, H., Mann, T., Huether, G., & Grecksch, G. (2003). Ketamine-induced changes in rat behaviour: A possible animal model of schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *27*(4), 687–700. <https://doi.org/10.1016/S0278->

- Benneyworth, M. A., Roseman, A. S., Basu, A. C., & Coyle, J. T. (2011). Failure of NMDA receptor hypofunction to induce a pathological reduction in PV-positive GABAergic cell markers. *Neuroscience Letters*, *488*(3), 267–271. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.11.043>
- Bernstein, H. G., Steiner, J., Guest, P. C., Dobrowolny, H., & Bogerts, B. (2015). Glial cells as key players in schizophrenia pathology: Recent insights and concepts of therapy. In *Schizophrenia Research*. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.03.035>
- Blanco-Suárez, E., Caldwell, A. L. M., & Allen, N. J. (2017). Role of astrocyte-synapse interactions in CNS disorders. *The Journal of Physiology*, *595*(6), 1903–1916. <https://doi.org/10.1113/JP270988>
- Booth, T. C., Larkin, T. J., Yuan, Y., Kettunen, M. I., Dawson, S. N., Scoffings, D., Canuto, H. C., Vowler, S. L., Kirschenlohr, H., Hobson, M. P., Markowitz, F., Jefferies, S., & Brindle, K. M. (2017). Analysis of heterogeneity in T2-weighted MR images can differentiate pseudoprogression from progression in glioblastoma. *PLoS One*, *12*(5), e0176528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176528>
- Bregonzio, C., Marchese, N. A., Paz, M. C., Artur, E. de la V., Baiardi, G., & Pérez, M. F. (2017). The extent of neuroadaptive responses to psychostimulants: Focus on brain angiotensin system. In *Psychiatry and Neuroscience Update* (Vol. 2, pp. 193–204). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53126-7_15
- Broadley, K. J. (2010). The vascular effects of trace amines and amphetamines. *Pharmacol Ther*, *125*(3), 363–375. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2009.11.005>
- Brown, D. C., Steward, L. J., Ge, J., & Barnes, N. M. (1996). Ability of angiotensin II to modulate striatal dopamine release via the AT1 receptor in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, *118*(2), 414–420. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8735646>
- Bubeníková-Valešová, V., Horáček, J., Vrajová, M., & Höschl, C. (2008). Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 32, Issue 5, pp. 1014–1023). *Neurosci Biobehav Rev*. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.03.012>
- Camchong, J., MacDonald, A. W., Bell, C., Mueller, B. A., & Lim, K. O. (2011). Altered functional and anatomical connectivity in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, *37*(3), 640–650. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbp131>
- Carlsson, M., & Carlsson, A. (1990). Schizophrenia: A subcortical neurotransmitter imbalance syndrome? *Schizophrenia Bulletin*, *16*(3), 425–432. <https://doi.org/10.1093/schbul/16.3.425>
- Casarsa, B. S., Marinzalda, M. A., Marchese, N. A., Paz, M. C., Vivas, L., Baiardi, G., & Bregonzio, C. (2015). A previous history of repeated amphetamine exposure modifies brain angiotensin II AT1 receptor functionality. *Neuroscience*, *307*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.08.027>
- Catts, V. S., Wong, J., Fillman, S. G., Fung, S. J., & Shannon Weickert, C. (2014). Increased expression of astrocyte markers in schizophrenia: Association with neuroinflammation. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*. <https://doi.org/10.1177/0004867414531078>
- Chang, Y., Lee, J. J., Hsieh, C. Y., Hsiao, G., Chou, D. S., & Sheu, J. R. (2009). Inhibitory effects of ketamine on lipopolysaccharide-induced microglial activation. *Mediators Inflamm*, *2009*, 705379. <https://doi.org/10.1155/2009/705379>

- Chatterjee, M., Verma, R., Ganguly, S., & Palit, G. (2012). Neurochemical and molecular characterization of ketamine-induced experimental psychosis model in mice. *Neuropharmacology*, *63*(6), 1161–1171. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.05.041>
- Cheng, S. C., & Schepp, K. G. (2016). Early Intervention in Schizophrenia: A Literature Review. In *Archives of Psychiatric Nursing* (Vol. 30, Issue 6, pp. 774–781). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.apnu.2016.02.009>
- Cheng, W. J., Chen, C. H., Chen, C. K., Huang, M. C., Pietrzak, R. H., Krystal, J. H., & Xu, K. (2018). Similar psychotic and cognitive profile between ketamine dependence with persistent psychosis and schizophrenia. *Schizophrenia Research*, *199*, 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2018.02.049>
- Cohen, S. M., Tsien, R. W., Goff, D. C., & Halassa, M. M. (2015). The impact of NMDA receptor hypofunction on GABAergic neurons in the pathophysiology of schizophrenia. In *Schizophrenia Research* (Vol. 167, Issues 1–3, pp. 98–107). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2014.12.026>
- Cragolini, A. B., Lampitella, G., Virtuoso, A., Viscovo, I., Panetsos, F., Papa, M., & Cirillo, G. (2020). Regional brain susceptibility to neurodegeneration: what is the role of glial cells? *Neural Regen Res*, *15*(5), 838–842. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.268897>
- Crispim Junior, C. F., Pederiva, C. N., Bose, R. C., Garcia, V. A., Lino-de-Oliveira, C., & Marino-Neto, J. (2012). ETHOWATCHER: validation of a tool for behavioral and video-tracking analysis in laboratory animals. *Comput Biol Med*, *42*(2), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2011.12.002>
- Dawson, N., Morris, B. J., & Pratt, J. A. (2013). Subanaesthetic ketamine treatment alters prefrontal cortex connectivity with thalamus and ascending subcortical systems. *Schizophrenia Bulletin*, *39*(2), 366–377. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbr144>
- Dhami, K. S., Churchward, M. A., Baker, G. B., & Todd, K. G. (2019). Fluoxetine and its metabolite norfluoxetine induce microglial apoptosis. *J Neurochem*, *148*(6), 761–778. <https://doi.org/10.1111/jnc.14661>
- Do, J., Kim, J. I., Bakes, J., Lee, K., & Kaang, B. K. (2013). Functional roles of neurotransmitters and neuromodulators in the dorsal striatum. In *Learning and Memory* (Vol. 20, Issue 1, pp. 21–28). Learn Mem. <https://doi.org/10.1101/lm.025015.111>
- Donelson, N. C., Kim, E. Z., Slawson, J. B., Vecsey, C. G., Huber, R., & Griffith, L. C. (2012). High-resolution positional tracking for long-term analysis of *Drosophila* sleep and locomotion using the “tracker” program. *PLoS One*, *7*(5), e37250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037250>
- Dupont, A. G., & Légar, L. (2020). GABA is a mediator of brain AT1 and AT2 receptor-mediated blood pressure responses. In *Hypertension Research* (Vol. 43, Issue 10, pp. 995–1005). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41440-020-0470-9>
- Eldufani, J., Nekoui, A., & Blaise, G. (2018). Nonanesthetic Effects of Ketamine: A Review Article. In *American Journal of Medicine* (Vol. 131, Issue 12, pp. 1418–1424). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2018.04.029>
- Enomoto, T., & Floresco, S. B. (2009). Disruptions in spatial working memory, but not short-term memory, induced by repeated ketamine exposure. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *33*(4), 668–675. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.03.013>
- Fitzsimmons, J., Kubicki, M., & Shenton, M. E. (2013). Review of functional and anatomical brain connectivity findings in schizophrenia. In *Current Opinion in Psychiatry* (Vol. 26,

Issue 2, pp. 172–187). *Curr Opin Psychiatry*.
<https://doi.org/10.1097/YCO.0b013e32835d9e6a>

- Freedman, R. (2003). Schizophrenia. *New England Journal of Medicine*, *349*(18), 1738–1749.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra035458>
- Frohlich, J., & Van Horn, J. D. (2014). Reviewing the ketamine model for schizophrenia. *J Psychopharmacol*, *28*(4), 287–302. <https://doi.org/10.1177/0269881113512909>
- Fujita, T., Hirooka, K., Nakamura, T., Itano, T., Nishiyama, A., Nagai, Y., & Shiraga, F. (2012). Neuroprotective effects of angiotensin II type 1 receptor (AT1-R) blocker via modulating AT1-R signaling and decreased extracellular glutamate levels. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *53*(7), 4099–4110. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-9167>
- Galloway, A., Adeluyi, A., O'Donovan, B., Fisher, M. L., Rao, C. N., Critchfield, P., Sajish, M., Turner, J. R., & Ortinski, P. I. (2018). Dopamine Triggers CTCF-Dependent Morphological and Genomic Remodeling of Astrocytes. *J Neurosci*, *38*(21), 4846–4858. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3349-17.2018>
- Garcia, L. S. B., Comim, C. M., Valvassori, S. S., Réus, G. Z., Stertz, L., Kapczinski, F., Gavioli, E. C., & Quevedo, J. (2009). Ketamine treatment reverses behavioral and physiological alterations induced by chronic mild stress in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *33*(3), 450–455. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2009.01.004>
- Gass, N., Schwarz, A. J., Sartorius, A., Schenker, E., Risterucci, C., Spedding, M., Zheng, L., Meyer-Lindenberg, A., & Weber-Fahr, W. (2014). Sub-anesthetic ketamine modulates intrinsic BOLD connectivity within the hippocampal-prefrontal circuit in the rat. *Neuropsychopharmacology*, *39*(4), 895–906. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.290>
- Gasull-Camos, J., Tarres-Gatius, M., Artigas, F., & Castane, A. (2017). Glial GLT-1 blockade in infralimbic cortex as a new strategy to evoke rapid antidepressant-like effects in rats. *Transl Psychiatry*, *7*(2), e1038. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.7>
- Goff, D. C., & Coyle, J. T. (2001). The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. In *American Journal of Psychiatry* (Vol. 158, Issue 9, pp. 1367–1377). <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.158.9.1367>
- Gonzalez-Burgos, G., Fish, K. N., & Lewis, D. A. (2011). GABA neuron alterations, cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia. In *Neural Plasticity* (Vol. 2011). Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2011/723184>
- Hakami, T., Jones, N. C., Tolmacheva, E. A., Gaudias, J., Chaumont, J., Salzberg, M., O'Brien, T. J., & Pinault, D. (2009). NMDA receptor hypofunction leads to generalized and persistent aberrant γ oscillations independent of hyperlocomotion and the state of consciousness. *PLoS ONE*, *4*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006755>
- Hamm, J. P., Peterka, D. S., Gogos, J. A., & Yuste, R. (2017). Altered Cortical Ensembles in Mouse Models of Schizophrenia. *Neuron*, *94*(1), 153–167 e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.03.019>
- Hammer, A., Stegbauer, J., & Linker, R. A. (2017). Macrophages in neuroinflammation: role of the renin-angiotensin-system. *Pflugers Arch*, *469*(3–4), 431–444. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-1942-x>
- Hanson, D. R., & Gottesman, I. I. (2005). Theories of schizophrenia: A genetic-inflammatory-vascular synthesis. In *BMC Medical Genetics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-6-7>
- Hany, M., Rehman, B., Azhar, Y., & Chapman, J. (2021). Schizophrenia. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30969686>

- Hauser, M. J., Isbrandt, D., & Roeper, J. (2017). Disturbances of novel object exploration and recognition in a chronic ketamine mouse model of schizophrenia. *Behavioural Brain Research*, 332, 316–326. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.06.013>
- Ho, M. F., Zhang, C., Zhang, L., Li, H., & Weinshilboum, R. M. (2019). Ketamine and Active Ketamine Metabolites Regulate STAT3 and the Type I Interferon Pathway in Human Microglia: Molecular Mechanisms Linked to the Antidepressant Effects of Ketamine. *Front Pharmacol*, 10, 1302. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01302>
- Holuj, M., Popik, P., & Nikiforuk, A. (2015). Improvement of ketamine-induced social withdrawal in rats: the role of 5-HT7 receptors. *Behav Pharmacol*, 26(8 Spec No), 766–775. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000132>
- Hou, Y., Zhang, H., Xie, G., Cao, X., Zhao, Y., Liu, Y., Mao, Z., Yang, J., & Wu, C. (2013). Neuronal injury, but not microglia activation, is associated with ketamine-induced experimental schizophrenic model in mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 45, 107–116. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.04.006>
- Ibarra-Lara, L., Hong, E., Soria-Castro, E., Torres-Narvaez, J. C., Perez-Severiano, F., Del Valle-Mondragon, L., Cervantes-Perez, L. G., Ramirez-Ortega, M., Pastelin-Hernandez, G. S., & Sanchez-Mendoza, A. (2012). Clofibrate PPARalpha activation reduces oxidative stress and improves ultrastructure and ventricular hemodynamics in no-flow myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol*, 60(4), 323–334. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31826216ed>
- Ji, G., & Neugebauer, V. (2012). Modulation of medial prefrontal cortical activity using in vivo recordings and optogenetics. *Mol Brain*, 5, 36. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-5-36>
- Kaar, S. J., Angelescu, I., Marques, T. R., & Howes, O. D. (2019). Pre-frontal parvalbumin interneurons in schizophrenia: a meta-analysis of post-mortem studies. *Journal of Neural Transmission*, 126(12), 1637–1651. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02080-2>
- Kandratavicius, L., Balista, P. A., Wolf, D. C., Abrao, J., Evora, P. R., Rodrigues, A. J., Chaves, C., Maia-de-Oliveira, J. P., Leite, J. P., Dursun, S. M., Baker, G. B., Guimaraes, F. S., & Hallak, J. E. C. (2015). Effects of nitric oxide-related compounds in the acute ketamine animal model of schizophrenia. *BMC Neuroscience*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12868-015-0149-3>
- Katerji, M., Filippova, M., & Duerksen-Hughes, P. (2019). Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 1279250. <https://doi.org/10.1155/2019/1279250>
- Kurosaki, R., Muramatsu, Y., Kato, H., Watanabe, Y., Imai, Y., Itoyama, Y., & Araki, T. (2005). Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril on interneurons in MPTP-treated mice. *European Neuropsychopharmacology*, 15(1), 57–67. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2004.05.007>
- Labandeira-Garcia, J. L., Rodriguez-Pallares, J., Villar-Cheda, B., Rodriguez-Perez, A. I., Garrido-Gil, P., & Guerra, M. J. (2011). Aging, Angiotensin system and dopaminergic degeneration in the substantia nigra. *Aging Dis*, 2(3), 257–274. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22396877>
- Légat, L., Smolders, I., & Dupont, A. G. (2019). AT1 Receptor Mediated Hypertensive Response to Ang II in the Nucleus Tractus Solitarii of Normotensive Rats Involves NO Dependent Local GABA Release. *Frontiers in Pharmacology*, 10(MAY), 460. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00460>
- Lewis, D. A., Curley, A. A., Glausier, J. R., & Volk, D. W. (2012). Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. In *Trends in Neurosciences* (Vol.

- 35, Issue 1, pp. 57–67). *Trends Neurosci.* <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.10.004>
- Li, D. P., Chen, S. R., & Pan, H. L. (2003). Angiotensin II stimulates spinally projecting paraventricular neurons through presynaptic disinhibition. *Journal of Neuroscience*, 23(12), 5041–5049. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-12-05041.2003>
- Lindfors, N., Barati, S., & O'Connor, W. T. (1997). Differential effects of single and repeated ketamine administration on dopamine, serotonin and GABA transmission in rat medial prefrontal cortex. *Brain Research*, 759(2), 205–212. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00255-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00255-2)
- Liu, H., Mao, P., Wang, J., Wang, T., & Xie, C. H. (2016). Azilsartan, an angiotensin II type 1 receptor blocker, attenuates tert-butyl hydroperoxide-induced endothelial cell injury through inhibition of mitochondrial dysfunction and anti-inflammatory activity. *Neurochem Int*, 94, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.02.005>
- Mahmoud, S., Gharagozloo, M., Simard, C., & Gris, D. (2019). Astrocytes Maintain Glutamate Homeostasis in the CNS by Controlling the Balance between Glutamate Uptake and Release. *Cells*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/cells8020184>
- Marchese, N. A., Artur de laVillarmois, E., Basmadjian, O. M., Perez, M. F., Baiardi, G., & Bregonzio, C. (2016). Brain Angiotensin II AT1 receptors are involved in the acute and long-term amphetamine-induced neurocognitive alterations. *Psychopharmacology (Berl)*, 233(5), 795–807. <https://doi.org/10.1007/s00213-015-4153-1>
- Marchese, N. A., Casarsa, B. S., Baiardi, G., & Bregonzio, C. (2015). Neurovascular Cognitive Alterations: Implication of Brain Renin–Angiotensin System. In *Psychiatry and Neuroscience Update* (pp. 101–117). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17103-6_9
- Marchese, N. A., Occhieppo, V. B., Basmadjian, O. M., Casarsa, B. S., Baiardi, G., & Bregonzio, C. (2020). Angiotensin II modulates amphetamine-induced glial and brain vascular responses, and attention deficit via angiotensin type 1 receptor: Evidence from brain regional sensitivity to amphetamine. *Eur J Neurosci*, 51(4), 1026–1041. <https://doi.org/10.1111/ejn.14605>
- Martinez-Pinilla, E., Rodriguez-Perez, A. I., Navarro, G., Aguinaga, D., Moreno, E., Lanciego, J. L., Labandeira-Garcia, J. L., & Franco, R. (2015). Dopamine D2 and angiotensin II type 1 receptors form functional heteromers in rat striatum. *Biochem Pharmacol*, 96(2), 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.05.006>
- Matuszko, G., Curreli, S., Kaushik, R., Becker, A., & Dityatev, A. (2017). Extracellular matrix alterations in the ketamine model of schizophrenia. *Neuroscience*, 350, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.03.010>
- McConnell, H. L., Li, Z., Woltjer, R. L., & Mishra, A. (2019). Astrocyte dysfunction and neurovascular impairment in neurological disorders: Correlation or causation? *Neurochem Int*, 128, 70–84. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.04.005>
- McNally, J. M., McCarley, R. W., & Brown, R. E. (2013). Chronic ketamine reduces the peak frequency of gamma oscillations in mouse prefrontal cortex ex vivo. *Frontiers in Psychiatry*, 4(SEP). <https://doi.org/10.3389/fpsy.2013.00106>
- Medelsohn, F. A. O., Jenkins, T. A., & Berkovic, S. F. (1993). Effects of angiotensin II on dopamine and serotonin turnover in the striatum of conscious rats. *Brain Research*, 613(2), 221–229. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90902-Y](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90902-Y)
- Meltzer, H Y, Rajagopal, L., Huang, M., Oyamada, Y., Kwon, S., & Horiguchi, M. (2013). Translating the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist model of schizophrenia to treatments for cognitive impairment in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol*,

16(10), 2181–2194. <https://doi.org/10.1017/S1461145713000928>

- Meltzer, Herbert Y., Rajagopal, L., Huang, M., Oyamada, Y., Kwon, S., & Horiguchi, M. (2013). Translating the N-methyl-d-aspartate receptor antagonist model of schizophrenia to treatments for cognitive impairment in schizophrenia. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *16*(10), 2181–2194. <https://doi.org/10.1017/S1461145713000928>
- Mertens, B., Vanderheyden, P., Michotte, Y., & Sarre, S. (2010). The role of the central renin-angiotensin system in Parkinson's disease. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, *11*(1), 49–56. <https://doi.org/10.1177/1470320309347789>
- Millan, M. J., Fone, K., Steckler, T., & Horan, W. P. (2014). Negative symptoms of schizophrenia: Clinical characteristics, pathophysiological substrates, experimental models and prospects for improved treatment. *European Neuropsychopharmacology*, *24*(5), 645–692. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2014.03.008>
- Miller, S. J. (2018). Astrocyte Heterogeneity in the Adult Central Nervous System. *Front Cell Neurosci*, *12*, 401. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00401>
- Monte, A. S., De Souza, G. C., McIntyre, R. S., Soczynska, J. K., Dos Santos, J. V., Cordeiro, R. C., Ribeiro, B. M. M., De Lucena, D. F., Vasconcelos, S. M. M., De Sousa, F. C. F., Carvalho, A. F., & Macêdo, D. S. (2013). Prevention and reversal of ketamine-induced schizophrenia related behavior by minocycline in mice: Possible involvement of antioxidant and nitrenergic pathways. *Journal of Psychopharmacology*, *27*(11), 1032–1043. <https://doi.org/10.1177/0269881113503506>
- Mooney, R. D., Zhang, Y., & Rhoades, R. W. (1994). Effects of angiotensin ii on visual neurons in the superficial laminae of the hamster's superior colliculus. *Visual Neuroscience*, *11*(6), 1163–1173. <https://doi.org/10.1017/S0952523800006969>
- Morgan, C. J. A., & Curran, H. V. (2006). Acute and chronic effects of ketamine upon human memory: A review. In *Psychopharmacology* (Vol. 188, Issue 4, pp. 408–424). Psychopharmacology (Berl). <https://doi.org/10.1007/s00213-006-0572-3>
- Morgan, C. J. A., Mofeez, A., Brandner, B., Bromley, L., & Curran, H. V. (2004). Acute Effects of Ketamine on Memory Systems and Psychotic Symptoms in Healthy Volunteers. *Neuropsychopharmacology*, *29*(1), 208–218. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300342>
- Morgan, C. J., Rossell, S. L., Pepper, F., Smart, J., Blackburn, J., Brandner, B., & Curran, H. V. (2006). Semantic priming after ketamine acutely in healthy volunteers and following chronic self-administration in substance users. *Biol Psychiatry*, *59*(3), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.06.018>
- Newcomer, J. W., Farber, N. B., Jevtovic-Todorovic, V., Selke, G., Melson, A. K., Hershey, T., Craft, S., & Olney, J. W. (1999). Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology*, *20*(2), 106–118. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(98\)00067-0](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(98)00067-0)
- Nicolás, M., López-Azcárate, J., Valencia, M., Alegre, M., M, P.-A., Iriarte, J., & Artieda, J. (2011). Ketamine-induced oscillations in the motor circuit of the rat basal ganglia. *PLoS One*, *6*(7). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0021814>
- Niesters, M., Martini, C., & Dahan, A. (2014). Ketamine for chronic pain: Risks and benefits. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *77*(2), 357–367. <https://doi.org/10.1111/bcp.12094>
- Nikiforuk, A., Fijal, K., Potasiewicz, A., Popik, P., & Kos, T. (2013). The 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 6 agonist EMD 386088 ameliorates ketamine-induced deficits in attentional set shifting and novel object recognition, but not in the prepulse inhibition in

- rats. *J Psychopharmacol*, 27(5), 469–476. <https://doi.org/10.1177/0269881113480991>
- Niklitschek, S. L., Paula Pino, P., & Francisco Aboitiz, D. (2011). Neural synchrony and schizophrenia: Lights and shadows. *Revista Chilena de Neuro-Psiquiatria*, 49(4), 372–380. <https://doi.org/10.4067/s0717-92272011000400009>
- O'Connor, A. T., & Clark, M. A. (2019). Angiotensin II induces cyclooxygenase 2 expression in rat astrocytes via the angiotensin type 1 receptor. *Neuropeptides*, 77, 101958. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.101958>
- Occhieppo, V. B., Basmadjian, O. M., Marchese, N. A., Silvero, C. M., Rodriguez, A., Armonelli, S., Becerra, M. C., Baiardi, G., & Bregonzio, C. (2020). AT1 -R is involved in the development of long-lasting, region-dependent and oxidative stress-independent astrocyte morphological alterations induced by Ketamine. *Eur J Neurosci*. <https://doi.org/10.1111/ejn.14756>
- Occhieppo, V. B., Marchese, N. A., Rodriguez, I. D., Basmadjian, O. M., Baiardi, G., & Bregonzio, C. (2017). Neurovascular unit alteration in somatosensory cortex and enhancement of thermal nociception induced by amphetamine involves central AT1 receptor activation. *Eur J Neurosci*. <https://doi.org/10.1111/ejn.13594>
- Oroszova, Z., Hricova, L., Stropkova, A., Lukacova, N., & Pavel, J. (2017). The Characterization of AT1 Expression in the Dorsal Root Ganglia After Chronic Constriction Injury. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37(3), 545–554. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0396-6>
- Papa, M., De Luca, C., Petta, F., Alberghina, L., & Cirillo, G. (2014). Astrocyte-neuron interplay in maladaptive plasticity. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 42, pp. 35–54). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.01.010>
- Paz, M. C., Assis, M. A., Cabrera, R. J., Cancela, L. M., & Bregonzio, C. (2011). The AT(1) angiotensin II receptor blockade attenuates the development of amphetamine-induced behavioral sensitization in a two-injection protocol. *Synapse*, 65(6), 505–512. <https://doi.org/10.1002/syn.20868>
- Paz, M. C., Marchese, N. A., Cancela, L. M., & Bregonzio, C. (2013). Angiotensin II AT(1) receptors are involved in neuronal activation induced by amphetamine in a two-injection protocol. *Biomed Res Int*, 2013, 534817. <https://doi.org/10.1155/2013/534817>
- Paz, M. C., Marchese, N. A., Stroppa, M. M., Gerez de Burgos, N. M., Imboden, H., Baiardi, G., Cancela, L. M., & Bregonzio, C. (2014). Involvement of the brain renin-angiotensin system (RAS) in the neuroadaptive responses induced by amphetamine in a two-injection protocol. *Behav Brain Res*, 272, 314–323. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.021>
- Phatnani, H., & Maniatis, T. (2015). Astrocytes in neurodegenerative disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020628>
- Pitsikas, N., & Markou, A. (2014). The metabotropic glutamate 2/3 receptor agonist LY379268 counteracted ketamine- and apomorphine-induced performance deficits in the object recognition task, but not object location task, in rats. *Neuropharmacology*, 85, 27–35. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.05.008>
- Prusty, S. K., Sahu, P. K., & Subudhi, B. B. (2017). Angiotensin Mediated Oxidative Stress and Neuroprotective Potential of Antioxidants and AT1 Receptor Blockers. *Mini Rev Med Chem*, 17(6), 518–528. <https://doi.org/10.2174/1389557516666161025094539>
- Rajkowska, G., Miguel-Hidalgo, J. J., Makkos, Z., Meltzer, H., Overholser, J., & Stockmeier, C. (2002). *Layer-specific reductions in GFAP-reactive astroglia in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia*. www.elsevier.com/locate/schres

- Ranjbar, H., Aghaei, I., Moosazadeh, M., & Shabani, M. (2018). Angiotensin II type 1 receptor blocker losartan attenuates locomotor, anxiety-like behavior, and passive avoidance learning deficits in a sub-chronic stress model. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, *21*(8), 856–862. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2018.27113.6632>
- Rowland, L. H., Astur, R. S., Jung, R. E., Bustillo, J. R., Lauriello, J., & Yeo, R. A. (2005). Selective cognitive impairments associated with NMDA receptor blockade in humans. *Neuropsychopharmacology*, *30*(3), 633–639. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300642>
- Saavedra, J M. (2017). Beneficial effects of Angiotensin II receptor blockers in brain disorders. *Pharmacol Res*, *125*(Pt A), 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.06.017>
- Saavedra, J M, Benicky, J., & Zhou, J. (2006). Angiotensin II: multitasking in the brain. *J Hypertens Suppl*, *24*(1), S131-7. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000220418.09021.ee>
- Saavedra, Juan M., Armando, I., Bregonzio, C., Juorio, A., Macova, M., Pavel, J., & Sanchez-Lemus, E. (2006). A centrally acting, anxiolytic angiotensin II AT1 receptor antagonist prevents the isolation stress-induced decrease in cortical CRF 1 receptor and benzodiazepine binding. *Neuropsychopharmacology*, *31*(6), 1123–1134. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300921>
- Saavedra, Juan M, Ando, H., Armando, I., Baiardi, G., Bregonzio, C., Juorio, A., & Macova, M. (2005). Anti-stress and anti-anxiety effects of centrally acting angiotensin II AT1 receptor antagonists. *Regulatory Peptides*, *128*(3), 227–238. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.12.015>
- Schumacher, A., Sivanandan, B., Toledo, E. C., Woldegabriel, J., & Ito, R. (2016). Different dosing regimens of repeated ketamine administration have opposite effects on novelty processing in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *69*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2016.03.007>
- Sesack, S. R., Carr, D. B., Omelchenko, N., & Pinto, A. (2003). Anatomical Substrates for Glutamate-Dopamine Interactions: Evidence for Specificity of Connections and Extrasynaptic Actions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1003*, 36–52. <https://doi.org/10.1196/annals.1300.066>
- Steullet, P., Cabungcal, J. H., Coyle, J., Didriksen, M., Gill, K., Grace, A. A., Hensch, T. K., Lamantia, A. S., Lindemann, L., Maynard, T. M., Meyer, U., Morishita, H., O'Donnell, P., Puhl, M., Cuenod, M., & Do, K. Q. (2017). Oxidative stress-driven parvalbumin interneuron impairment as a common mechanism in models of schizophrenia. In *Molecular Psychiatry* (Vol. 22, Issue 7, pp. 936–943). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.47>
- Stragier, B., Sarre, S., Vanderheyden, P., Vauquelin, G., Fournié-Zaluski, M. C., Ebinger, G., & Michotte, Y. (2004). Metabolism of angiotensin II is required for its in vivo effect on dopamine release in the striatum of the rat. *Journal of Neurochemistry*, *90*(5), 1251–1257. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02600.x>
- Tourjman, V., Kouassi, É., Koué, M.-È., Rocchetti, M., Fortin-Fournier, S., Fusar-Poli, P., & Potvin, S. (2013). Antipsychotics' effects on blood levels of cytokines in schizophrenia: A meta-analysis. *Schizophrenia Research*, *151*(1–3), 43–47. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2013.10.011>
- Usun, Y., Eybrard, S., Meyer, F., & Louilot, A. (2013). Ketamine increases striatal dopamine release and hyperlocomotion in adult rats after postnatal functional blockade of the prefrontal cortex. *Behav Brain Res*, *256*, 229–237. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.08.017>
- van Kammen, D. P. (1979). The dopamine hypothesis of schizophrenia revisited.

Psychoneuroendocrinology, 4(1), 37–46. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(79\)90039-8](https://doi.org/10.1016/0306-4530(79)90039-8)

- Van Kesteren, C. F. M. G., Gremmels, H., De Witte, L. D., Hol, E. M., Van Gool, A. R., Falkai, P. G., Kahn, R. S., & Sommer, I. E. C. (2017). Immune involvement in the pathogenesis of schizophrenia: A meta-analysis on postmortem brain studies. *Translational Psychiatry*, 7(3), e1075–e1075. <https://doi.org/10.1038/tp.2017.4>
- Vasconcelos, G. S., Ximenes, N. C., de Sousa, C. N. S., Oliveira, T. de Q., Lima, L. L. L., de Lucena, D. F., Gama, C. S., Macêdo, D., & Vasconcelos, S. M. M. (2015). Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: Participation of antioxidant, nitroergic and neurotrophic mechanisms. *Schizophrenia Research*, 165(2–3), 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2015.04.017>
- Villapol, S., & Saavedra, J. M. (2015). Neuroprotective effects of angiotensin receptor blockers. *Am J Hypertens*, 28(3), 289–299. <https://doi.org/10.1093/ajh/hpu197>
- Villapol, S., Yaszemski, A. K., Logan, T. T., Sanchez-Lemus, E., Saavedra, J. M., & Symes, A. J. (2012). Candesartan, an angiotensin II AT(1)-receptor blocker and PPAR-gamma agonist, reduces lesion volume and improves motor and memory function after traumatic brain injury in mice. *Neuropsychopharmacology*, 37(13), 2817–2829. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.152>
- Villar-Cheda, B., Dominguez-Meijide, A., Valenzuela, R., Granado, N., Moratalla, R., & Labandeira-Garcia, J. L. (2014). Aging-related dysregulation of dopamine and angiotensin receptor interaction. *Neurobiol Aging*, 35(7), 1726–1738. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.017>
- Villar-Cheda, B., Rodriguez-Pallares, J., Valenzuela, R., Munoz, A., Guerra, M. J., Baltatu, O. C., & Labandeira-Garcia, J. L. (2010). Nigral and striatal regulation of angiotensin receptor expression by dopamine and angiotensin in rodents: implications for progression of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, 32(10), 1695–1706. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07448.x>
- Villar-Cheda, Begoña, Dominguez-Meijide, A., Joglar, B., Rodriguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2012). Involvement of microglial RhoA/Rho-Kinase pathway activation in the dopaminergic neuron death. Role of angiotensin via angiotensin type 1 receptors. *Neurobiology of Disease*, 47(2), 268–279. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.04.010>
- Von Bohlen Und Halbach, O., & Albrecht, D. (1998). Mapping of angiotensin AT1 receptors in the rat limbic system. *Regulatory Peptides*, 78(1–3), 51–56. [https://doi.org/10.1016/S0167-0115\(98\)00109-8](https://doi.org/10.1016/S0167-0115(98)00109-8)
- Wiltschko, A. B., Pettibone, J. R., & Berke, J. D. (2010). Opposite effects of stimulant and antipsychotic drugs on striatal fast-spiking interneurons. *Neuropsychopharmacology*, 35(6), 1261–1270. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.226>
- Witko-Sarsat, V., Friedlander, M., Capeillere-Blandin, C., Nguyen-Khoa, T., Nguyen, A. T., Zingraff, J., Jungers, P., & Descamps-Latscha, B. (1996). Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*, 49(5), 1304–1313. <https://doi.org/10.1038/ki.1996.186>
- World Health Organization. (2019). *Schizophrenia*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schizophrenia>
- Wright, J., & Harding, J. (2011). Brain renin-angiotensin—a new look at an old system. *Progress in Neurobiology*.
- Wu, C., Zha, H., Xia, Q., Yuan, Y., Liang, X., & Li, J. (2013). Expression of angiotensin II and its receptors in activated microglia in experimentally induced cerebral ischemia in the

adult rats. *Molecular and Cellular*.

- Xiong, H., & Marshall, K. C. (1990). Angiotensin II modulation of glutamate excitation of locus coeruleus neurons. *Neuroscience Letters*, *118*(2), 261–264. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(90\)90642-M](https://doi.org/10.1016/0304-3940(90)90642-M)
- Yamamoto, T., Nakayama, T., Yamaguchi, J., Matsuzawa, M., Mishina, M., Ikeda, K., & Yamamoto, H. (2016). Role of the NMDA receptor GluN2D subunit in the expression of ketamine-induced behavioral sensitization and region-specific activation of neuronal nitric oxide synthase. *Neuroscience Letters*, *610*, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.10.049>
- Ye, Z., Li, Q., Guo, Q., Xiong, Y., Guo, D., Yang, H., & Shu, Y. (2018). Ketamine induces hippocampal apoptosis through a mechanism associated with the caspase-1 dependent pyroptosis. *Neuropharmacology*, *128*, 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.09.035>
- Zanos, P., & Gould, T. D. (2018). Mechanisms of ketamine action as an antidepressant. *Mol Psychiatry*, *23*(4), 801–811. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.255>
- Zhou, X., Yang, H., Song, X., Wang, J., Shen, L., & Wang, J. (2019). Central blockade of the AT1 receptor attenuates pressor effects via reduction of glutamate release and downregulation of NMDA/AMPA receptors in the rostral ventrolateral medulla of rats with stress-induced hypertension. *Hypertension Research*, *42*(8), 1142–1151. <https://doi.org/10.1038/s41440-019-0242-6>
- Zhou, Y., Fan, L., Qiu, C., & Jiang, T. (2015). Prefrontal cortex and the dysconnectivity hypothesis of schizophrenia. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 31, Issue 2, pp. 207–219). Science Press. <https://doi.org/10.1007/s12264-014-1502-8>

Producción científica



Publicaciones

Título: *Schizophrenia-like enduring neuroadaptive and behavioural changes induced by Ketamine administration involve Angiotensin II AT1-R*

Autores: Occhieppo Victoria B., Basmadjian Osvaldo M., Marchese Natalia A., Jaime, Andrea-, Pérez Mariela F.; Baiardi Gustavo and Bregonzio Claudia
(Manuscrito en revisión)

Título: *AT1-R blockade effects in striatal astrocytes and behavioural responses to acute Ketamine administration*

Autores: Occhieppo Victoria B., Basmadjian Osvaldo M., Marchese Natalia A., Silvero C M. Jazmin., Jaime Andrea, Becerra M. Cecilia, Baiardi Gustavo and Bregonzio Claudia.
(Manuscrito en revisión)

Título: *Brain Angiotensin II in dopaminergic imbalance-derived pathologies: neuroinflammation and vascular responses*

Autores: Occhieppo Victoria B., Basmadjian Osvaldo M. and Bregonzio Claudia.

Revista: Neural Regeneration Research.

Datos bibliográficos: Neural Regen Res. **2021**;16(3):504-505. doi: 10.4103/1673-5374.293144

Título: *AT1-R is involved in the development of long-lasting, region-dependent and oxidative stress-independent astrocyte morphological alterations induced by Ketamine.*

Autores: Occhieppo Victoria B., Basmadjian Osvaldo M., Marchese Natalia A., Silvero C. M. Jazmin, Rodríguez Anahí, Becerra M. Cecilia, Baiardi Gustavo and Bregonzio Claudia

Revista: European Journal of Neuroscience

Datos bibliográficos: Special Issue Glial Plasticity in Health and Disease. Eur J Neurosci. **2020**; 00:1–12. doi: 10.1111/ejn.14756

Título: *Neurovascular unit alteration in somatosensory cortex and enhancement of thermal nociception induced by amphetamine involves central AT1 receptor activation.*

Autores: Occhieppo, Victoria B; Marchese, Natalia A; Rodríguez, Iara D; Basmadjian, Osvaldo M; Baiardi, Gustavo; Bregonzio, Claudia.

Revista: European Journal of Neuroscience.

Datos bibliográficos: Eur J Neurosci. **2017**; 45(12):1586-1593. doi: 10.1111/ejn.13594

Colaboraciones

Título: *Amphetamine induces oxidative stress, glial activation and transient angiogenesis in prefrontal cortex via AT1-R.*

Autores: Basmadjian Osvaldo M, Occhieppo Victoria B, Marchese Natalia A, Silvero C Jazmín, Becerra María C, Baiardi Gustavo and Bregonzio Claudia

Revista: Frontiers in Pharmacology

Datos bibliográficos: Front. Pharmacol. **2021** doi: 10.3389/fphar.2021.647747

Título: *Angiotensin II modulates amphetamine-induced glial and brain vascular responses, and attention deficit via angiotensin type 1 receptor: Evidence from brain regional sensitivity to amphetamine.*

Autores: Marchese, Natalia. A. Occhieppo, Victoria. B. Basmadjian, Osvaldo. M. Casarsa, Brenda. S. Baiardi, Gustavo. Bregonzio, Claudia

Revista: European Journal of Neuroscience

Datos bibliográficos: Eur J Neurosci. **2020**; 51(4):1026-1041. doi: 10.1111/ejn.14605.

Título: *Pharmacological NOS-1 Inhibition Within the Hippocampus Prevented Expression of Cocaine Sensitization: Correlation with Reduced Synaptic Transmission.*

Autores: Artur de la Villarmois E, Gabach LA, Bianconi S, Poretti MB, Occhieppo V, Schiöth HB, Carlini VP, Pérez MF.

Revista: Molecular Neurobiology

Datos bibliográficos: Mol Neurobiol. **2020**; 57(1):450-460. doi: 10.1007/s12035-019-01725-3

Título: *Brain angiotensin II involvement in chronic mental disorders.*

Autores: Basmadjian, Osvaldo M; Occhieppo, Victoria B; Marchese, Natalia A, Baiardi, Gustavo; Bregonzio, Claudia.

Revista: Protein and Peptide Letters.

Datos bibliográficos: Null: Bentham Science Publ Ltd. **2017**; 17;24(9):817-826. doi: 10.2174/0929866524666170728144801

Capítulos de libro

Título: *Glial cells in the schizophrenia puzzle: Angiotensin II role*

Autores: Occhieppo Victoria B; Basmadjian Osvaldo M; Marchese Natalia A; Rodríguez Anahí; Jaime Andrea; Herrera Malena; Bregonzio Claudia.

Libro: Psychiatry and Neuroscience Update.

Datos bibliográficos: Springer, Cham. **2021**; 169-181. doi.org/10.1007/978-3-030-61721-9_16

Título: *How deep amphetamines impact our brain and why to focus on Angiotensin II.*

Autores: Basmadjian Osvaldo M; Armonelli Samanta; Occhieppo Victoria B; Jaime Andrea; Baiardi Gustavo and Bregonzio Claudia.

Libro: Horizons in neuroscience research.

Datos bibliográficos: Nova Science Publishers; **2020**. 38; 147-176

Título: *Vascular alterations in mental disorders: focus in Angiotensin II role*

Autores: Delgado-Marín Leticia Ester; Basmadjian Osvaldo Martin; Occhieppo Victoria Belén; Marchese Natalia Andrea; Bregonzio Claudia; Baiardi Gustavo Carlos

Libro: Psychiatry and Neuroscience Update.

Datos bibliográficos: Psychiatry and Neuroscience Update. Springer, Cham. **2019**; 101-112. doi.org/10.1007/978-3-319-95360-1_9

Título: *Mechanisms Involved in Memory Processes: Alterations Induced by Psychostimulants—Targeting the Central AT1 Receptors*

Autores: Marchese Natalia Andrea; Basmadjian Osvaldo Martin; Occhieppo Victoria Belén; Baiardi Gustavo Carlos; Bregonzio Claudia

Libro: Psychiatry and Neuroscience Update.

Datos bibliográficos: Psychiatry and Neuroscience Update. Springer, Cham. **2017**; 173-192. doi.org/10.1007/978-3-319-53126-7_14