



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Estudio de las bases neurobiológicas del comportamiento socioafectivo normal y patológico en roedores

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Juan Martín Uehara

Directora de tesis: Dra. Estefanía Pilar Bello Gay

Co-director de tesis: Dr. Juan Emilio Belforte

Consejero de estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de trabajo: Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay
(IFIBIO, UBA-CONICET)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2025

DEDICATORIA

A mis padres, por la vida.

A mis gatos, por salvarla.

AGRADECIMIENTOS

A la universidad pública, gratuita, laica y de calidad, por nutrirme como ser humano.

A la ciencia, por ser brújula en el laberinto del antiintelectualismo y la posverdad.

A las fuerzas del suelo argentino, por forjar mis convicciones y sostener mi praxis.

A mi comunidad, por ser oxígeno en momentos de asfixia.

A los integrantes del IFIBIO, por la vocación y la excelencia.

A mis directores, Teté y Juan, por la oportunidad, la paciencia y el compromiso.

A mis colegas y amigos del laboratorio, por ser ejemplo, sostén y alegría cotidianos.

A los animales que hicieron posible este trabajo, por su contribución involuntaria e invaluable.

A Nico, Fede, Seno, Mica y Sofi, por los oídos, los hombros y el corazón.

A Vishal, Toni y Ralph, por la hermandad en la distancia.

A Petunia, por la ternura.

A Leo, por el amor incondicional.

A mi familia, por el hogar y el refugio.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	10
1. Comportamiento socioafectivo en roedores	10
2. Rol de la dopamina en el comportamiento social	13
3. Alteraciones socioafectivas en la esquizofrenia humana	17
4. Modelos murinos e hipótesis fisiopatológicas de la esquizofrenia	20
5. Ablación posnatal temprana del receptor NMDA en interneuronas GABAérgicas corticolímbicas	21
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. Consideraciones éticas	27
2. Animales	27
3. Genotipado	28
4. Mantenimiento de los animales	28
5. Evaluación del comportamiento	29
5.1. Pruebas realizadas en la cámara de sociabilidad	29
5.1.1. Diseño general	29
5.1.2. Preferencia y reconocimiento social	30
5.1.3. Discriminación de estados afectivos	32
5.1.4. Interacción social libre	34
5.2. Interacción social prolongada	34
5.3. Jerarquía social y dominancia	36
5.4. Agresión y territorialidad	37
6. Cirugía estereotáctica	38
7. Drogas	38
8. Histología e inmunohistoquímica	39
9. Estadística	40
RESULTADOS	42
1. Rol de las neuronas dopaminérgicas de la VTA en el comportamiento socioafectivo.	42
1.1. Estrategia experimental	42
1.2. Preferencia y reconocimiento social	43
1.3. Discriminación de estados afectivos de distinta valencia	46
2. Efectos de la hipofunción glutamatérgica en interneuronas corticolímbicas sobre la discriminación de estados afectivos	50

2.1. Discriminación de estados afectivos de distinta valencia.....	50
2.2. Preferencia social, reconocimiento social y ansiedad.....	56
2.3. Funcionamiento social en diferentes contextos	59
2.4. Interacción social prolongada.....	62
DISCUSIÓN.....	69
1. Comportamiento socioafectivo normal y neuronas dopaminérgicas de la VTA	69
2. Comportamiento socioafectivo patológico e hipofunción glutamatérgica en interneuronas GABAérgicas corticolímbicas.	72
3. Consideraciones adicionales	77
CONCLUSIÓN.....	78
BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXO	93

RESUMEN

Título: Estudio de las bases neurobiológicas del comportamiento socioafectivo normal y patológico en roedores.

El comportamiento socioafectivo es el conjunto de respuestas conductuales desencadenadas por el estado emocional o afectivo de un congénere durante una interacción social. Esta capacidad es fundamental en la ejecución de funciones adaptativas clave para la supervivencia en mamíferos, como la defensa del territorio, la agresión, el cuidado parental y la organización social jerárquica. Pese a su relevancia, sus bases neurobiológicas no han sido exploradas en profundidad.

El sistema dopaminérgico central ha sido implicado en la regulación de diversos comportamientos sociales en roedores. Sin embargo, aún se desconoce si participa en la discriminación de estados afectivos de distinta valencia. En este marco, el área tegmental ventral (VTA) destaca como una región de interés dado su rol en el procesamiento de la valencia de estímulos primarios y condicionados. Por otro lado, numerosos estudios han vinculado a la dopamina en la fisiopatología de la esquizofrenia, un trastorno que cursa con alteraciones en el comportamiento social y, particularmente, en el procesamiento afectivo. Si bien se han desarrollado diversos modelos animales para estudiar la esquizofrenia, los mismos no han explorado alteraciones sociales con relevancia traslacional, como las relativas a la discriminación de estados afectivos y la interacción social durante períodos prolongados. En este contexto, nos propusimos investigar las bases neurobiológicas del comportamiento socioafectivo en condiciones normales y patológicas en ratones.

Con el objetivo de evaluar el rol de las neuronas dopaminérgicas de la VTA en distintos aspectos del comportamiento socioafectivo, inhibimos su actividad durante una batería comportamental mediante un abordaje quimiogénético. En un paradigma de discriminación de estados afectivos, los animales fueron expuestos simultáneamente a un congénere en un estado neutral y a otro en un estado de valencia positiva o negativa, inducido experimentalmente por preexposición a una recompensa o episodios de derrota social, respectivamente. Mientras que el grupo control estableció un sesgo de preferencia por el animal en el estado afectivo manipulado, la inhibición quimiogénética de la población neuronal blanco abolió dicha preferencia. En contraste, la manipulación quimiogénética no afectó la discriminación básica de estímulos sociales en una prueba de preferencia y reconocimiento social.

Con el fin de evaluar el impacto de una manipulación fisiopatológica relevante para la esquizofrenia sobre el comportamiento socioafectivo, utilizamos ratones mutantes *Grin1* KO que carecen de receptores NMDA funcionales en un grupo de interneuronas GABAérgicas corticolímbicas desde una etapa temprana del desarrollo. Nuestro equipo reportó previamente

que este modelo murino presenta indicadores preliminares de disfunción social y alteraciones dopaminérgicas espontáneas, secundarias a la manipulación genética. En esta tesis demostramos que, a diferencia de sus controles, los mutantes *Grin1* KO fueron incapaces de discriminar a sus congéneres en función de sus estados afectivos, fueran estos inducidos de forma apetitiva o aversiva. Este déficit no se extendió a otras formas de discriminación, como la que se da entre un estímulo social y un objeto inanimado o entre congéneres de distinta novedad. Asimismo, los ratones *Grin1* KO exhibieron dificultades funcionales en diferentes contextos sociales, como la formación de jerarquías y la defensa del territorio frente a intrusos. Finalmente, en un nuevo paradigma diseñado para monitorear la interacción entre pares durante períodos prolongados, los mutantes *Grin1* KO evidenciaron un fenotipo de retraimiento social, el cual fue revertido mediante un tratamiento subcrónico con el antipsicótico clozapina.

En conjunto, nuestros hallazgos sugieren que el sistema dopaminérgico del cerebro medio desempeña un papel en el comportamiento socioafectivo normal y que la hipofunción glutamatérgica constituye un mecanismo fisiopatológico relevante para las alteraciones socioafectivas presentes en trastornos neuropsiquiátricos como la esquizofrenia.

Palabras clave: comportamiento socioafectivo, dopamina, área tegmental ventral, quimiogenética, receptor NMDA, mutante *Grin1* KO, interneuronas, esquizofrenia.

ABSTRACT

Title: Study of the neurobiological basis of normal and pathological socio-affective behavior in rodents.

Socio-affective behavior is a set of behavioral responses triggered by the emotional or affective state of a conspecific during social interaction. This capacity is fundamental for performing adaptive functions that are crucial for survival in mammals, such as territorial defense, aggression, parental care, and hierarchical social organization. Despite its relevance, its neurobiological bases have not been thoroughly explored.

The central dopaminergic system has been implicated in the regulation of various social behaviors in rodents. However, its role in the discrimination of affective states of different valence remains unknown. The ventral tegmental area (VTA) emerges as a region of interest given its role in encoding the valence of both primary and conditioned stimuli. Additionally, dopamine has been extensively linked to the pathophysiology of schizophrenia, a disorder associated with disruptions in social behavior and, particularly, in affective processing. Although several animal models have been used to study this condition, most have not addressed social deficits with translational relevance, such as those related to affective state discrimination and prolonged social interaction. In this context, we investigated the neurobiological bases of socio-affective behavior under both normal and pathological conditions in mice.

To assess the role of VTA dopaminergic neurons in different aspects of socio-affective behavior, we chemogenetically inhibited their activity during a behavioral test battery. In an affective state discrimination paradigm, animals were simultaneously presented with one conspecific in a neutral state and another in either a positive or negative affective state, experimentally induced by prior exposure to a reward or social defeat, respectively. While control animals developed a preference bias toward the conspecific in the manipulated affective state, chemogenetic inhibition of the target neuronal population abolished this preference. In contrast, this manipulation did not affect the discrimination of basic social stimuli in a social preference and recognition test.

To evaluate the impact of a pathophysiological manipulation relevant to schizophrenia on socio-affective behavior, we used *Grin1* KO mutant mice, which lack functional NMDA receptors in a subset of corticolimbic GABAergic interneurons from early development. Our team previously reported that this mouse model exhibits preliminary indicators of social dysfunction and spontaneous dopaminergic alterations secondary to the genetic manipulation. In this thesis, we demonstrate that, unlike their controls, *Grin1* KO mutants were unable to discriminate between conspecifics based on their affective states, whether induced appetitively or aversively. This deficit did not extend to other forms of discrimination, such as between a social stimulus and

an inanimate object or between conspecifics of different novelty. Additionally, *Grin1* KO mice exhibited functional deficits in various social contexts, such as hierarchy formation and territorial defense against intruders. Finally, in a novel paradigm designed to monitor peer interaction over extended periods, *Grin1* KO mutants displayed a social withdrawal phenotype, which was reversed by subchronic treatment with the antipsychotic clozapine.

Taken together, our findings suggest that the midbrain dopaminergic system plays a role in normal socio-affective behavior and that glutamatergic hypofunction constitutes a relevant pathophysiological mechanism for the socio-affective alterations observed in neuropsychiatric disorders such as schizophrenia.

Keywords: socio-affective behavior, dopamine, ventral tegmental area, chemogenetics, NMDA receptor, *Grin1* KO mutant, interneurons, schizophrenia.

INTRODUCCIÓN

1. Comportamiento socioafectivo en roedores

El comportamiento social abarca toda forma de comunicación o interacción entre individuos de una misma especie. Su flexibilidad y dinamismo son fundamentales para facilitar la adaptación a entornos cambiantes, lo que contribuye a la supervivencia y al éxito reproductivo [1]. Las bases neurobiológicas que subyacen al comportamiento social normal y patológico han sido estudiadas frecuentemente mediante el uso de modelos animales. En particular, los roedores han sido ampliamente utilizados debido a la disponibilidad de herramientas genéticas avanzadas, la similitud entre sus circuitos neuronales y sistemas neuroquímicos con los del ser humano y su complejo repertorio de comportamientos sociales, que incluye la agresividad, la jerarquía social, el marcado territorial, el anidamiento comunal, la recompensa social, la cooperación y los comportamientos sexuales y parentales [2, 3]. En este trabajo nos enfocaremos en la interacción social general y el comportamiento socioafectivo en ratones.

Durante décadas, la investigación básica en neurociencia social ha dependido de un número limitado de paradigmas conductuales simples, como el test de interacción social libre y el test de tres cámaras. En el primero, se evalúa el comportamiento espontáneo de una diada de animales desconocidos en una arena abierta, midiéndose la cantidad y tipo de interacciones como indicadores de interés social [4]. En el segundo, el animal evaluado es expuesto a estímulos sociales e inanimados en una cámara de tres compartimentos, estudiándose dos dimensiones clave: la preferencia social o *sociabilidad* —definida como la tendencia a explorar durante mayor tiempo a un congénere en comparación con un objeto— y el reconocimiento social —entendido como un sesgo de exploración hacia un congénere novedoso frente a uno presentado previamente [5]. Pese a su popularidad, estos paradigmas reducen la complejidad del comportamiento social a un número limitado de indicadores, ignorando las interacciones sociales de mayor validez ecológica, como las que ocurren durante períodos prolongados y entre más de dos congéneres [6]. En consecuencia, la extrapolación de los resultados obtenidos en modelos animales al ser humano se ve severamente limitada, lo que dificulta la evaluación de fármacos para el tratamiento de alteraciones sociales presentes en diversos trastornos neuropsiquiátricos, como el autismo o la esquizofrenia [7]. Por lo tanto, se ha vuelto necesario adoptar un enfoque que integre múltiples aspectos del comportamiento social y que capture su dinámica y plasticidad a lo largo del tiempo.

Las interacciones sociales están íntimamente relacionadas con la capacidad de detectar, evaluar y responder adaptativamente a los estados emocionales expresados por pares. Las emociones han sido caracterizadas como estados lábiles e independientes de la evaluación consciente, desencadenados por estímulos intrínsecos o extrínsecos, procesados por circuitos

neuronales específicos y que dan lugar a un conjunto de respuestas conductuales, somáticas, cognitivas y fisiológicas [8, 9]. Asimismo, los estados emocionales se clasifican mediante dos dimensiones: la valencia hedónica —que oscila entre el placer y la aversión— y el nivel de excitación y alerta del individuo —que varía entre la sedación y la activación [10]. Los términos emoción y afecto han sido utilizados de manera ambigua en estudios del comportamiento animal [11, 12] y el esfuerzo por establecer una distinción teórica entre los mismos carece de sustento experimental [13, 14]. Por ende, en este trabajo los consideramos análogos y empleamos el término comportamiento socioafectivo para referirnos a la respuesta comportamental desencadenada por un estado emocional o afectivo expresado por un congénere en el contexto de una interacción social.

Mientras que los seres humanos poseen una capacidad socioafectiva altamente desarrollada que puede manifestarse a través de procesos complejos como la empatía, la toma de perspectiva y la compasión [15], en las últimas décadas se ha demostrado que algunas de estas funciones están conservadas evolutivamente en otras especies, si bien bajo formas más rudimentarias. Por ejemplo, diversos estudios han evidenciado que los roedores poseen la capacidad de reflejar las emociones de sus congéneres (denominada contagio emocional), de consolarlos mediante lamidos y acicalamientos luego de situaciones estresantes e, incluso, de liberarlos de situaciones aversivas sin recibir una recompensa tangible [16-21]. Estos comportamientos de carácter prosocial evidencian la existencia de una capacidad básica para procesar los estados emocionales de sus pares. Estudios recientes han demostrado que los roedores de ambos sexos no sólo son capaces de reaccionar al estado afectivo expresado por un congénere, sino que también pueden discriminar estados afectivos de distinta valencia [11, 12, 22-31], lo que les permite sesgar preferencialmente su comportamiento social hacia un par que comunica información con relevancia adaptativa. Con el fin de evaluar dicha capacidad de forma experimental, se han desarrollado paradigmas de preferencia socioafectiva basados en pruebas de reconocimiento facial de emociones en humanos [32]. En breve, el animal evaluado, también llamado observador, es expuesto a dos congéneres novedosos denominados demostradores: uno se encuentra en un estado neutral y el otro en un estado afectivo alterado producto de una manipulación experimental previa. Para inducir un estado afectivo de valencia negativa se han utilizado diversos protocolos aversivos que incluyen restricción física [12, 23, 24, 28, 29], descargas eléctricas [11, 22, 24-27], aislamiento social [28, 29, 31] y privación de comida [30]. Por otro lado, para inducir un estado afectivo positivo asociado al alivio se ha empleado el restablecimiento del alimento [30] y del agua [11, 12, 23, 29] tras un período de privación. Hasta la fecha, se ha evaluado la conducta del animal observador durante intervalos menores a diez minutos, encontrándose diferencias marcadas en la exploración de los demostradores sólo durante los primeros minutos de interacción social. En la mayoría de los estudios, se ha observado una preferencia marcada por el congénere en el estado afectivo

alterado de forma positiva o negativa con respecto al animal *naïve*, aunque se ha reportado que factores como la edad [22] y la familiaridad [25] de los demostradores pueden modular esta preferencia. Dado que el observador no presencié ni experimentó la manipulación previa de sus pares, un sesgo de exploración consistente hacia uno de los demostradores refleja el reconocimiento de los estados afectivos expresados en el contexto de la interacción social.

El estado afectivo experimentado por un roedor puede influir en el comportamiento de un congénere gracias a la participación de la Red de Toma de Decisiones Sociales (*Social Decision-Making Network*), un sistema de estructuras cerebrales interconectadas que permite el reconocimiento y la integración de las señales sensoriales provenientes de un congénere, el procesamiento de la información y la producción de una decisión comportamental de carácter social [33, 34]. Esta red incluye el pálido ventral, el septum lateral y el núcleo del lecho de la estría terminal, junto con distintas estructuras del sistema dopaminérgico mesolímbico como el área tegmental ventral (VTA), el núcleo accumbens, la amígdala y el hipocampo. Se ha propuesto que la información multisensorial de las señales socioafectivas es detectada como saliente por la VTA del cerebro medio, integrada con la relativa a la valencia en la amígdala basolateral y contextualizada en el hipocampo a fin de asociarla a la identidad del congénere y a experiencias previas [35]. Además, el valor de recompensa de la interacción social es evaluado por el núcleo accumbens, que transmite la información a otras estructuras de la red involucradas en conductas dirigidas a metas, como la corteza prefrontal medial, el septum lateral y el núcleo del lecho de la estría terminal, para dar curso a una respuesta comportamental de aproximación o evitación social en función del riesgo o recompensa asociado a las señales socioafectivas puestas en juego [35].

Recientemente, se ha comenzado a dilucidar el papel de diversas estructuras y circuitos cerebrales de la Red de Toma de Decisiones Sociales en la discriminación de estados afectivos de distinta valencia. La evidencia disponible apunta a la existencia de un sustrato común entre especies que involucra a la amígdala central [11] y basolateral [27], la corteza retrosplenial [23], la ínsula [22, 26, 27], la corteza prefrontal medial [12, 23, 28, 29] y el núcleo accumbens [26]. Sin embargo, los mecanismos neurobiológicos que subyacen al comportamiento socioafectivo siguen siendo objeto de una intensa investigación.

2. Rol de la dopamina en el comportamiento social

Numerosos estudios respaldan el rol de los neuropéptidos hipotalámicos oxitocina y vasopresina en la regulación de diversos comportamientos sociales [36, 37]. Mientras que la oxitocina participa en el cuidado materno, la formación de vínculos de pareja y el comportamiento prosocial [38], la vasopresina está implicada en el reconocimiento social, la comunicación y la agresión, especialmente en machos [39]. Ambos sistemas de neuropéptidos interactúan estrechamente con el sistema dopaminérgico [40], tradicionalmente vinculado al control motor, la motivación y la señalización de recompensas [41] y que, en las últimas décadas, ha emergido como un modulador clave de respuestas sociales complejas. El sistema nervioso central de los mamíferos cuenta con un grupo de vías dopaminérgicas principales (ver Box 1), entre las cuales el tracto mesocorticolímbico ha sido el principal implicado en la regulación del comportamiento social en roedores. El mismo proyecta desde la VTA, ubicada en el mesencéfalo, a diversas estructuras de la Red de Toma de Decisiones Sociales involucradas en el procesamiento de información social y emocional, como la corteza prefrontal, el núcleo accumbens y la amígdala [42, 43].

En las últimas décadas, se han utilizado técnicas avanzadas para interrogar el rol de la dopamina en diversos aspectos del comportamiento social. Los primeros hallazgos, obtenidos mediante microdiálisis *in vivo*, revelaron que la exposición a congéneres novedosos incrementa los niveles tónicos de dopamina en el núcleo accumbens y la corteza prefrontal medial [44]. El desarrollo posterior de la voltametría cíclica de barrido rápido permitió medir cambios en la concentración de dopamina extracelular con una mayor resolución temporal que la microdiálisis. De este modo, se observaron aumentos fásicos de los niveles de dopamina en el núcleo accumbens en respuesta a interacciones libres y breves con distintos tipos de congéneres, incluyendo machos adultos, hembras receptivas y no receptivas [45, 46]. Más adelante, un estudio utilizó fotometría de fibras en tiempo real para investigar el rol de las neuronas dopaminérgicas de la VTA en la interacción social libre con un animal novedoso del mismo sexo [47]. La actividad de esta población neuronal aumentó marcadamente durante los primeros episodios de interacción social y se habituó en estadios posteriores. Para discriminar el componente social del efecto de la novedad general, los animales también fueron expuestos a un objeto desconocido. Si bien la exploración de dicho objeto generó una señal de calcio de una amplitud similar a la observada durante la interacción con el congénere, la actividad neuronal se alineó con el final del contacto, pero no con su inicio, lo que sugiere que las neuronas dopaminérgicas de la VTA codifican de manera distinta la información asociada a estímulos sociales e inanimados. Por otra parte, la manipulación optogenética de estas neuronas logró modular bidireccionalmente el comportamiento social: mientras que su activación aumentó la interacción social con el congénere novedoso, su inhibición la redujo [47]. Cabe mencionar que

dicha modulación se limitó al comportamiento social, ya que no se observó durante la exposición al objeto. Otro trabajo reportó que la inhibición quimiogénica de la actividad dopaminérgica de la VTA no afecta la preferencia por un congénere frente a un objeto inanimado en el test de tres cámaras [48]. Sin embargo, esta manipulación suprime la preferencia por un congénere novedoso frente a uno familiar, induciendo simultáneamente un fenotipo de hipolocomoción. Este estudio también demostró que la actividad dopaminérgica de la VTA es necesaria para que la interacción social novedosa resulte reforzante, lo que favorece la formación de una asociación contextual en el paradigma de preferencia de lugar condicionada. Una investigación posterior demostró que la población neuronal mencionada cumple un rol en el aprendizaje por refuerzo social mediante la codificación del error de predicción social, que permite ajustar el comportamiento en función de la discrepancia entre las expectativas y el resultado real de una interacción con un congénere [49]. Por último, un estudio reciente utilizó el sensor GRABDA2m para analizar con alta resolución temporal y especificidad celular la dinámica de la liberación dopaminérgica en el núcleo accumbens durante varios comportamientos sociales en ratones [50]. Los resultados mostraron un aumento gradual de los niveles de dopamina durante la aproximación a un congénere novedoso de igual o distinto sexo, lo que sugiere que la dopamina señala la motivación por iniciar una interacción social. Los niveles de dopamina aumentaron aún más durante la investigación inicial del congénere, pero se adaptaron con la repetición de los episodios de investigación, reflejando la reducción en la novedad del estímulo social presentado. Un patrón similar se observó en el paradigma de habituación-deshabituación social, donde tanto la respuesta dopaminérgica como la exploración social disminuyeron progresivamente con la exposición repetida a un mismo congénere y se recuperaron al presentarse un nuevo sujeto. La habituación de la respuesta comportamental fue abolida a través de la estimulación optogénica de las terminales dopaminérgicas de la VTA en el núcleo accumbens, permitiendo una exploración sostenida del congénere familiar. El estudio también reveló un dimorfismo sexual en la liberación de dopamina durante conductas consumatorias de apareamiento, con una mayor liberación en machos que en hembras. Finalmente, en el paradigma de residente-intruso, se identificaron patrones opuestos de actividad dopaminérgica. Como residentes, los ratones mostraron un aumento en la liberación de dopamina durante episodios de agresión hacia un congénere del mismo sexo. En cambio, cuando actuaron como intrusos, la actividad dopaminérgica disminuyó de manera consistente durante los episodios de derrota social. Estos hallazgos sugieren que la dopamina no sólo señala la motivación y la novedad social, sino que también codifica la valencia de las experiencias sociales.

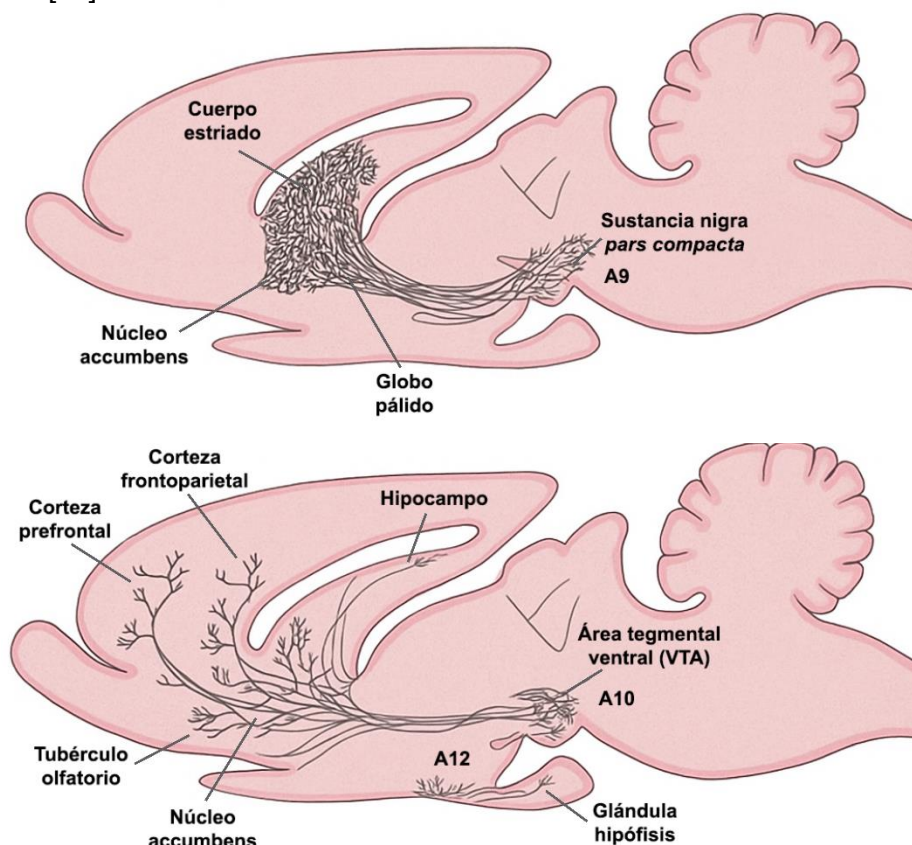
Como puede observarse, la evidencia disponible otorga un papel central a la VTA y a sus regiones de proyección en diversos aspectos del comportamiento social. Actualmente, se considera a esta región mesencefálica como una estructura cerebral heterogénea formada por subpoblaciones de neuronas dopaminérgicas que codifican diferentes aspectos de un evento

[51]. Por un lado, un tipo de neuronas dopaminérgicas codifican la valencia o valor motivacional de estímulos primarios o condicionados. Por ejemplo, reforzadores positivos como la comida o claves predictoras de una recompensa inducen respuestas excitatorias rápidas en las neuronas de la VTA que proyectan al núcleo accumbens [41]. En contraste, experiencias aversivas como pinchazos en una pata o soplidos de aire en el rostro inducen una respuesta neuronal menos homogénea, reportándose tanto aumentos como inhibiciones en su actividad [52, 53]. Por otro lado, otro tipo de neuronas dopaminérgicas codifica la saliencia motivacional de un evento, es decir, responden a estímulos relevantes o que capturan la atención pero no frente a aquellos de carácter neutral [41, 54]. Un estudio reciente investigó el papel de distintos ensambles neuronales de la VTA en comportamientos adaptativos impulsados por estímulos de distinta valencia [55]. Mediante la técnica de recombinación dirigida en poblaciones activas (*Targeted Recombination in Active Populations* o TRAP), se identificaron dos poblaciones de neuronas funcionalmente distintas e intercaladas topográficamente, pero no superpuestas, reclutadas de forma selectiva ante experiencias positivas (como la administración de un opioide) o negativas (como el estrés social agudo). Asimismo, la investigación reveló que ambos ensambles estaban conformados por una proporción equivalente de distintos tipos neuronales, con una sobrerrepresentación de neuronas dopaminérgicas con respecto a las GABAérgicas y glutamatérgicas. Por otra parte, los ensambles demostraron una reactivación específica frente a estímulos congruentes con su valencia original (como una recompensa alimentaria y un shock eléctrico) incluso semanas después, lo que sugiere una estabilidad significativa en la respuesta neuronal a largo plazo. El estudio también demostró que la reactivación quimiogénica de estas dos poblaciones de neuronas de la VTA es suficiente para inducir respuestas de preferencia o evitación condicionada a un contexto, replicando los efectos comportamentales de las manipulaciones apetitivas y aversivas mencionadas en un principio. Además, la inhibición quimiogénica de los ensambles logró bloquear por completo dichos efectos. Por último, un hallazgo clave de este trabajo fue que, aunque los ensambles identificados representan sólo el 10% de las neuronas de la VTA, son capaces de modular de manera significativa los comportamientos motivados por experiencias apetitivas y aversivas.

En conclusión, numerosos estudios en roedores han implicado al sistema dopaminérgico central —y en particular a las neuronas dopaminérgicas de la VTA— en el procesamiento de información de carácter social, incluyendo la valencia del congénere. No resulta sorprendente, entonces, que diversos trastornos psiquiátricos que afectan este sistema cursen, a su vez, con alteraciones en el comportamiento social. El siguiente apartado se centrará en la esquizofrenia, con un análisis detallado de las disfunciones socioafectivas que caracterizan su presentación clínica.

Box 1. Sistema dopaminérgico central

En el cerebro de los mamíferos, existen cuatro vías neuronales que utilizan la dopamina como neurotransmisor principal [42]. *Arriba:* La vía nigroestriatal, que se origina en la sustancia nigra *pars compacta* (área A9) y proyecta hacia el estriado dorsal, está involucrada en el control de la función motora y la formación de hábitos y su disfunción se relaciona con los síntomas motores de la enfermedad de Parkinson [42, 56]. *Abajo:* Por su parte, la vía mesocortical, que proyecta desde la VTA (área A10) hacia la corteza prefrontal, cingulada y entorrinal, está vinculada a funciones emocionales, cognitivas y motivacionales y su alteración se asocia con trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia y la depresión [42, 56]. También originada en la VTA, la vía mesolímbica proyecta hacia el núcleo accumbens, la amígdala, el hipocampo, la corteza piriforme y el tubérculo olfatorio y cumple un rol clave en los comportamientos motivados, el aprendizaje por refuerzo y el procesamiento de recompensas, siendo su disfunción un factor clave en las conductas compulsivas y adictivas [42, 56]. Finalmente, la vía tuberoinfundibular, que parte de los núcleos arcuato y paraventricular del hipotálamo (área A12) hacia la eminencia media de la glándula pituitaria, regula la síntesis y secreción de prolactina y su alteración se relaciona con trastornos metabólicos y de fertilidad [42, 56]. Esquemas adaptados de [57].



3. Alteraciones socioafectivas en la esquizofrenia humana

El estudio del comportamiento social es fundamental no sólo para dilucidar las bases neurobiológicas que sustentan su manifestación típica, sino también para identificar los mecanismos fisiopatológicos que subyacen a fenotipos sociales anómalos, como los que se observan en diversos trastornos neurológicos y psiquiátricos. Entre ellos, la esquizofrenia se destaca como una de las principales causas de carga global de enfermedad [58] y constituye un importante problema de salud pública dado su inicio temprano, curso crónico y gran impacto subjetivo [59].

En la esquizofrenia existe un amplio repertorio de síntomas (ver Box 2), entre los que se destacan las alteraciones en el plano interpersonal. Estas incluyen dificultades para reconocer emociones, inferir intenciones ajenas, formar y mantener relaciones con pares y desenvolverse adecuadamente en diferentes contextos sociales [60]. A su vez, estas dificultades están íntimamente vinculadas a la cognición social, entendida como el conjunto de operaciones mentales involucradas en el reconocimiento, procesamiento y utilización de información socialmente relevante [61]. Estos procesos están profundamente alterados en la esquizofrenia desde una etapa temprana del trastorno, anteceden al primer episodio psicótico, son relativamente estables a lo largo del tiempo y poseen cierto grado de independencia de los déficits neurocognitivos generales, como los que afectan la memoria y la atención [62-66]. Pese al gran impacto de las alteraciones en la cognición social sobre la calidad de vida, la eficacia de los fármacos antipsicóticos sobre las mismas sigue siendo controversial [62, 67, 68]. Los estudios disponibles han arrojado resultados inconsistentes y la mayoría de ellos carece de tamaños de muestra significativos, aleatorización y seguimiento prolongado de los sujetos evaluados [69]. Algunas intervenciones psicoterapéuticas, como el entrenamiento en cognición social y la terapia de remediación cognitiva, han mostrado resultados prometedores en la mejora sintomatológica y funcional de los pacientes, aunque existe variabilidad en el enfoque de los tratamientos y en las muestras de sujetos reclutados, lo cual exige interpretar estos resultados con cautela [70, 71].

La cognición social ha sido considerada como un constructo multidimensional conformado por varios dominios fundamentales, incluyendo el procesamiento emocional, la percepción y el conocimiento social, la mentalización y el estilo atribucional [64]. El componente sociocognitivo más estudiado es el procesamiento emocional, que es la capacidad de percibir y usar la información emocional de forma adaptativa. El mismo ha sido frecuentemente evaluado mediante pruebas de reconocimiento y discriminación afectiva en rostros humanos: en las primeras, se expone a los sujetos evaluados a fotografías estáticas o a reproducciones dinámicas de expresiones faciales de diversas emociones primarias y universales como la sorpresa, la alegría, el miedo, la tristeza, la ira o el asco; en las segundas, se presenta uno de estos estímulos junto

con un rostro en un estado neutral, con el fin de efectuar una comparación entre rostros de distinta valencia [61, 72]. Numerosos estudios han demostrado que las personas con esquizofrenia tienen dificultades para reconocer y discriminar estados afectivos en rostros con valencia negativa y positiva, lo que apunta a una alteración global de esta capacidad [73-75]. Distintos metaanálisis de estudios de resonancia magnética funcional han vinculado esta deficiencia a una hipoactivación de áreas del cerebro involucradas en el procesamiento afectivo, como la amígdala, la corteza prefrontal y el hipocampo [61]. Es importante destacar que el déficit en el procesamiento emocional no parece extenderse a la percepción facial de carácter no afectivo, ya que el desempeño de los pacientes es equivalente a la de los controles cuando se les pide discriminar estímulos por sexo o edad [61]. Pese a que se han reportado alteraciones en tareas de emparejamiento de identidad y de reconocimiento de la familiaridad de los rostros, las mismas son atenuadas cuando se administran pruebas con una menor demanda mnésica o atencional [73]. Además de los estudios utilizando rostros, también se ha evaluado la percepción de estados afectivos a través de las propiedades acústicas del habla conocidas como prosodia. Para ello, se han utilizado pruebas que utilizan como estímulo oraciones con y sin entonación emocional, evaluándose el reconocimiento y la discriminación de los estados afectivos expresados [72]. En estos estudios se han reportado déficits comportamentales consistentes en la esquizofrenia, asociados a alteraciones funcionales en regiones como la ínsula, el giro frontal inferior, el giro temporal superior, la corteza auditiva primaria y la corteza prefrontal medial [61, 76, 77].

Diversos estudios han demostrado que los déficits en la cognición social en general [63, 78] y en el procesamiento emocional en particular [79-83] son buenos predictores de las dificultades en el funcionamiento social en pacientes con esquizofrenia, entendido como la capacidad de asumir roles socialmente definidos, ajustarse a las normas y desempeñarse en distintos contextos sociales [84]. En los pacientes, la disfunción social se manifiesta a través de dificultades para establecer y mantener relaciones interpersonales, una participación comunitaria limitada y un desempeño deficiente en entornos estructurados, como el ámbito ocupacional [85-87]. Tanto las alteraciones en el procesamiento emocional como las dificultades en el funcionamiento social se han asociado con el síntoma negativo del retraimiento social o asocialidad [88, 89], definido como el abandono progresivo de los vínculos con pares derivado de una reducción pasiva de la motivación para relacionarse o de una evitación activa de las interacciones sociales [90, 91]. De este modo, la evidencia disponible apunta a una interrelación significativa entre los déficits en la cognición social —incluyendo el procesamiento emocional—, el retraimiento social y las dificultades en el funcionamiento social en distintos ámbitos.

Una vez establecida la relevancia de las alteraciones socioafectivas de la esquizofrenia, resulta necesario interrogar sus bases fisiopatológicas. Para ello, los modelos animales representan una herramienta fundamental, ya que permiten examinar, en condiciones

experimentales controladas, la disfunción de mecanismos neurobiológicos vinculados a dominios patológicos específicos.

Box 2. Características clínicas de la esquizofrenia

Los criterios diagnósticos de la esquizofrenia han experimentado una evolución significativa a lo largo del tiempo. Aunque actualmente no se dispone de un sistema diagnóstico único, se reconocen ciertos signos y síntomas que suelen estar presentes en el trastorno [92]. Se han propuesto diferentes modelos dimensionales para agrupar estos síntomas en clústeres o dominios psicopatológicos, cuya manifestación varía en intensidad y proporción entre pacientes y a lo largo del curso del trastorno, sin ser necesariamente específicos al mismo [93]. Además, estas dimensiones no sólo reflejan variaciones en la presentación clínica, sino que también se vinculan con procesos etiológicos y fisiopatológicos específicos, como marcadores biológicos o endofenotipos [92].

Clásicamente, los síntomas de la esquizofrenia se han organizado en tres dominios psicopatológicos principales: positivo, negativo y cognitivo. Los síntomas positivos reflejan una ruptura con la realidad y se manifiestan como una distorsión o exceso de las funciones mentales normales, incluyendo delirios, alucinaciones y pensamiento desorganizado [94]. Estas manifestaciones suelen ser de inicio agudo y de duración limitada, tienen una buena respuesta al tratamiento farmacológico y se asocian con un buen pronóstico [95]. Los síntomas negativos, en cambio, son desórdenes de omisión, ya que implican una disminución o pérdida de funciones psicológicas normales [94]. Estas alteraciones suelen preceder al primer episodio psicótico, se asocian con un marcado deterioro funcional y, en general, muestran escasa respuesta al tratamiento [96]. Las mismas incluyen la apatía (o falta de interés), la anhedonia (o incapacidad para experimentar placer), el embotamiento afectivo (o disminución en la expresión emocional), la abulia (falta de energía, pérdida de iniciativa e inconstancia en las actividades), la alogia (pobreza del lenguaje) y el retraimiento social [91]. Por último, los síntomas cognitivos comprenden alteraciones en diversos procesos mentales que permiten percibir, interpretar, almacenar y utilizar la información, como la atención, la memoria de trabajo, el aprendizaje y la memoria de tipo verbal y visual, el razonamiento y la resolución de problemas, la velocidad de procesamiento y la cognición social [97]. Los síntomas cognitivos son generalmente estables a lo largo del tiempo, suelen preceder a la aparición de los síntomas psicóticos y constituyen predictores confiables del funcionamiento del paciente en áreas como la vida social, el desempeño laboral y la calidad de vida general [98, 99].

4. Modelos murinos e hipótesis fisiopatológicas de la esquizofrenia

Los modelos animales son herramientas útiles para disecar conductas y estudiar la fisiopatología de diversas enfermedades. Los mismos constituyen manipulaciones experimentales basadas en analogías, mediante las cuales se transfiere información de una fuente a un objetivo a partir de características compartidas entre ambos [100]. Para que un modelo animal resulte útil, debe cumplir al menos con uno de los criterios de validez establecidos en el campo. La validez de apariencia hace referencia a la capacidad del modelo para recrear la fenomenología clínica, es decir, los signos y síntomas detectados en pacientes con una determinada condición [101]. Por su parte, la validez de constructo está relacionada con los mecanismos que subyacen a la producción de la sintomatología observable [102]. También abarca factores ontopatogénicos tempranos —que aumentan la vulnerabilidad a la enfermedad— y factores desencadenantes tardíos —que precipitan su aparición [103]. Por último, la validez predictiva o farmacológica evalúa si el modelo responde a las intervenciones terapéuticas de manera análoga a los pacientes en el contexto clínico [104].

En las últimas décadas, se ha cuestionado la efectividad de los enfoques holísticos que intentan reproducir el síndrome complejo y heterogéneo de la esquizofrenia en un solo modelo animal [105]. Es más, actualmente se considera que este trastorno podría no ser una entidad patológica única sino un conjunto de dominios o clústeres de síntomas (como los positivos, negativos y cognitivos) asociados a etiologías y procesos fisiopatológicos específicos [92]. Además, la intensidad de estos dominios varía entre pacientes, al igual que sus trayectorias durante el desarrollo y su respuesta al tratamiento [93]. Por ello, la adopción de un enfoque reduccionista podría ser una estrategia más realista y eficaz para estudiar los mecanismos neurobiológicos que subyacen a un conjunto determinado de síntomas, como las alteraciones en el comportamiento socioafectivo. La necesidad de realizar estudios preclínicos para identificar posibles puntos de acceso terapéutico en la esquizofrenia se enfrenta a la disponibilidad limitada de modelos animales capaces de reproducir fenotipos sociales con validez traslacional, como las alteraciones en la discriminación de estados afectivos o el retraimiento social. En estos modelos, la sociabilidad suele reducirse a la medición de la aproximación social, la preferencia social o la interacción libre a corto plazo, como se mencionó en el primer apartado de este trabajo [7]. Asimismo, hasta el momento no se ha evaluado el impacto de una manipulación fisiopatológica relevante para la esquizofrenia sobre el comportamiento socioafectivo, pese a la disponibilidad de paradigmas que permiten estudiar esta clase de fenotipos.

Si bien algunos modelos animales pueden representar un trastorno con mayor fidelidad que otros, definir qué constituye un *buen* modelo a menudo desvía la atención del objetivo principal detrás de su desarrollo: poner a prueba distintas hipótesis sobre la fisiopatología del trastorno [106]. Pese a que la etiología de la esquizofrenia ha sido objeto de amplio debate hasta

la actualidad, existe consenso en identificar a la dopamina como un agente central en su fisiopatología. Con base en estudios de farmacología, de neuroimagen y postmortem en humanos, la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia propone un desbalance en la liberación de dopamina a nivel cortical y subcortical. La hiperdopaminergia en la proyección mesoestriatal resulta en una estimulación exacerbada de los receptores de tipo D2 y en el desarrollo de síntomas psicóticos del trastorno —como los delirios y alucinaciones—, mientras que la hipodopaminergia en la proyección mesocortical y mesolímbica resulta en una estimulación disminuida de los receptores de tipo D1 y en síntomas negativos y cognitivos —como el déficit en la memoria de trabajo y en la motivación [107].

Pese a que la hipótesis dopaminérgica sigue siendo el principal marco explicativo en el campo de la esquizofrenia, la limitada eficacia de los fármacos antagonistas de los receptores D2 sobre los síntomas negativos y cognitivos sugiere que otros sistemas de neurotransmisión están implicados en la etiología y fisiopatología del trastorno [108]. Además, se ha propuesto que el desbalance dopaminérgico podría ser consecuencia de un déficit primario a nivel cortical. En condiciones normales, el equilibrio entre la actividad excitatoria e inhibitoria de la corteza es fundamental para el procesamiento eficiente de la información y para sostener las funciones cognitivas superiores [109]. Este balance depende, en gran medida, de las interneuronas GABAérgicas que regulan la actividad de las neuronas piramidales en el microcircuito cortical. En la esquizofrenia, se ha evidenciado una alteración en el control inhibitorio que afecta las oscilaciones y la sincronización neuronal [110, 111]. Esta disfunción podría reducir el control ejercido por las neuronas piramidales de la corteza sobre estructuras subcorticales, promoviendo indirectamente la hiperactividad de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y contribuyendo a la *hiperdopaminergia* observada en el estriado ventral [112, 113].

En este contexto, y con el objetivo de integrar las principales hipótesis fisiopatológicas de la esquizofrenia en un marco experimental unificado, en el siguiente apartado se presentará un modelo animal que reproduce un conjunto de alteraciones neurobiológicas y comportamentales compatibles con el trastorno.

5. Ablación posnatal temprana del receptor NMDA en interneuronas GABAérgicas corticolímbicas

Los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) son canales iónicos activados por ligando que median parte de la señalización glutamatérgica, que constituye el principal sistema excitatorio del cerebro. Estos receptores son complejos tetraméricos compuestos por diferentes combinaciones de siete subunidades: dos subunidades NR1 esenciales u obligatorias, junto con dos subunidades NR2A-D o NR3A-B [114]. Estudios farmacológicos, genéticos y comportamentales dan sustento a la hipótesis glutamatérgica de la esquizofrenia, la cual sostiene

que la hipofunción del receptor NMDA constituye el mecanismo fisiopatológico que subyace a la sintomatología del trastorno [115]. Los fármacos que bloquean los receptores NMDA de forma no competitiva (como la fenciclidina y la ketamina) poseen propiedades psicomiméticas a dosis subanestésicas, ya que inducen un estado transitorio de psicosis en individuos sanos y restituyen o exacerban los síntomas en pacientes diagnosticados con esquizofrenia [116-118]. Asimismo, se ha postulado a los receptores NMDA como un componente clave en la vulnerabilidad genética a la esquizofrenia, ya que varios genes candidatos (como la neuregulina 1 y la disbindina) son capaces de modular la transducción de señales mediada por este tipo de receptor [119, 120]. Finalmente, la administración de antagonistas no competitivos del receptor NMDA produce una serie de fenotipos comportamentales en roedores que emulan los síntomas positivos, negativos y cognitivos del trastorno [121], observados también en diversas líneas de ratones que portan mutaciones en los genes que codifican para distintas subunidades del receptor [122].

En las últimas décadas se ha propuesto que estos fenotipos no derivarían de una hipofunción generalizada del receptor NMDA en el sistema nervioso central, sino focalizada en un tipo celular específico: las interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebral y del sistema límbico, especialmente aquellas que expresan la proteína fijadora de calcio parvalbúmina (PV) [123, 124]. A nivel electrofisiológico, las mismas se clasifican como interneuronas de disparo rápido, dado su patrón de actividad de alta frecuencia caracterizado por potenciales de acción cortos y de baja acomodación [125]. Durante el desarrollo de la corteza en el período posnatal temprano, las interneuronas PV+ atraviesan un importante proceso de maduración, acompañado por un aumento en los niveles de ARN mensajero y de la proteína parvalbúmina [126], lo cual se asocia con una mayor actividad de estas neuronas [127]. Paralelamente, se produce un incremento en los niveles de la enzima limitante en la síntesis de GABA, la glutamato descarboxilasa 67 (GAD67). Durante la adolescencia, los contactos excitatorios sobre las interneuronas PV+ experimentan un proceso de podado o refinamiento sináptico, que permite optimizar el reclutamiento de las interneuronas mediante los elementos del circuito local maduro en la vida adulta [128, 129]. Dentro del mismo, las interneuronas PV+ ejercen un control inhibitorio directo sobre las neuronas piramidales —y, por lo tanto, sobre las eferencias corticales— [125] y son necesarias para el mantenimiento del balance excitación/inhibición en la corteza [130]. Además, esta subpoblación de neuronas está involucrada en la generación y mantenimiento de ritmos oscilatorios locales, como los de frecuencia gamma, que han sido relacionados con funciones cognitivas como la memoria de trabajo [111, 131, 132]. Se ha postulado que la maduración patológica de estas interneuronas durante períodos críticos de vulnerabilidad (como la vida posnatal temprana o la adolescencia) podría conducir a un desarrollo anormal de los microcircuitos corticales [126, 133]. Esto alteraría el balance excitación/inhibición y la integración de la información, lo que, en última instancia, produciría los déficits vinculados a la esquizofrenia, como las alteraciones cognitivas [134-136].

Tres líneas de evidencia respaldan la hipótesis de que las interneuronas GABAérgicas de las regiones corticolímbicas son el blanco principal de la hipofunción del receptor NMDA en la esquizofrenia. En primer lugar, el tratamiento agudo y sistémico a dosis sub-anestésicas con antagonistas de estos receptores induce un aumento exacerbado en la actividad de las neuronas piramidales en la corteza cerebral de roedores [137], lo que coincide con los resultados de estudios de neuroimagen en humanos, que muestran una activación cortical generalizada tras un tratamiento farmacológico equivalente [138, 139]. En segundo lugar, se ha reportado que las interneuronas GABAérgicas son más sensibles que las neuronas piramidales a la administración de estos antagonistas de los receptores NMDA [140, 141]. Esto sugiere que la hiperexcitabilidad cortical mencionada podría derivar de un déficit selectivo en el control inhibitorio que ejercen las interneuronas sobre las neuronas piramidales glutamatérgicas, generando alteraciones significativas en la dinámica funcional de los circuitos neuronales donde convergen ambos tipos celulares [123, 142]. En tercer lugar, la exposición crónica a fármacos antagonistas del receptor NMDA durante el desarrollo posnatal temprano en roedores reduce la expresión de GAD67 y PV en las interneuronas GABAérgicas de la corteza [145], lo que sugiere una relación directa entre la hipofunción del receptor y la disfunción de este tipo neuronal. En consonancia con estos hallazgos, estudios *post mortem* en individuos con esquizofrenia han reportado una disminución en la expresión de ambas proteínas en el mismo sustrato neuronal [143, 144].

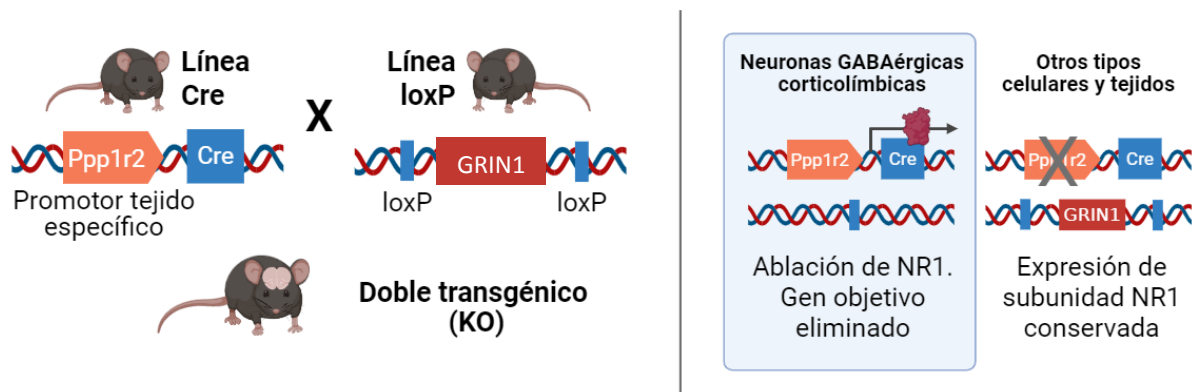
Nuestro equipo desarrolló previamente un modelo murino que presenta un espectro de alteraciones neurobioquímicas, farmacológicas, electrofisiológicas y comportamentales compatibles con la esquizofrenia humana [109, 145-150]. Este modelo se basa en un ratón *knockout* condicional generado mediante la cruce de dos líneas transgénicas (ver Box 3). Por un lado, la línea Ppp1r2-Cre, en la que la expresión de la enzima Cre recombinasa está regulada por el promotor Ppp1r2 (del inglés *protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2*), que se expresa endógenamente en neuronas de la corteza y el hipocampo. Por otro lado, una línea flox, en la que el gen *GRIN1*, responsable de codificar la subunidad elemental NR1 del receptor NMDA, está flanqueado por sitios loxP. En el ratón *Grin1* KO, la ablación del receptor NMDA se restringe específicamente al 40-50% de las interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebral y el hipocampo, positivas para la proteína PV en el 75-95% de los casos, sin afectar su número [145]. Esta delección no ocurre en otras regiones del sistema nervioso, como la amígdala y el estriado, ni en otros tipos celulares, como las neuronas piramidales. Asimismo, la ablación del receptor NMDA está limitada temporalmente a un período del desarrollo posnatal temprano que abarca desde el día 7 hasta el 28 aproximadamente, cuando la recombinación alcanza su nivel máximo y se mantiene estable hasta los 5 o 6 meses de edad [145]. Como resultado, la ausencia de receptores NMDA funcionales impacta significativamente en el desarrollo normal de los circuitos corticales. En el ratón *Grin1* KO, se ha reportado una expresión reducida de GAD67 y PV, una desinhibición de las neuronas corticales excitatorias y una reducción de la

sincronización neuronal [145]. Asimismo, se han observado fenotipos comportamentales relevantes para la esquizofrenia —como déficits en la memoria de trabajo y en la inhibición del reflejo de sobresalto inducida por un prepulso— junto a alteraciones comportamentales con menor validez de apariencia para el trastorno —como hiperlocomoción inducida por la novedad y ansiedad elevada [145]. El conjunto de los fenotipos mencionados fue detectado sólo en ratones adultos y no en camadas independientes de animales juveniles, a pesar de que la recombinación permanece estable desde el día posnatal 28. Este hallazgo es consistente con la aparición de los síntomas de la esquizofrenia en la adultez temprana, lo que fortalece la validez del modelo. Finalmente, cabe destacar que este último posee un marcado componente del neurodesarrollo, ya que no se evidencia ninguno de los fenotipos mencionados en una línea transgénica alternativa en la que la ablación del receptor NMDA ocurre en la adultez [145].

El uso del modelo *Grin1* KO para investigar la fisiopatología de las alteraciones socioafectivas en la esquizofrenia se basa en tres líneas principales de evidencia. En primer lugar, nuestro equipo ha identificado previamente una serie de indicadores preliminares de sociabilidad alterada en este mutante. En particular, hemos observado anomalías en la conducta de apareamiento, en la construcción de nidos y en la memoria social a corto plazo [145]. Estos fenotipos podrían ser manifestaciones primarias o el resultado de un déficit motivacional o emocional que afecte la respuesta a estímulos sociales. Estudios que utilizaron modelos genéticos alternativos también han vinculado la ablación de los receptores NMDA en interneuronas GABAérgicas positivas para parvalbúmina con alteraciones sociales, como déficits en la preferencia por un congénere frente a un objeto inanimado [151-154]. En segundo lugar, una de las regiones cerebrales afectadas en nuestro mutante es la corteza prefrontal medial [109, 145, 146, 149]. Esta estructura no sólo desempeña un papel clave en la fisiopatología de la esquizofrenia [155-157], sino que también está implicada en distintos aspectos de la cognición social en humanos, como el procesamiento emocional y la mentalización [61]. Como se ha mencionado previamente, la corteza prefrontal medial también ha sido involucrada en la discriminación de estados afectivos en roedores [12, 23, 28, 29]. Asimismo, cabe destacar que esta estructura ha sido propuesta como un regulador fundamental de la actividad del sistema dopaminérgico a través de sus proyecciones hacia la VTA [155]. Por último y en relación a lo antedicho, nuestro mutante presenta un desbalance dopaminérgico que emerge de manera espontánea y secundaria a la manipulación cortical. Este desequilibrio se caracteriza por una hipersensibilidad estriatal y una hiposensibilidad de la corteza prefrontal medial a la liberación de dopamina inducida por anfetaminas [147]. Este hallazgo es relevante ya que, como se ha mencionado previamente, el sistema dopaminérgico ha sido involucrado en diversos aspectos del comportamiento social y podría cumplir un rol en la discriminación de estados emocionales en pares, al procesar la saliencia y la valencia de distintos estímulos.

Box 3. Modelo murino de ablación posnatal temprana del receptor NMDA en interneuronas GABAérgicas corticolímbicas

En este trabajo utilizamos una estrategia de *knockout* condicional basada en el sistema Cre/lox-P. *Izquierda*: Para generar la línea doble transgénica evaluada, cruzamos ratones que expresan la recombinasa Cre en un subconjunto de interneuronas inhibitorias de la corteza y el hipocampo con ratones portadores de una versión *floxeada* del gen *GRIN1*, que codifica para la subunidad NR1 del receptor NMDA. *Derecha*: La ablación del receptor está espacialmente restringida a interneuronas GABAérgicas de regiones corticolímbicas, sin afectar a otros tipos celulares ni tejidos, y se limita temporalmente a una ventana temprana del desarrollo.



OBJETIVOS

El **objetivo general** del presente trabajo es interrogar las bases neurobiológicas del comportamiento socioafectivo en condiciones normales y patológicas. Para ello, hemos planteado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Examinar la contribución del sistema dopaminérgico al comportamiento socioafectivo normal. A tal efecto, utilizaremos una aproximación quimiogenética para inhibir la actividad dopaminérgica de la VTA de ratones DAT-Cre durante la realización de una batería de pruebas comportamentales que evalúan la discriminación de estados afectivos, la preferencia social y el reconocimiento social. Dado que el sistema dopaminérgico central participa en la regulación de diversos comportamientos sociales, y que la VTA desempeña un rol clave en el procesamiento de la valencia de distintos estímulos, nuestra **hipótesis de trabajo** es que las neuronas dopaminérgicas de esta región son necesarias para llevar a cabo capacidades sociales elementales —como discriminar un congénere novedoso de uno familiar y de un objeto inanimado—, así como para discriminar estados afectivos de distinta valencia expresados en el contexto de una interacción social.

2. Evaluar el impacto de una manipulación fisiopatológica relevante para la esquizofrenia sobre comportamientos socioafectivos con validez traslacional. Para ello, estudiaremos la discriminación de estados afectivos, el funcionamiento social y la interacción prolongada con congéneres en el ratón mutante *Grin1* KO, un modelo murino que ha exhibido indicadores preliminares de disfunción social y alteraciones dopaminérgicas espontáneas y secundarias a la manipulación genética de origen. Nuestra **hipótesis de trabajo** es que la ablación posnatal temprana del receptor NMDA en interneuronas GABAérgicas corticolímbicas producirá una serie de fenotipos conductuales aberrantes y relevantes para la esquizofrenia.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Consideraciones éticas

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (RS2964, RS783/15 y addenda) y se llevaron a cabo de acuerdo con las regulaciones gubernamentales (SENASA RS617/2002, Argentina). Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento.

2. Animales

Con el fin de evaluar el rol de las neuronas dopaminérgicas de la VTA sobre el comportamiento socioafectivo, se utilizaron ratones de la línea DAT^{IRESc^{re}} (#006660, Jackson Laboratory, Estados Unidos). En la misma, la recombinasa se expresa bajo el control transcripcional del transportador de dopamina (DAT) [158], cuya expresión se limita a las neuronas dopaminérgicas de la sustancia nigra y de la VTA, como fue descrito previamente [159, 160]. Estos animales fueron retrocruzados con ratones de la cepa pura C57Bl6/J por más de seis generaciones, homogeneizando el *background* genético en más del 98.4%. Los animales experimentales se obtuvieron mediante la cruce de ratones DAT^{IRESc^{re}/+} con DAT^{+/+}, utilizándose sólo los ratones positivos para Cre. La evaluación comportamental de estos animales se llevó a cabo entre los 3 y 5 meses de edad.

Con el fin de evaluar el rol del receptor NMDA en interneuronas corticolímbicas sobre el comportamiento socioafectivo, se utilizó un ratón doble transgénico como modelo experimental, obtenido mediante la cruce de dos líneas con un *background* genético C57BL/6N [145]. Por un lado, la línea Ppp1r2-cre (#012686, Jackson Laboratory, Estados Unidos), en la que el promotor Ppp1r2 dirige la expresión de la recombinasa Cre a interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebral y el hipocampo. Por otro, la línea *Grin1*^{loxP/loxP} (#036352, Jackson Laboratory, Estados Unidos), en la cual el sitio codificante de la subunidad NR1 del receptor NMDA (esencial para su funcionamiento) está flanqueado por sitios loxP. Los animales experimentales utilizados en este objetivo se obtuvieron mediante la cruce de ratones Ppp1r2-cre^{+/-}; *Grin1*^{loxP/loxP} con Ppp1r2-cre^{-/-}; *Grin1*^{loxP/loxP} y conformaron dos grupos experimentales: por una parte, los ratones Ppp1r2-cre^{+/-}; *Grin1*^{loxP/loxP} (mutantes, *knockouts*, KO o *Grin1* KO), sin receptores NMDA funcionales dada la ablación de ambos alelos NR1; por otra, sus hermanos Ppp1r2-cre^{-/-}; *Grin1*^{loxP/loxP} (controles o CTRL), con receptores NMDA intactos dada la ausencia de expresión de Cre. Es importante destacar que las alteraciones fenotípicas relevantes para la esquizofrenia emergen en la vida adulta de los mutantes, siendo sutiles o inexistentes durante el período del

desarrollo juvenil y adolescente [124, 145, 150]. Por lo tanto, la evaluación comportamental se llevó a cabo en animales de entre tres y cinco meses de edad.

La puesta a punto de las pruebas de preferencia y reconocimiento social, discriminación afectiva e interacción social prolongada se realizó con animales C57BL/6N *wild-type*. En todas las pruebas comportamentales que requirieron el uso de demostradores como estímulos sociales, se utilizaron congéneres C57BL/6N *wild-type* agrupados de edad y sexo equivalentes a los de los animales evaluados, a excepción del test de interacción diádica libre, en el que se utilizaron demostradores juveniles con el fin de prevenir comportamientos agresivos.

3. Genotipado

En la línea DAT^{IRESc^{re}}, las muestras de tejido se extrajeron de las orejas de los animales utilizando un sacabocados al momento del destete. El ADN de las biopsias fue obtenido utilizando un buffer de lisis alcalina de hidróxido de sodio (NaOH) 25 mM combinado con una incubación a alta temperatura (98°C) y un buffer de neutralización de Tris-HCl pH 7.4 40mM. En este caso, se utilizaron los *primers* para Cre2 y Cre6 durante la PCR, realizada por personal técnico especializado.

En los animales Ppp1r2-cre; *Grin1*^{loxP/loxP}, se extrajo una muestra pequeña de tejido de la punta de la cola al momento del destete. Las biopsias fueron procesadas utilizando un protocolo de purificación de ADN, que incluyó la digestión del tejido con Proteinasa K y la posterior precipitación con isopropanol. El ADN obtenido fue amplificado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando *primers* específicos para Cre y *Grin1* floxeado. El producto resultante fue separado en geles de agarosa utilizando procedimientos estándar, y el genotipo de las crías se determinó con base en el patrón de bandas observado en las muestras.

4. Mantenimiento de los animales

Todos los animales fueron alojados en el bioterio del Instituto de Fisiología y Biofísica Bernardo Houssay (IFIBIO, UBA-CONICET), bajo la supervisión y cuidado de personal especializado. Las jaulas se mantuvieron bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (21-24°C), con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas (luces encendidas a las 7:00 hs) y acceso *ad libitum* a alimento y agua. Los animales fueron alojados en la misma jaula que la madre desde su nacimiento hasta el destete, que ocurrió alrededor del día posnatal 21. Los animales destetados de la misma camada fueron agrupados en jaulas de 2 a 5 ratones del mismo sexo y genotipo variado. Los ratones DAT^{IRESc^{re}} fueron alojados en parejas separadas por una partición de acrílico luego de la cirugía estereotáxica y hasta el fin de la evaluación comportamental, que permitía la comunicación visual, auditiva y olfativa a fin de minimizar el impacto del aislamiento social. Por su parte, los ratones Ppp1r2-cre; *Grin1*^{loxP/loxP} fueron

trasladados a jaulas nuevas dos semanas antes de la evaluación comportamental, siendo alojados en parejas separadas por la partición mencionada. Se hizo el mayor esfuerzo por representar equitativamente a ambos grupos experimentales (CTRL y KO) en cada jaula. Las cohortes evaluadas en el test del tubo se alojaron en grupos de cuatro ratones por jaula desde el destete hasta el final de las pruebas de comportamiento. Para la prueba del residente-intruso, todos los residentes fueron alojados individualmente durante al menos una semana para fomentar la territorialidad.

5. Evaluación del comportamiento

Todas las pruebas se llevaron a cabo de 9 a 16 hs durante la fase de luz, a excepción del test de interacción social prolongada (ver apartado correspondiente para más detalles). Los ratones evaluados fueron alojados en una sala de holding durante al menos una hora antes de la evaluación del comportamiento. Todo el equipo utilizado fue limpiado con etanol al 10%, secado entre animales y desinfectado al final de cada día. Los experimentos fueron realizados y analizados por un investigador ciego al genotipo en al menos dos cohortes independientes de animales.

5.1. Pruebas realizadas en la cámara de sociabilidad

5.1.1. Diseño general

Se utilizó una cámara comportamental de acrílico desarrollada por nuestro equipo (Figura M1), similar a un *open field* (30 x 30 x 30 cm) y en cuyas paredes pueden adjuntarse de forma simultánea hasta cuatro módulos de acrílico (8 x 10 x 10 cm). Los mismos permiten la presentación de estímulos sociales o inanimados, que pueden ser explorados desde la arena central a través de ventanas (8 x 5 cm) ubicadas en cada pared de la cámara para permitir el intercambio de información auditiva, visual y olfativa. La malla de alambre de cada módulo previene comportamientos de tipo agresivo entre los animales que interactúan. La cámara de sociabilidad fue ubicada dentro de una caja de aislamiento acústico, proporcionando un ambiente silencioso (65 db) y uniformemente iluminado (20 lux). Se utilizó una cámara de video (Cam H7, OpenMV, Estados Unidos) en posición cenital para grabar las sesiones de comportamiento. Los videos resultantes fueron analizados posteriormente mediante el software AnyMaze (Stoelting Co., Estados Unidos).

Los ratones evaluados fueron habituados a la cámara de sociabilidad en sesiones de 20 minutos durante tres días consecutivos. El día de cada prueba, fueron colocados en la arena central y se les permitió interactuar con los estímulos presentados dentro de los módulos, cuya ubicación relativa fue aleatorizada entre animales. Para evaluar el comportamiento de

exploración de los estímulos, se definieron zonas virtuales de 10 x 5 cm adyacentes a cada una de las ventanas de malla de alambre y se monitoreó automáticamente la posición de la cabeza del ratón en la arena central. El tamaño de las zonas virtuales fue determinado con base en la actividad exploratoria de animales *wild type* (ver mapas de calor de la Figura M2). Las variables analizadas incluyeron el tiempo que la cabeza del ratón pasó en cada zona, el número de entradas a cada zona, la duración promedio de las visitas y la distancia total recorrida.

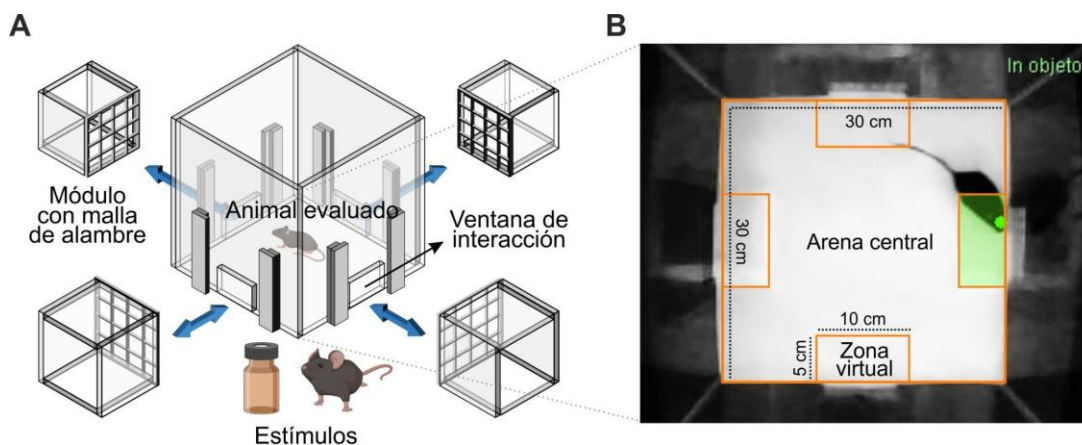


Figura M1. Cámara de sociabilidad. **A.** Esquema de los componentes del aparato comportamental, incluyendo la estructura central que forma la arena de testeo, los módulos acoplables y los diferentes estímulos que se presentan al animal evaluado (sociales e inanimados). **B.** Vista cenital de la arena central durante un ensayo comportamental. La imagen muestra el seguimiento de la cabeza del ratón evaluado (círculo verde) dentro de la zona virtual correspondiente a un objeto (rectángulo verde). Además, se observan las ventanas con malla de alambre adyacentes a cada zona virtual, por las cuales el ratón evaluado puede explorar los estímulos presentados. El trazado de la arena central y de las zonas virtuales se realizó con el programa AnyMaze.

5.1.2. Preferencia y reconocimiento social

Con el fin de evaluar diferentes aspectos de la sociabilidad básica, desarrollamos una adaptación del test de tres cámaras, como fue descrito previamente [161]. En la fase de preferencia social de este paradigma (Figura M2 A-D), el animal evaluado fue expuesto simultáneamente a dos estímulos durante 10 minutos: un demostrador (habitado previamente a su módulo en tres sesiones de diez minutos) y un objeto inanimado (frasco marrón de boticario de tamaño mediano). Se calculó un índice de preferencia (IP) como la resta entre el tiempo en la zona del demostrador y el tiempo en la zona del objeto, sobre la sumatoria del tiempo en ambas zonas.

Tras completar la primera fase del paradigma, el ratón evaluado fue retirado de la cámara y alojado brevemente en una jaula de *holding* durante un intervalo de 5 minutos. Un módulo con un demostrador novedoso (también habituado a su módulo) fue adjuntado a la cámara de

sociabilidad junto con los otros dos ya presentados, conteniendo al demostrador ahora familiar y al objeto. Posteriormente, el ratón evaluado fue reintroducido en la arena central para la fase de reconocimiento social (Figura M2 E-H), durante la cual los tres estímulos pudieron ser explorados por 10 minutos adicionales. En este caso, el IP se calculó como la resta entre el tiempo en la zona del demostrador novedoso y el tiempo en la zona del demostrador familiar, sobre la sumatoria del tiempo en ambas zonas.

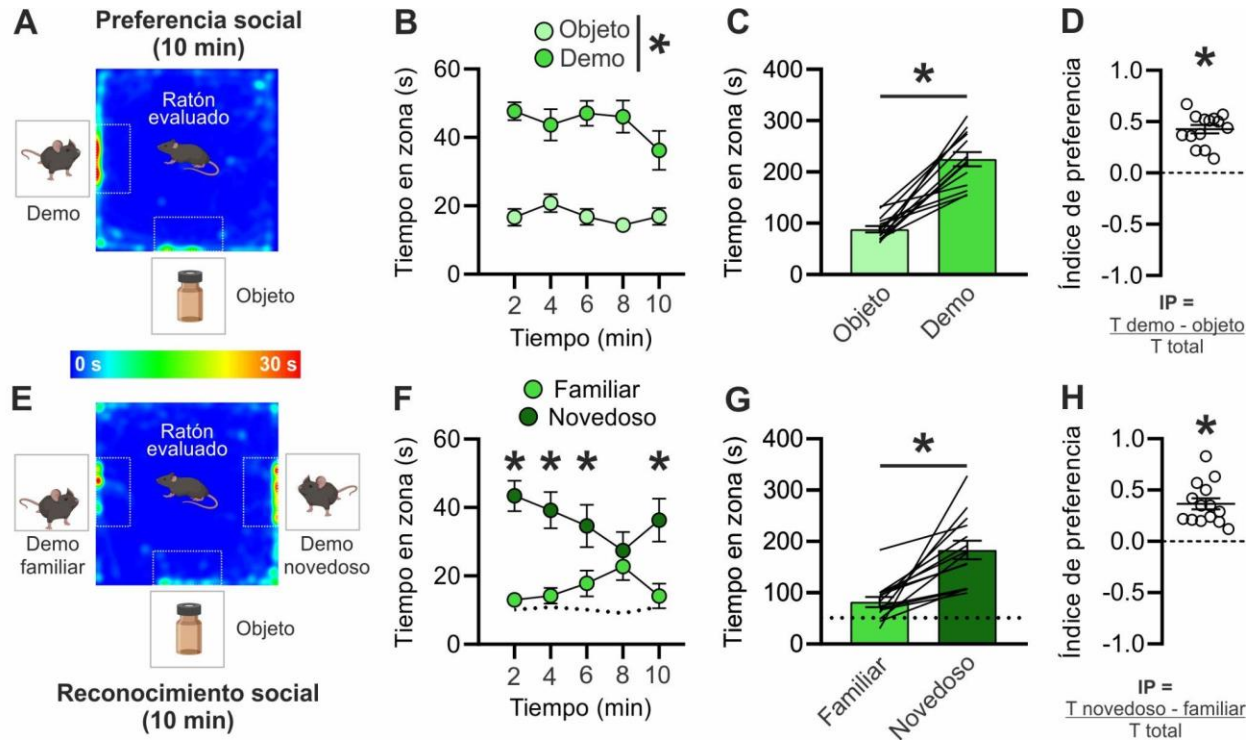


Figura M2. Adaptación del test de tres cámaras. **(A-D)** Test de preferencia social. **A.** Mapa de calor de la posición de la cabeza de un ratón C57Bl/6 *wild type* representativo durante toda la sesión, donde el azul y el rojo indican los tiempos de exploración más bajos y más altos, respectivamente. Las zonas virtuales fueron representadas con líneas punteadas. **B.** Tiempos de exploración del demostrador y el objeto durante la prueba de 10 minutos (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{4,104} = 1.512$, $p = 0.204$; factor tiempo: $F_{4,104} = 1.118$, $p = 0.352$; * factor estímulo: $F_{1,26} = 88.39$, $p \leq 0.001$). **C.** Los animales mostraron un sesgo de exploración hacia el demostrador con respecto al objeto durante los 10 minutos de la prueba (prueba de t pareada: $t_{13} = 8.602$, * $p \leq 0.001$). **D.** El índice de preferencia fue significativamente diferente al nivel de chance, representado con la línea punteada (prueba de t de una muestra: $t_{13} = 10.45$, * $p \leq 0.001$). **(E-H)** Test de reconocimiento social. **E.** Mapa de calor de la posición de la cabeza de un ratón C57Bl/6 *wild type* representativo durante toda la sesión, donde el azul y el rojo indican los tiempos de exploración más bajos y más altos, respectivamente. Las zonas virtuales fueron representadas con líneas punteadas. **F.** Tiempos de exploración del demostrador familiar y novedoso durante la prueba de 10 minutos (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{4,104} = 3.134$, $p = 0.018$; prueba *post hoc* de Bonferroni: * $p \leq 0.05$ vs. demostrador familiar). **G.** Los animales mostraron un sesgo de exploración hacia el demostrador novedoso con respecto al familiar durante los 10 minutos de la prueba (test de

Wilcoxon: $W = 105$, * $p \leq 0.001$). **H.** El índice de preferencia fue significativamente diferente al nivel de chance, representado con la línea punteada (prueba de t de una muestra: $t_{13} = 6.749$, * $p \leq 0.001$). Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM.

5.1.3. Discriminación de estados afectivos

A fin de evaluar la capacidad socioafectiva de los animales, pusimos a punto dos versiones de una prueba comportamental en la que se inducen estados afectivos de distinta valencia a través de manipulaciones experimentales en los demostradores. Esta prueba sigue la lógica de los paradigmas de preferencia socioafectiva o de discriminación de estados afectivos desarrollados previamente [12, 22, 162].

Antes de la versión apetitiva de esta prueba (Figura M3 izquierda), los demostradores fueron habituados durante tres días consecutivos. En cada sesión, los animales asignados al grupo de demostradores recompensados permanecieron durante 10 minutos dentro de un módulo adjunto a la cámara de sociabilidad, imitando el procedimiento seguido durante el testeo. Inmediatamente después, se les dio acceso libre a leche condensada (Nestlé, Argentina) en una tapa de un tubo *falcon* durante 10 minutos adicionales y dentro de su módulo, a fin de que asociaran este contexto a una experiencia gratificante. Este tipo de demostrador había sido preexpuesto al reforzador dentro de su jaula antes del inicio de las sesiones de habituación, con el objetivo de mitigar la neofobia. La leche condensada es altamente apetecible y no se requiere restricción alimentaria previa para favorecer su consumo. Pese a ello, los demostradores recompensados fueron filmados durante los 10 minutos de acceso a la leche para corroborar su consumo en cada sesión de habituación. Sólo los ratones que consumieron el reforzador como mínimo tres veces en la última sesión fueron utilizados posteriormente. Por su parte, los animales asignados al grupo de demostradores neutrales siguieron el mismo procedimiento de habituación pero sin acceder al reforzador, permaneciendo inalterados en sus módulos durante 20 minutos. Al día siguiente de la última sesión de habituación, se llevó a cabo la prueba de discriminación afectiva, en la cual al ratón evaluado se le presentó en simultáneo los dos tipos de demostradores (neutrales y recompensados) durante 10 minutos. Cabe destacar que los demostradores recompensados accedieron a la leche condensada por última vez el día previo a la prueba, a fin de evitar un sesgo de exploración durante el testeo derivado de las claves olfativas provenientes de la recompensa.

En la versión aversiva del paradigma de discriminación afectiva (Figura M3 derecha), los animales asignados al grupo de demostradores socialmente derrotados fueron transportados a una sala auxiliar e introducidos como intrusos en la jaula de un ratón residente C57BL/6 agresivo durante 10 minutos. Este procedimiento fue repetido inmediatamente utilizando un segundo residente de otra jaula por 10 minutos adicionales. Para fomentar la territorialidad, los residentes habían sido aislados durante una semana sin cambio de viruta, y se realizó un

screening para seleccionar aquellos animales que mostraron conductas agresivas de forma confiable. Cabe destacar que sólo los intrusos que fueron atacados por ambos residentes fueron utilizados posteriormente. Tras la manipulación de carácter aversivo, estos demostradores fueron trasladados a la sala de testeo, donde los demostradores neutrales habían permanecido inalterados en sus jaulas de origen durante el mismo lapso de tiempo. Acto seguido, al ratón evaluado se le presentó en simultáneo los dos tipos de demostradores (neutrales y socialmente derrotados) durante los 10 minutos de testeo.

Para las dos versiones del paradigma de discriminación afectiva, se utilizaron demostradores novedosos agrupados por tipo (neutrales, recompensados y socialmente derrotados) y una vez por día como máximo. Las jaulas de demostradores fueron asignadas de forma aleatoria a los distintos tipos de manipulación. Para ambas versiones de la prueba, se calculó un IP como la resta entre el tiempo en la zona del demostrador manipulado y el tiempo en la zona del demostrador neutral, sobre la sumatoria del tiempo en ambas zonas.

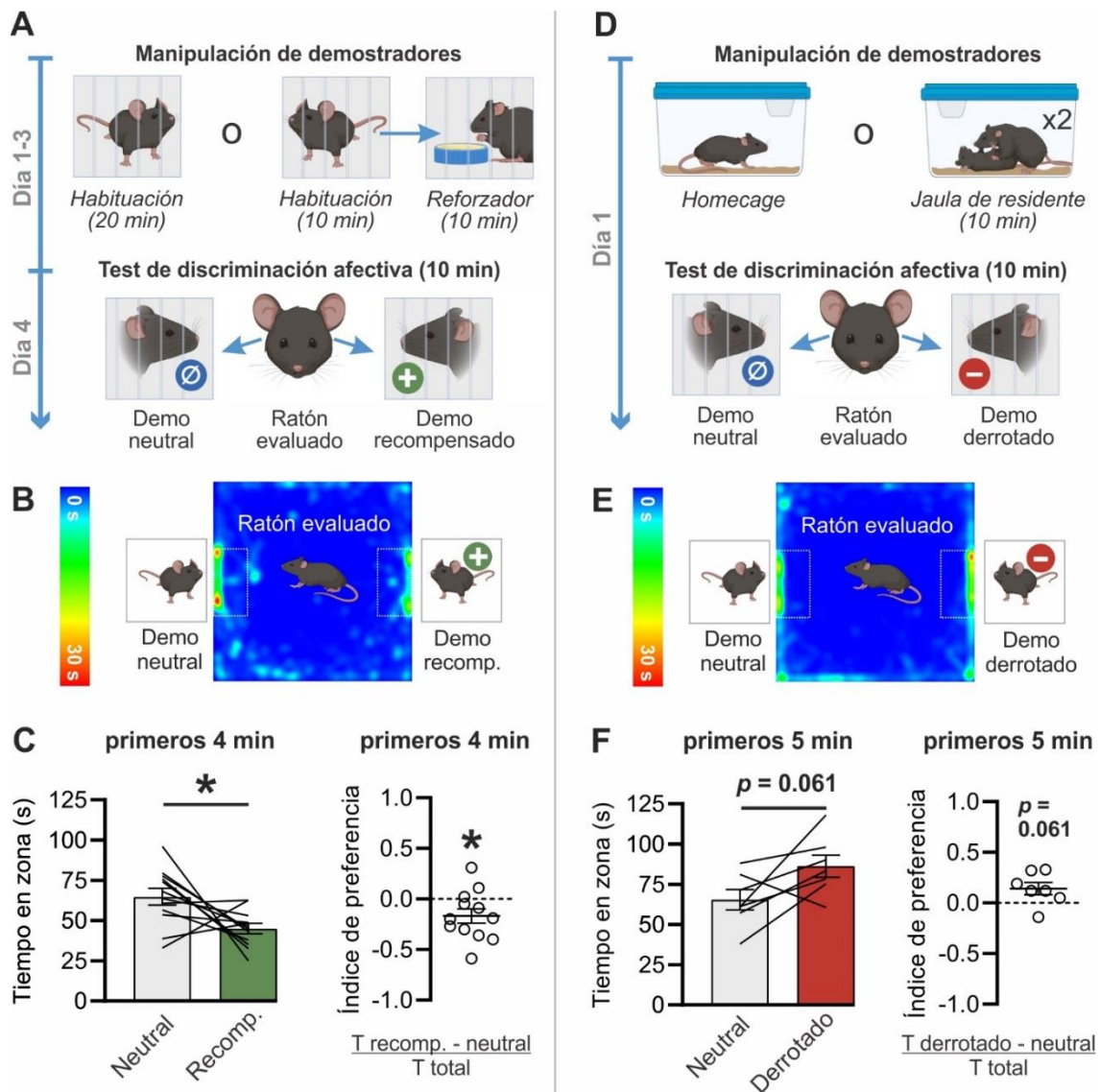


Figura M3. Validación del test de discriminación afectiva. **(A-C)** Versión apetitiva del paradigma (n = 12). **A.** El ratón evaluado pudo interactuar durante 10 minutos con un congénere habituado previamente a su módulo y uno preexpuesto a un reforzador en su módulo durante tres días consecutivos antes de la prueba. **B.** Mapa de calor de la posición de la cabeza de un ratón C57Bl/6 *wild type* representativo durante toda la sesión, donde el azul y el rojo indican los tiempos de exploración más bajos y más altos, respectivamente. Las zonas virtuales fueron representadas con líneas punteadas. **C.** *(Izquierda)* Los animales mostraron un sesgo de exploración hacia el demostrador neutral con respecto al recompensado durante los primeros 4 minutos del test (prueba de t pareada: $t_{11} = 2.526$, * $p = 0.028$). *(Derecha)* El índice de preferencia fue significativamente diferente al nivel de chance, representado con la línea punteada (prueba de t de una muestra: $t_{11} = 2.370$, $p = 0.037$). **(D-F)** Versión aversiva del paradigma (n = 7). **D.** El ratón evaluado pudo interactuar durante 10 minutos con un congénere inalterado en su jaula y uno preexpuesto a episodios de derrota social en las jaulas de residentes agresivos. **E.** Mapa de calor de la posición de la cabeza de un ratón C57Bl/6 *wild type* representativo durante toda la sesión, donde el azul y el rojo indican los tiempos de exploración más bajos y más altos, respectivamente. Las zonas virtuales fueron representadas con líneas punteadas. **F.** *(Izquierda)* Los animales mostraron un sesgo de exploración hacia el demostrador derrotado con respecto al neutral durante los primeros 5 minutos del test (prueba de t pareada: $t_6 = 2.299$, $p = 0.061$). *(Derecha)* El índice de preferencia fue cercano al nivel de significancia (prueba de t de una muestra: $t_6 = 2.304$, $p = 0.061$). Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM.

5.1.4. Interacción social libre

Esta prueba se realizó en los ratones *Grin1* KO como fue descrito previamente [163]. A diferencia de los tests comportamentales mencionados con anterioridad, aquí sólo se utilizó la arena central de la cámara de sociabilidad, con paneles de acrílico bloqueando las ventanas de exploración de cada pared del aparato. El día del test, el ratón evaluado fue colocado mirando hacia la esquina más alejada de un demostrador novedoso previamente colocado en la cámara. Luego, se permitió que la díada interactuara libremente durante 5 minutos antes de ser retirada de la cámara. Se midió manualmente la latencia a la primera interacción social y la exploración de la cabeza, el cuerpo y la zona anogenital del demostrador cada vez que el hocico del ratón evaluado se aproximó a una distancia de 2 centímetros o menos.

5.2. Interacción social prolongada

Los ratones *Grin1* KO fueron evaluados en la prueba de sociabilidad de ocho brazos (*Eight-Arm Sociality Task* o EAST) desarrollada por nuestro equipo (Figura M4). En la misma, se utilizó un laberinto radial de acrílico opaco ubicado a la altura del suelo y compuesto por un centro octogonal (14 cm de lado) con ocho brazos independientes (50 x 9 x 10 cm), cubiertos por un techo de malla de alambre. Una hora antes de la prueba, cuatro demostradores adultos desconocidos de la misma jaula fueron habituados al centro del laberinto. Además, un módulo de acrílico conteniendo un objeto inanimado (frasco marrón de boticario de tamaño mediano) fue adjuntado al extremo distal de cada brazo. Posteriormente, los ratones evaluados fueron

colocados individualmente en cada brazo del aparato, alternando genotipos en brazos consecutivos (CTRL: n = 4, KO: n = 4), y se les permitió explorar los estímulos sociales e inanimados a través de las ventanas de malla de alambre ubicadas en los extremos de cada brazo. Todos los animales recibieron alimento y agua durante la duración del experimento a través de un comedero ubicado en el centro de cada brazo y del centro octogonal, y también se les proporcionó viruta fresca antes del inicio de la prueba. El EAST abarcó la última hora de la fase de luz (18:00 a 19:00 hs), las doce horas de la fase oscura (19:00 a 7:00 hs), y la primera hora de luz del siguiente ciclo (7:00 a 8:00 hs). El cuarto de conducta se mantuvo bajo luz blanca (70-80 lux) o luz infrarroja, según la fase correspondiente del ciclo luz-oscuridad. Durante las 14 horas del experimento, se utilizó una cámara de video IR (Microsoft Eye Camera) y el software Any-Maze para registrar y monitorear en simultáneo la posición de los ocho ratones evaluados. Para evaluar el comportamiento exploratorio, se delimitaron dos zonas virtuales correspondientes al objeto y a los demostradores, abarcando cada una el ancho de los brazos y extendiéndose 5 cm desde la ventana de malla de alambre. El tamaño de las zonas virtuales fue determinado con base en la actividad exploratoria de los animales durante la puesta a punto del paradigma (ver mapas de calor de la Figura M4).

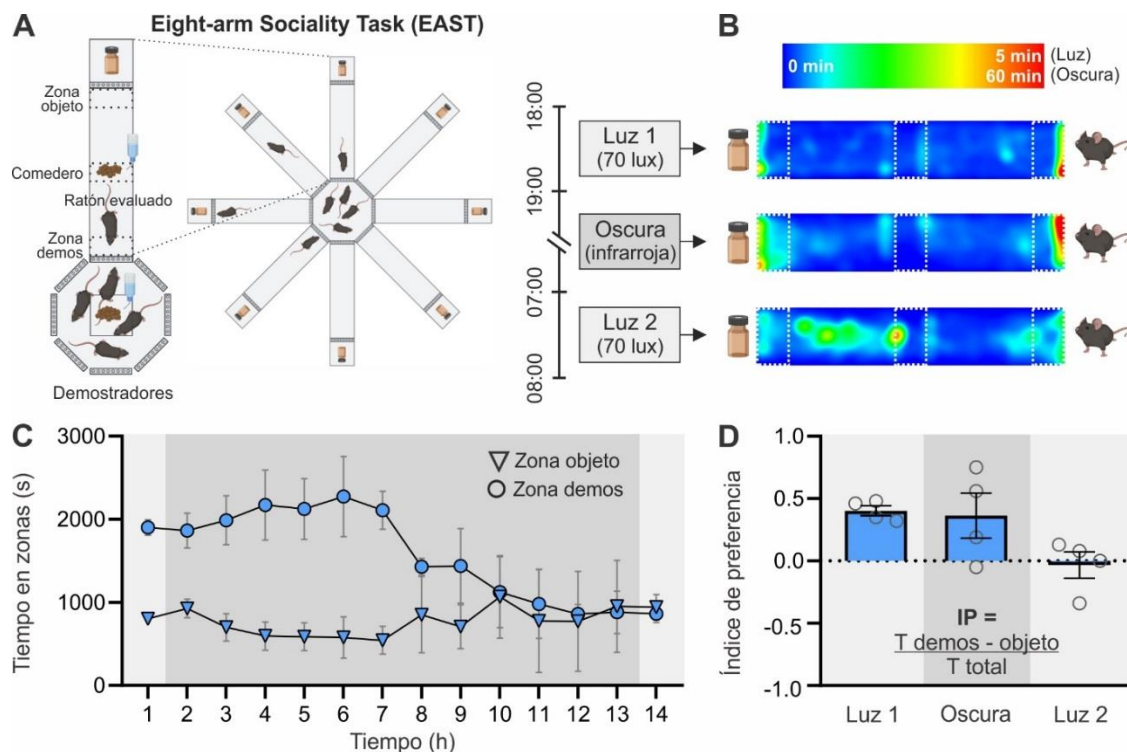


Figura M4. Validación del test de interacción social prolongada. **A.** Esquema del *Eight-Arm Sociality Task* (EAST). Para la puesta a punto de la prueba se utilizaron cuatro ratones C57Bl/6 *wild type* colocados en los brazos del laberinto durante un período de 14 horas. Las líneas discontinuas indican zonas virtuales utilizadas para cuantificar los comportamientos exploratorios. **B.** Mapas de calor de la posición de la cabeza de un ratón representativo durante las tres fases de la prueba, donde el azul y el rojo indican los tiempos de exploración más bajos y más altos, respectivamente. **C.** Tiempo de permanencia en la zona social y del

objeto. Durante la fase de luz 1 y la primera mitad de la fase oscura, los ratones mostraron una preferencia sostenida por la zona de los demostradores sobre la del objeto. Luego, la misma fue decreciendo hasta confluir en una exploración equivalente de ambas zonas. **D.** Esa misma tendencia se vio reflejada en los índices de preferencia, que comenzaron siendo positivos y finalizaron en torno al nivel de chance.

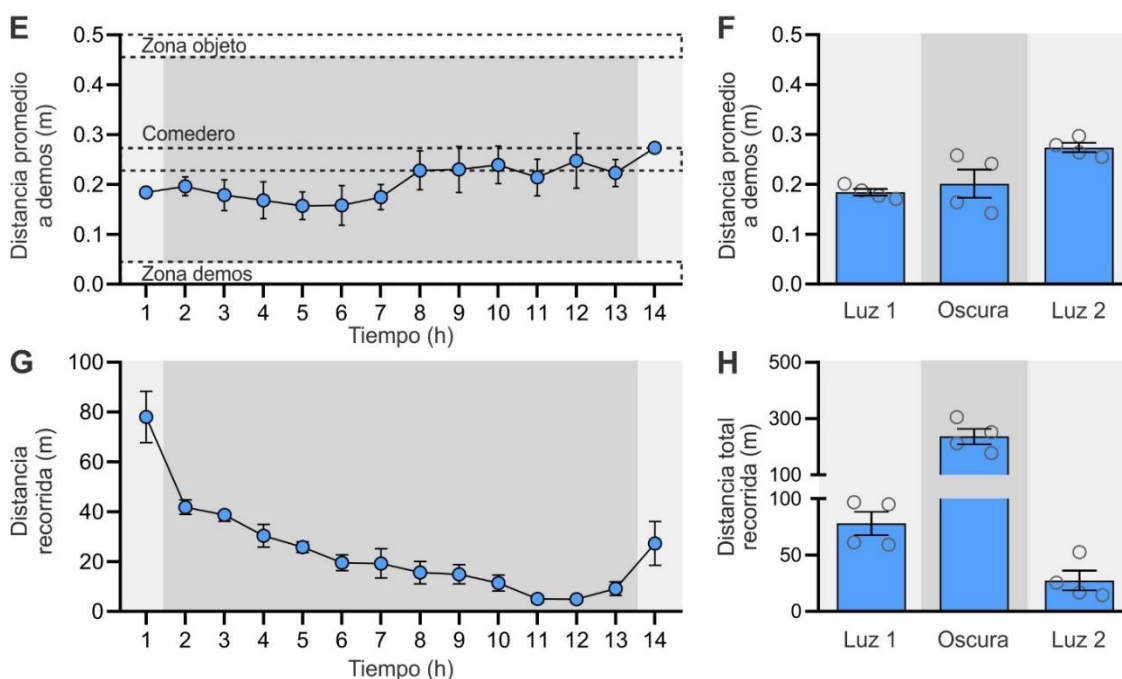


Figura M4 (continuación). **E.** Ubicación espacial promedio en el brazo, calculada como la distancia desde la ventana de exploración de la zona social para cada hora de la prueba. **F.** Durante el transcurso de la prueba, los animales cambiaron su ubicación, pasando de permanecer cerca de la zona social a situarse más cerca del comedero. **G.** Distancia total recorrida a lo largo de cada hora de la prueba. La actividad locomotora de los animales disminuyó progresivamente con el transcurso de la prueba. **H.** Distancia total recorrida discriminada por fase de testeo. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM.

En el EAST, se registró el tiempo en cada zona, el número de entradas, la distancia total recorrida y la distancia promedio a la ventana de malla de alambre ubicada en la zona de los demostradores. Estos parámetros fueron calculados utilizando la posición de la cabeza de cada ratón evaluado. Además, se registró el tiempo en inmovilidad cuando el 80% del cuerpo detectado del ratón permaneció inmóvil durante un mínimo de 60 segundos. Finalmente, se calculó un IP como la resta entre el tiempo en la zona de los demostradores y el tiempo en la zona del objeto, sobre la sumatoria del tiempo en ambas zonas.

5.3. Jerarquía social y dominancia

Esta prueba se realizó en los ratones *Grin1* KO como fue descrito previamente [164, 165]. Luego del destete, se seleccionaron jaulas con cuatro machos y sólo aquellas que incluyeron uno o dos mutantes fueron utilizadas. Durante dos días, los ratones fueron colocados sobre una

superficie iluminada a 100 lux y entrenados para recorrer un tubo deacrílico transparente (30 cm de longitud, 3,5 cm de diámetro interno) diez veces al día, cinco veces desde cada extremo. El test se llevó a cabo durante cuatro días consecutivos bajo un formato de *todos contra todos*, en el que cada animal de la jaula se enfrentó a sus tres compañeros una vez al día en un orden aleatorio. Los oponentes fueron colocados simultáneamente en extremos opuestos del tubo y sostenidos por la cola hasta alcanzar su centro. Posteriormente, fueron liberados y observados sin interferencia alguna durante un máximo de dos minutos. Cuando el tiempo se agotó, el ratón que permaneció dentro del tubo fue designado como el ganador de ese ensayo, mientras que el perdedor retrocedió o fue empujado fuera del tubo, tocando el exterior con sus patas traseras. Con el fin de minimizar el impacto potencial de victorias y derrotas recientes, los dos competidores regresaban a su jaula y descansaban durante dos minutos antes del siguiente enfrentamiento. Si ambos animales permanecían dentro del tubo después del límite de dos minutos, la prueba se interrumpía y la pareja se reevaluaba tras un descanso de cinco minutos. Entre enfrentamientos, el tubo se limpiaba con una solución de etanol al 70 % y se secaba completamente. La posición social diaria de cada animal dentro de la jerarquía se determinó en función del número de victorias contra el resto del grupo, con un rango de 0 (delta) a 3 (alfa). Se calculó la proporción de veces en cada rango para cada genotipo, junto con el puntaje normalizado de David, obtenido según lo descrito previamente [166]. Finalmente, se midió el peso corporal tras la última sesión de entrenamiento.

5.4. Agresión y territorialidad

El test de residente-intruso se llevó a cabo como fue descrito previamente [167] en jaulas de ratones *Grin1* KO y controles que habían sido aislados durante una semana sin cambio de viruta, a fin de fomentar la territorialidad basada en señales olfativas. Dichas jaulas fueron ubicadas en un cuarto tenuemente iluminado a 25 lux. Se utilizó como intrusos a ratones macho C57BL/6 un mes más jóvenes, que fueron introducidos en la jaula de los residentes en el extremo opuesto a los mismos. Cabe mencionar que los intrusos se utilizaron sólo una vez para evitar efectos de sumisión y dominancia. La interacción social entre los animales fue registrada por una cámara de video en posición cenital durante 10 minutos y fue puntuada manualmente. Se consideró la presencia de un comportamiento de ataque cada vez que el residente inició un enfrentamiento, una persecución, una amenaza lateral, una mordida o un episodio de inmovilización del intruso, según lo descrito previamente [168]. De esta forma, se calculó la proporción de residentes que atacaron, la latencia al ataque, el tiempo total de ataque y la proporción de tiempo dedicado a la exploración social antes del primer ataque. La exploración social no agresiva previa al primer ataque se midió cada vez que el hocico del residente se dirigió hacia el intruso a una distancia de 2 centímetros o menos.

6. Cirugía estereotáxica

Los animales de la línea DAT^{IRESc^{re}} fueron operados entre las 10 y 13 semanas de edad, con el fin de inyectar un vector viral que permitiera inhibir la actividad de las neuronas dopaminérgicas de la VTA durante la evaluación comportamental posterior. Mediante el uso de una cámara inhalatoria, se indujo la anestesia con isoflurano 3% en O₂ (Baxter, Estados Unidos) hasta que se alcanzó el plano anestésico quirúrgico. Posteriormente, los ratones fueron colocados en un marco estereotáxico (Kopf Instruments, Estados Unidos) y mantenidos en el plano anestésico con isoflurano al 0.5-1% durante el resto de la cirugía. Además, se aplicó un gel oftálmico estéril (Acrylarm, Poen, Argentina) para prevenir la desecación corneal y un anestésico local de forma subcutánea (lidocaína 1%, Gobbi Novag, Argentina). La zona blanco fue afeitada y limpiada con un antiséptico (iodopovidona 10%, Povibac, Argentina), luego de lo cual se procedió a realizar una incisión longitudinal en sentido anteroposterior, exponiendo la calota y limpiándose la zona expuesta con solución fisiológica. A continuación, se realizó una craneotomía bilateral sobre la VTA con un micromotor dental (Strong 210, Saeshin Precision Co., Corea del Sur) utilizando las siguientes coordenadas estereotáxicas: AP -3.2 mm, ML $\pm$ 0.4 mm, DV -4.3 mm desde Bregma y la duramadre [169]. Mediante una micropipeta de vidrio de borosilicato (1B100F-4, World Precision Instruments, Estados Unidos), se realizó una inyección bilateral de 0.25 μ L de una solución 1:3 de AAV8-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry (título $\geq 1 \times 10^{13}$ vg/mL, plásmido #44362, Addgene) en PBS para virus. Este vector viral permite la expresión Cre-dependiente del receptor hM4D(Gi) y del reportero mCherry bajo el promotor de sinapsina humana. Una vez finalizada la cirugía, se administró un antiinflamatorio y analgésico (2.5 mg/kg de flunixin meglumina, Aviar) y se alojó al animal en una jaula apoyada sobre una manta térmica, corroborando que saliera del plano anestésico. Finalmente, se permitió la expresión viral durante un período de 3 a 4 semanas, en el cual además se monitoreó la recuperación íntegra de los animales operados, sin evidenciarse alteraciones sensoriales o motoras producto de la cirugía.

7. Drogas

Para inhibir la actividad de las neuronas dopaminérgicas de la VTA durante las pruebas de preferencia y reconocimiento social y discriminación afectiva, se disolvió N-óxido de clozapina (CNO, #C-929, NIMH Chemical Synthesis and Drug Supply Program, NIH, Estados Unidos) en una solución de vehículo compuesta por solución fisiológica estéril y dimetilsulfóxido al 10% (DMSO, Fluka), obteniéndose una concentración de 4.5 mg/ml. Una hora antes de cada prueba, los ratones de la línea DAT^{IRESc^{re}} fueron transportados a una sala de *holding* y pesados. La droga fue administrada en la mitad de los animales a un volumen de 0.1 ml/10 g y a una dosis de 3 mg/kg de forma intraperitoneal, mientras que la otra mitad de los ratones recibió un volumen

equivalente de la solución de vehículo. Pasada la hora, los ratones fueron trasladados al cuarto experimental para ser evaluados comportamentalmente. Tras un período de lavado de 5 a 7 días, el procedimiento fue repetido, contrabalanceado el tratamiento mediante un diseño cruzado. De esta manera, cada ratón DAT^{IRESc^{re}} actuó como su propio control y fue retestado en las pruebas mencionadas.

Con el fin de evaluar el efecto de un antipsicótico sobre el comportamiento de los ratones mutantes Ppp1r2-cre^{+/-}; *Grin1*^{loxP/loxP} en el EAST, se disolvió clozapina (Rospaw, Argentina) en una solución de vehículo compuesta por solución fisiológica estéril y dimetilsulfóxido al 1% (DMSO, Fluka), obteniéndose una concentración de 0.1 mg/ml. Los mutantes fueron tratados de manera subcrónica con el fármaco (1 mg/kg) o vehículo por vía intraperitoneal a un volumen de 0.1 ml/10 g de peso corporal, una vez al día durante cinco días consecutivos. Dicha dosis fue elegida con base en estudios previos que interrogaron la reversión farmacológica de fenotipos comportamentales relevantes para la esquizofrenia [170, 171]. La interacción social prolongada fue evaluada en el EAST seis horas después de la última administración de la droga en el quinto día de tratamiento. Tras un período de lavado de 15 días, el tratamiento farmacológico subcrónico fue contrabalanceado mediante un diseño cruzado, actuando los mutantes como sus propios controles y siendo retestados en el paradigma comportamental mencionado.

8. Histología e inmunohistoquímica

Noventa minutos después de la versión aversiva de la prueba de discriminación afectiva, un subconjunto de controles y mutantes *Grin1* KO fueron anestesiados profundamente mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (200 mg/kg) y perfundidos intracardiácamente con 18 ml de solución fisiológica fría heparinizada (2000 U/L), seguida de 50 ml de paraformaldehído 4 % (PFA, Sigma) en PBS a un flujo de 5 ml/min. Los cerebros fueron extraídos y fijados *post mortem* en PFA 4% en PBS a 4°C durante la noche, y luego fueron crioprotegidos en sacarosa 30% en PBS durante 24-72 horas hasta el momento del corte. Se obtuvieron secciones coronales de 30 µm de la corteza prefrontal medial (AP +1.7 a +1.9 mm desde Bregma) utilizando un micrótopo (Leica SM2010R, Alemania) equipado con una platina de congelación. Posteriormente, los cortes fueron procesados para detectar c-Fos mediante inmunohistoquímica, como fue descrito previamente [147]. Las secciones se incubaron en PBS Tritón 0.1% y suero de cabra normal (NGS) 5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo primario (1:1500 anti-c-Fos de conejo, #ABE457, Millipore, Estados Unidos) en NGS 1% a 4 °C durante la noche. A continuación, las secciones fueron lavadas con PBS e incubadas con un anticuerpo secundario (1:500 cabra anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488, #A11034, Invitrogen, Estados Unidos) en NGS 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes fueron lavados nuevamente con PBS, teñidos con Neurotrace-640 (#21483, Molecular Probes, Estados Unidos) para identificar los

límites de la corteza prefrontal medial y montados con Vectashield (#H-1000, Vector Labs, Estados Unidos) en portaobjetos de vidrio. Las imágenes fueron adquiridas utilizando un microscopio Zeiss AxioImager M2 con Apotome 2.0. El número de células que expresaron c-Fos se cuantificó utilizando el *plug in* de conteo celular de ImageJ (v1.54h).

Con el fin de confirmar la expresión del DREADD inhibitorio en las neuronas dopaminérgicas de la VTA de los ratones DAT^{IRESc^{re}}, se siguieron los mismos procedimientos de anestesia, perfusión, fijado y crioprotección aquí descritos. En este caso particular, se obtuvieron secciones coronales de 30 µm de la VTA (AP -2.7 a -3.9 mm desde Bregma). Para la inmunohistoquímica contra mCherry, los cortes se incubaron en PBS Tritón 0.3% y suero de cabra normal (NGS) 5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, se incubaron con un anticuerpo primario (1:5000 anti-mCherry de conejo, #ab167453, Abcam, Gran Bretaña) en NGS 1% a 4 °C durante la noche. Finalmente, las secciones fueron lavadas con PBS e incubadas con un anticuerpo secundario (1:500 cabra anti-conejo conjugado con CY3, #111-165-144, Jackson ImmunoResearch, Estados Unidos) en NGS 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Para la inmunohistoquímica contra TH, los cortes se incubaron en PBS Tritón 0.3% y suero de cabra normal (NGS) 5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Acto seguido, se incubaron con un anticuerpo primario (1:5000 anti-TH de ratón, #MAB318, MilliporeSigma, Estados Unidos) en NGS 1% a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, las secciones fueron lavadas con PBS e incubadas con un anticuerpo secundario (1:500 cabra anti-ratón conjugado con Alexa 488, #A-11034, Invitrogen, Estados Unidos) en NGS 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. Finalmente, los cortes fueron montados con Fluoroshield (#F6182, Sigma, Estados Unidos) en portaobjetos de vidrio. Las imágenes fueron adquiridas utilizando el microscopio Zeiss AxioImager M2.

9. Estadística

Los tamaños de las muestras no fueron determinados mediante métodos estadísticos sino de acuerdo a trabajos previos de nuestro equipo [145, 150], siendo similares a los empleados en el campo. El número de animales de cada grupo experimental se detalla en los pies de figura. El análisis estadístico y el diseño de las figuras se realizaron utilizando GraphPad Prism 8.0. (GraphPad Software Inc., Estados Unidos). Los resultados fueron analizados utilizando estadística paramétrica y no paramétrica, según lo indicado por los tests de normalidad e igualdad de varianzas. Dependiendo del diseño experimental, se realizaron pruebas de t independientes y pareadas, pruebas de t de una muestra, pruebas de chi-cuadrado y ANOVAs de medidas repetidas de dos y tres vías. Se realizaron pruebas *post hoc* de Bonferroni cuando se encontraron interacciones o efectos principales significativos en los ANOVAs. Con el fin de minimizar errores tipo II [172], se llevaron a cabo pruebas LSD de Fisher después de

interacciones significativas en los casos donde se excedían las 100 comparaciones post-hoc (ANOVA de medidas repetidas en las Figuras 14 y 16). Los datos paramétricos se presentan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM) y los datos no paramétricos como mediana con rango intercuartil. Para cada experimento, los valores de p se indican en las figuras y sus leyendas, junto con los parámetros estadísticos. En todos los casos se utilizaron pruebas de dos colas, y el umbral de significancia se estableció en $p = 0.05$.

RESULTADOS

1. Rol de las neuronas dopaminérgicas de la VTA en el comportamiento socioafectivo

1.1. Estrategia experimental

Con el fin de evaluar el rol de las neuronas dopaminérgicas de la VTA sobre el comportamiento socioafectivo, inhibimos su actividad durante la realización de una batería de pruebas conductuales mediante un abordaje quimiogénético. Para ello, ratones machos de entre 10 y 13 semanas de edad de la línea transgénica DAT-Cre fueron inyectados bilateralmente con el vector viral AAV8-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-mCherry en la VTA mediante cirugía estereotáxica (Figura 1A). En estos animales, la recombinasa Cre se expresa bajo el control transcripcional del transportador de dopamina (DAT), cuya expresión está restringida a las neuronas dopaminérgicas. En presencia de Cre, la secuencia DIO (*Double-floxed Inverted Orientation*), que mantiene el gen de interés en orientación antisentido e inactiva, sufre una doble recombinación que invierte y estabiliza el gen en orientación sentido. Esto permite su transcripción a partir del promotor sináptico (hSyn) y la expresión específica del receptor DREADD hM4D(Gi) en neuronas dopaminérgicas (Figura 1A). Estos receptores inhibitorios son una versión modificada del receptor muscarínico humano acoplado a proteína Gi que, al activarse mediante la administración exógena de un ligando sintético como el CNO, disminuyen la actividad neuronal de manera dosis dependiente. Además, el vector viral utilizado incluye la proteína fluorescente mCherry, que permite visualizar las neuronas transducidas (Figura 1B y C).

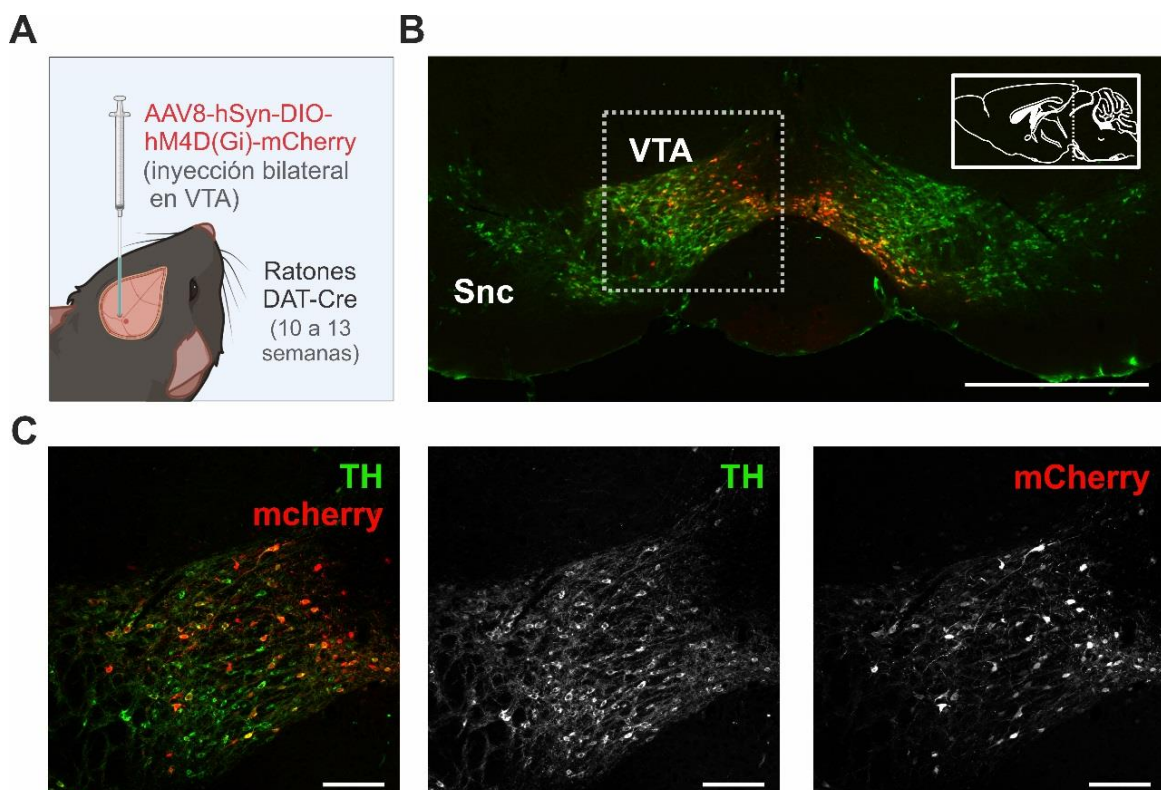


Figura 1. Inhibición quimiogénica de la actividad dopaminérgica de la VTA. **A.** Esquema de la estrategia experimental utilizada. **B.** Imagen de una sección coronal representativa (Bregma -3.5) del mesencéfalo de un ratón DAT-Cre inyectado con el vector viral e inmunoteñida para detectar las neuronas dopaminérgicas y las neuronas infectadas que expresan mCherry. La región de interés de la VTA se indica con el cuadrado punteado. En el Anexo (Figura A1) se incluyen secciones coronales de la primera camada de animales. **C.** Imágenes de alta magnificación del área de interés mostrando la inmunomarcación para tirosina hidroxilasa (TH, en verde) y mCherry (en rojo). La infección viral de las neuronas dopaminérgicas de la VTA (TH+/hM4Di+) se visualiza en amarillo-naranja. Las barras de las escalas en B y C representan 1 mm y 50 μ m, respectivamente. VTA: área tegmental ventral; SNc: sustancia nigra pars compacta.

Luego de la cirugía estereotáxica, permitimos la expresión del vector viral durante un período de 3 a 4 semanas. Entre los 3 y 5 meses de edad, evaluamos diferentes aspectos del comportamiento social dentro de una cámara desarrollada por nuestro equipo (Figura M1), administrando CNO o vehículo de forma intraperitoneal una hora antes de cada prueba.

1.2. Preferencia y reconocimiento social

Previo a indagar la implicancia funcional de las neuronas dopaminérgicas de la VTA en la discriminación de estados afectivos expresados por congéneres, resulta necesario determinar si, bajo nuestras condiciones experimentales, su inactivación compromete capacidades sociales más elementales, como el reconocimiento de estímulos sociales *per se*. Por consiguiente, evaluamos en primer lugar el rol de esta población neuronal en una prueba de preferencia social (Figura M2 A-D). En la misma, los ratones evaluados pudieron explorar un demostrador *wild type* y un objeto inanimado, ambos novedosos, colocados en módulos separados en la cámara de sociabilidad (Figura 2A). Al analizar el curso temporal de la exploración en cada grupo, observamos que tanto los animales tratados con vehículo como aquellos que recibieron CNO mostraron un sesgo de preferencia por el estímulo social a partir de los cuatro minutos del test (Figura 2B). Cuando consideramos la duración total de la prueba, no encontramos diferencias significativas entre grupos en los tiempos que transcurrieron en cada zona (Figura 2C), ni en los índices de preferencia resultantes (Figura 2D). Asimismo, la inhibición de las neuronas dopaminérgicas de la VTA no afectó la actividad locomotora (Figura 2E) ni la exploración global de los estímulos (Figura 2F). Una semana más tarde, los animales fueron reevaluados en el mismo paradigma comportamental pero recibieron el tratamiento farmacológico opuesto al inicial de manera contrabalanceada (Figura 2A arriba). Al combinar los resultados del test y retest, no observamos diferencias significativas en los índices de preferencia entre los tratamientos farmacológicos (Figura 2G). En conjunto, estos resultados sugieren que, bajo nuestras condiciones experimentales, la actividad de las neuronas dopaminérgicas de la VTA no es necesaria para establecer una preferencia por un estímulo social sobre uno inanimado.

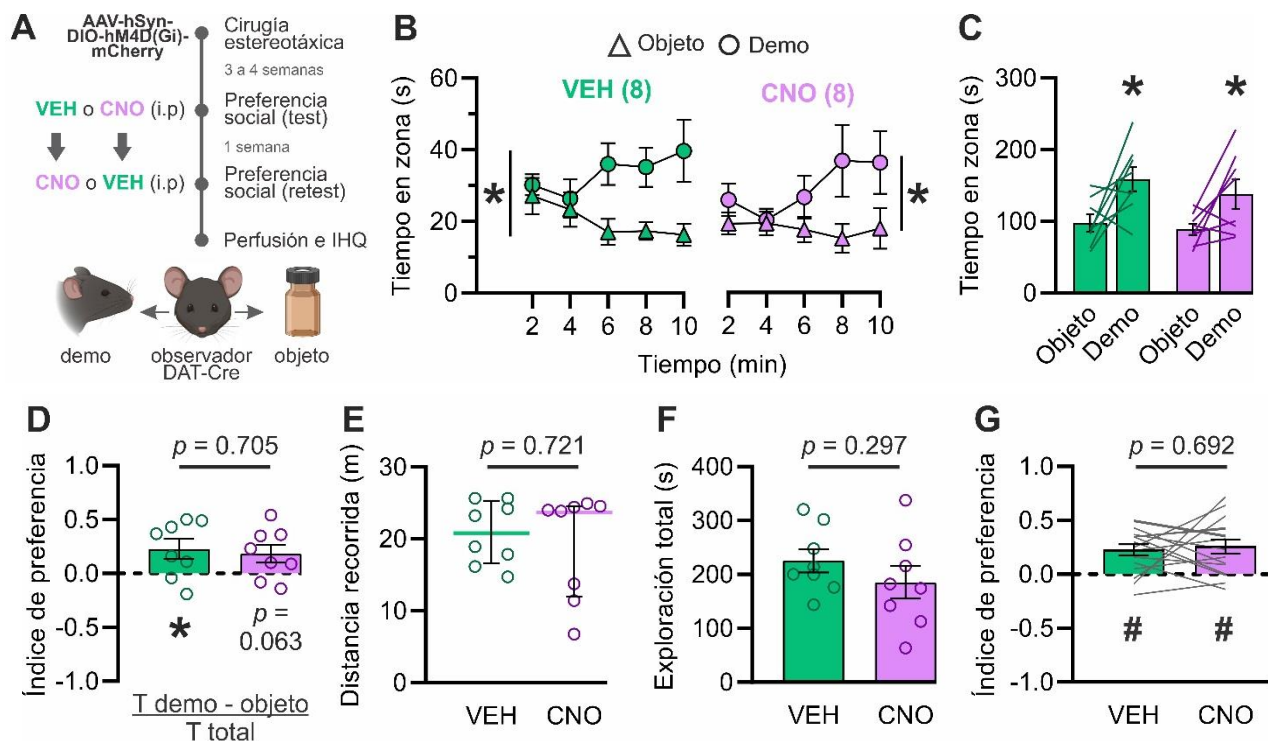


Figura 2. Inhibición de la actividad dopaminérgica de la VTA durante una tarea de preferencia social. **A.** Diseño experimental. **B.** Tiempos de exploración a lo largo de la sesión de diez minutos (VEH: ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tiempo x estímulo: $F_{4,56} = 2.327$, $p = 0.067$; * factor estímulo: $F_{1,14} = 9.168$, $p = 0.009$; CNO: ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tiempo x estímulo: $F_{4,56} = 1.249$, $p = 0.301$; * factor estímulo: $F_{1,14} = 7.236$, $p = 0.018$). **C.** Tiempo total de exploración de los estímulos durante los 10 minutos de la prueba. Tanto los ratones tratados con vehículo como con CNO mostraron un sesgo de exploración hacia el demostrador en comparación con el objeto (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tratamiento x estímulo: $F_{1,14} = 0.153$, $p = 0.702$; factor tratamiento: $F_{1,14} = 1.168$, $p = 0.298$; * factor estímulo: $F_{1,14} = 11.71$, $p = 0.004$). **D.** En los 10 minutos de la prueba, la preferencia social fue equivalente entre los animales tratados con vehículo y CNO (prueba de t no pareada: $t_{14} = 0.386$, * $p = 0.705$). El índice de preferencia fue significativamente diferente del nivel de chance (línea discontinua) en el grupo tratado con vehículo y cercano a la significancia en el grupo tratado con CNO (pruebas de t de una muestra: VEH: $t_7 = 2.50$, * $p = 0.041$; CNO: $t_7 = 2.206$, # $p = 0.063$). **E.** La actividad locomotora fue equivalente entre los grupos (prueba de Mann-Whitney: $U = 28$, $p = 0.721$). **F.** No se observaron diferencias significativas entre grupos en la exploración total de ambos estímulos durante el test (prueba de t no pareada: $t_{14} = 1.084$, $p = 0.297$). **G.** Índices de preferencia del test y retest agrupados por tratamiento farmacológico (prueba de t pareada: $t_{15} = 0.402$, $p = 0.692$; pruebas de t de una muestra vs. chance: VEH: $t_{15} = 4.330$, # $p \leq 0.001$, CNO: $t_{15} = 4.022$, # $p = 0.001$). Los resultados se expresan como mediana con rango intercuartil para E y como media $\pm$ SEM para el resto de la figura. VEH: ratones tratados con vehículo ($n = 8$ para B-F y $n = 16$ para G); CNO: ratones tratados con CNO ($n = 8$ para B-F y $n = 16$ para G). Los resultados de B-F corresponden al test, mientras que en G se incluyen los del test y del retest.

Dado que la VTA ha sido relacionada con la detección de estímulos sociales novedosos [48] y que la respuesta social puede depender de la familiaridad del congénere con el que se interactúa, evaluamos el rol de las neuronas dopaminérgicas de dicha región en una prueba de reconocimiento social (Figura M2 E-H). Para ello, tras el test de preferencia social, retiramos al ratón evaluado y lo mantuvimos en una jaula de *holding* durante un intervalo de cinco minutos. Además, añadimos un demostrador novedoso a los dos estímulos presentados previamente en la cámara de sociabilidad: el objeto y el demostrador ahora conocido (Figura 3A). Finalizado el intervalo, reintroducimos al ratón evaluado en la cámara, permitiéndole explorar los tres estímulos durante un período de 10 minutos. Como cabría esperar según lo reportado en la literatura, en los ratones tratados con vehículo, observamos un sesgo de preferencia por el demostrador novedoso sobre el familiar durante el transcurso de la prueba (Figura 3B). Por su parte, en el grupo tratado con CNO se observó un perfil similar, con un tiempo mayor dedicado a la exploración del ratón novedoso que al familiar, sin diferencias significativas entre grupos en los tiempos en las zonas (Figuras 3C) ni en los índices de preferencia al tomar la duración total del test (Figuras 3D). Pese a que detectamos diferencias significativas en la actividad locomotora entre animales tratados con vehículo y con CNO (Figura 3E), no observamos diferencias en el tiempo total de exploración de ambos demostradores (Figura 3F). En consonancia con la prueba de preferencia social, al combinar los resultados del test y retest no observamos diferencias significativas en los índices de preferencia entre los tratamientos farmacológicos (Figura 3G). Estos resultados sugieren que, bajo nuestras condiciones experimentales, la inhibición de las neuronas dopaminérgicas de la VTA tampoco impacta en la discriminación de congéneres en función de su novedad.

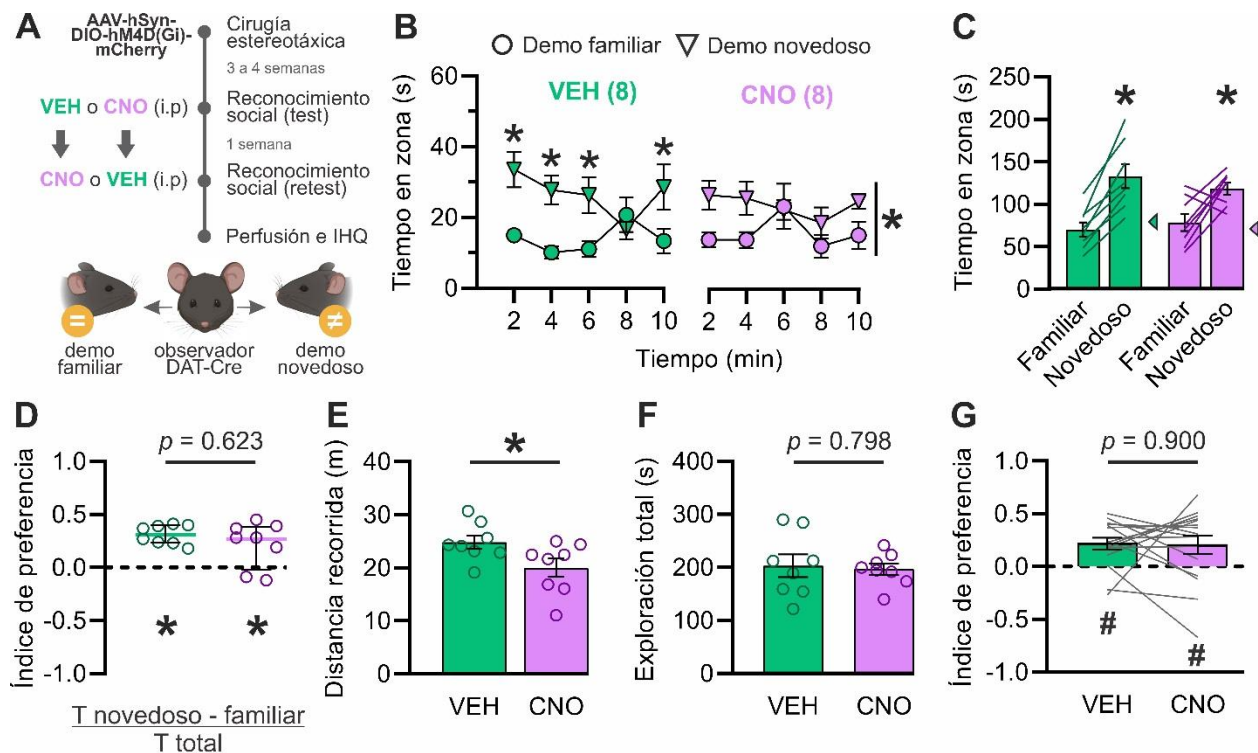


Figura 3. Inhibición de la actividad dopaminérgica de la VTA durante una tarea de reconocimiento social. **A.** Diseño experimental. **B.** Tiempos de exploración a lo largo de la sesión de diez minutos (VEH: ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tiempo x demostrador: $F_{4,56} = 3.256$, $p = 0.018$; factor demostrador: $F_{1,14} = 14.44$, $p = 0.002$; prueba *post hoc* de Bonferroni: $* p \leq 0.05$ vs. demostrador familiar; CNO: ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tiempo x demostrador: $F_{4,56} = 1.077$, $p = 0.377$; factor demostrador: $F_{1,14} = 10.09$, $p = 0.007$). **C.** Tiempo total de exploración de los estímulos durante los 10 minutos de la prueba. Tanto los ratones tratados con vehículo como con CNO mostraron un sesgo de exploración hacia el demostrador novedoso en comparación con el familiar (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tratamiento x demostrador: $F_{1,14} = 1.860$, $p = 0.194$; factor tratamiento: $F_{1,14} = 0.068$, $p = 0.798$; $*$ factor demostrador: $F_{1,14} = 37.23$, $p \leq 0.01$). Las cabezas de flecha indican el tiempo promedio que cada grupo pasó en la zona del objeto. **D.** En los 10 minutos de la prueba, la preferencia social fue equivalente entre los animales tratados con vehículo y CNO (prueba de Mann-Whitney: $U = 27$, $p = 0.623$). El índice de preferencia fue significativamente diferente del nivel de chance (línea discontinua) en ambos grupos (tests de Wilcoxon: VEH: $W = 36$, $* p = 0.008$; CNO: $W = 30$, $* p = 0.039$). **E.** La actividad locomotora fue significativamente distinta entre los grupos (prueba de t no pareada: $t_{14} = 2.264$, $* p = 0.040$). **F.** No se observaron diferencias significativas entre grupos en la exploración total de ambos demostradores durante el test (prueba de t no pareada: $t_{14} = 0.260$, $p = 0.798$). **G.** Índices de preferencia del test y retest agrupados por tratamiento farmacológico (prueba de t pareada: $t_{15} = 0.128$, $p = 0.900$; pruebas de t de una muestra vs. chance: VEH: $t_{15} = 3.863$, $\# p = 0.002$, CNO: $t_{15} = 2.330$, $\# p = 0.034$). Los resultados se expresan como mediana con rango intercuartil para D y como media $\pm$ SEM para el resto de la figura. VEH: ratones tratados con vehículo ($n = 8$ para B-F y $n = 16$ para G); CNO: ratones tratados con CNO ($n = 8$ para B-F y $n = 16$ para G). Los resultados de B-F corresponden al test, mientras que en G se incluyen los del test y del retest.

1.3. Discriminación de estados afectivos de distinta valencia

Dado que, bajo nuestras condiciones experimentales, la inhibición de la actividad dopaminérgica de la VTA no afectó la capacidad de reconocer estímulos sociales ni de discriminarlos en función de su novedad, decidimos evaluar si esta población neuronal podía regular la discriminación de estados afectivos expresados en el contexto de una interacción social. Para ello, evaluamos a los ratones DAT-Cre en una primera versión del paradigma de discriminación afectiva, en la que los animales fueron expuestos simultáneamente a dos demostradores novedosos: uno neutral sin manipulación previa y otro en el que se había inducido un estado afectivo de valencia positiva mediante la asociación del contexto con una experiencia gratificante en los días previos (Figuras M3 A-C y 4A abajo). En esta prueba, la capacidad de discriminar congéneres con diferentes estados afectivos se manifiesta como una preferencia grupal por un tipo de demostrador. Observamos que los ratones inyectados con vehículo mostraron un incremento significativo en la exploración dirigida hacia los demostradores recompensados durante los primeros seis minutos de la prueba (Figura 4B izquierda). En cambio, los animales tratados con CNO no desarrollaron ninguna preferencia, interactuando

de forma similar con ambos tipos de demostrador durante el transcurso del test (Figura 4B derecha). Al analizar los primeros seis minutos de la prueba, observamos que la mayoría de los animales mostró una preferencia individual. En el grupo tratado con vehículo, esta preferencia fue consistente hacia el demostrador previamente recompensado, mientras que en el grupo tratado con CNO fue aleatoria (Figura 4C). Dicho efecto también se reflejó en los índices de preferencia, donde encontramos diferencias significativas entre los grupos tratados con CNO y VEH, siendo únicamente este último el que mostró una preferencia significativa distinta del nivel de chance (Figura 4D). También es importante destacar que ni la actividad locomotora ni la exploración total de los demostradores difirieron entre los grupos experimentales durante el período en el que se detectaron las diferencias en la discriminación afectiva (Figura 4E y F). El análisis combinado del test y del retest evidenció que el tratamiento con CNO produjo una disminución significativa en el índice de preferencia en comparación con la administración de vehículo, alcanzando un nivel similar al de chance (Figura 4G).

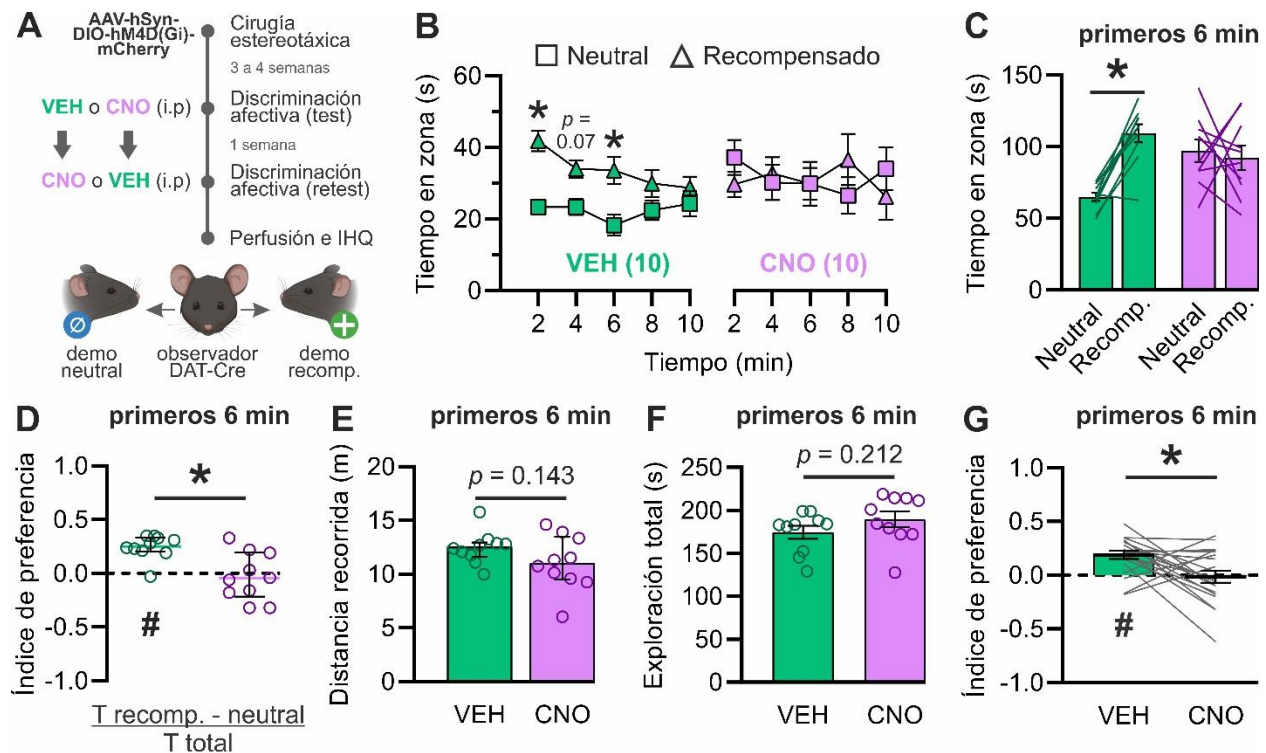


Figura 4. La actividad de las neuronas dopaminérgicas de la VTA es necesaria para discriminar un estado afectivo positivo de uno neutral. **A.** Diseño experimental. **B.** Tiempos de exploración durante la sesión de diez minutos. (Izquierda) Los ratones tratados con vehículo mostraron un sesgo de exploración hacia el demostrador recompensado en comparación con el neutral (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tiempo x demostrador: $F_{4,72} = 2.196$, $p = 0.078$; factor demostrador: $F_{1,18} = 20.21$, $p \leq 0.001$; prueba *post hoc* de Bonferroni: * $p \leq 0.05$ vs. demostrador neutral). (Derecha) Los ratones inyectados con CNO no mostraron ninguna preferencia durante la sesión de diez minutos (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tiempo x demostrador: $F_{4,72} = 0.981$, $p = 0.424$; factor demostrador: $F_{1,18} = 0.022$,

$p = 0.884$). **C.** Tiempo de exploración de los demostradores durante los primeros 6 minutos de la prueba. (Izquierda) En los ratones inyectados con vehículo, la exploración social se sesgó sistemáticamente hacia el demostrador recompensado, mientras que fue aleatoria en los ratones tratados con CNO (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tratamiento x demostrador: $F_{1,18} = 10.82$, $p = 0.004$; prueba *post hoc* de Bonferroni: * $p \leq 0.001$ vs. demostrador neutral en controles). **D.** En los primeros 6 minutos de la prueba, la discriminación afectiva fue significativamente diferente entre los grupos (prueba de Mann Whitney: $U = 13$, * $p = 0.004$). En el grupo tratado con vehículo, el índice de preferencia fue significativamente diferente del nivel de chance, indicado con una línea punteada (test de Wilcoxon: $W = 53$, # $p = 0.004$). **E.** Actividad locomotora durante los primeros 6 minutos (prueba de t no pareada: $t_{18} = 1.533$, $p = 0.143$). **F.** Exploración total de ambos demostradores durante los primeros 6 minutos (prueba de t no pareada: $t_{18} = 1.293$, $p = 0.212$). **G.** Índices de preferencia del test y retest agrupados por tratamiento farmacológico (prueba de t pareada: $t_{19} = 2.696$, * $p = 0.014$; prueba de t de una muestra vs. chance: $t_{19} = 4.969$, # $p \leq 0.001$). Los resultados se expresan como mediana con rango intercuartil para D y como media $\pm$ SEM para el resto de la figura. VEH: ratones tratados con vehículo ($n = 10$ para B-F y $n = 20$ para G); CNO: ratones tratados con CNO ($n = 10$ para B-F y $n = 20$ para G). Los resultados de B-F corresponden al test, mientras que en G se incluyen los del test y del retest.

Para determinar si el rol de las neuronas dopaminérgicas de la VTA se extiende a la discriminación de estados afectivos de valencia negativa, los ratones DAT-Cre fueron evaluados en una segunda versión del paradigma de discriminación afectiva utilizado previamente. Una hora después de la administración intraperitoneal de CNO o vehículo, los animales fueron expuestos simultáneamente a un demostrador neutral y a uno derrotado socialmente (Figuras M3 D-F y 5A abajo). El primero de ellos permaneció inalterado junto a sus compañeros de jaula hasta el momento de la prueba. En cambio, el segundo fue sometido a episodios inescapables de derrota social inmediatamente antes de la prueba y durante 20 minutos dentro de las jaulas de residentes C57BL/6 agresivos. En esta versión del paradigma, observamos que los ratones DAT-Cre inyectados con vehículo mostraron un sesgo significativo de exploración hacia los demostradores derrotados socialmente durante el transcurso de la prueba, lo que no fue detectado en los animales tratados con CNO (Figura 5B). Durante los primeros seis minutos, el grupo que recibió vehículo mostró nuevamente una preferencia grupal consistente, mientras que el grupo tratado con CNO exhibió una preferencia aleatoria no relacionada con el estado afectivo inducido experimentalmente (Figura 5C y D). Aunque durante los primeros seis minutos la actividad locomotora no fue equivalente entre los grupos (Figura 5E), esto no se tradujo en diferencias significativas en el tiempo total de exploración de ambos demostradores (Figura 5F), lo cual podría influir en la capacidad para discriminar dichos estímulos. En consonancia con la versión apetitiva del paradigma, al combinar los resultados del test y retest, la preferencia observada en el grupo control fue abolida tras la inyección de CNO (Figura 5G).

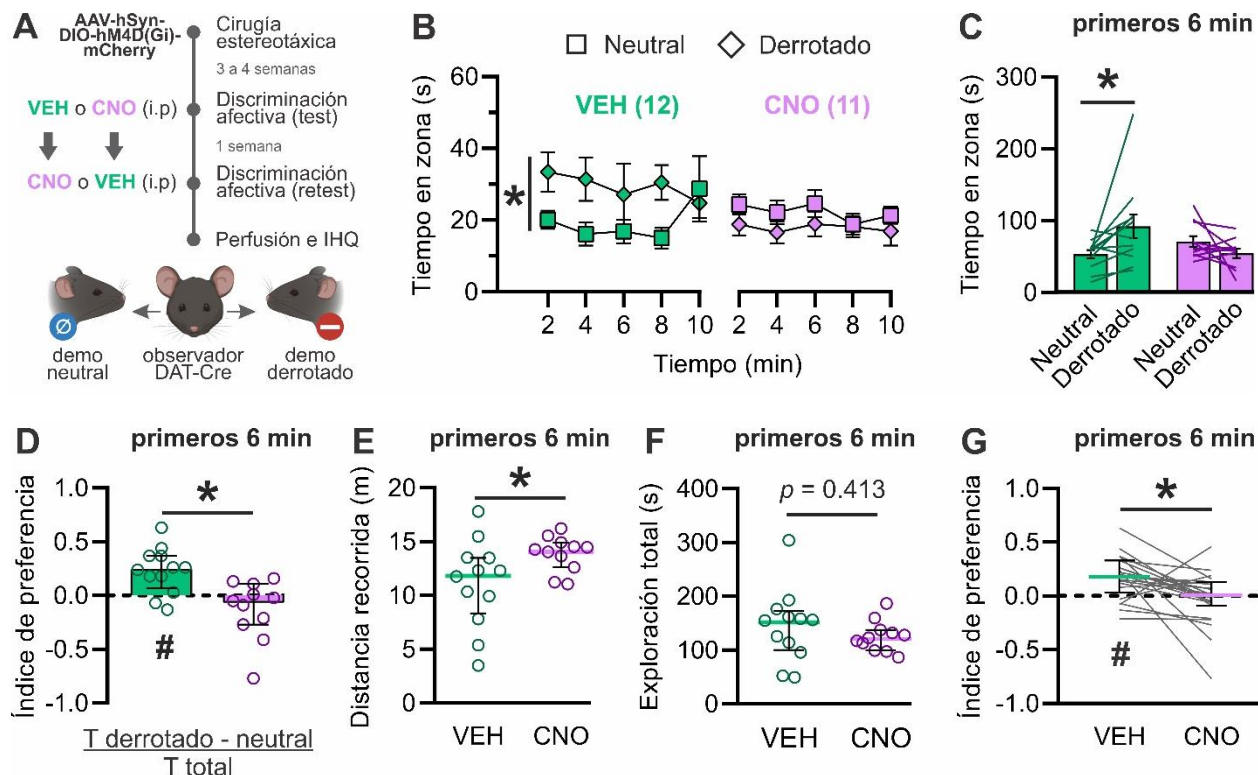


Figura 5. El rol de las neuronas dopaminérgicas de la VTA se extiende a la discriminación de estados afectivos de valencia negativa. **A.** Diseño experimental. **B.** Tiempos de exploración durante la sesión de diez minutos. (Izquierda) Los ratones tratados con vehículo mostraron un sesgo de exploración hacia el demostrador derrotado socialmente en comparación con el neutral (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tiempo x demostrador: $F_{4,88} = 1.270$, $p = 0.288$; * factor demostrador: $F_{1,22} = 5.407$, $p = 0.030$). (Derecha) Los ratones inyectados con CNO no mostraron ninguna preferencia durante la sesión de diez minutos (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tiempo x demostrador: $F_{4,80} = 0.288$, $p = 0.885$; factor demostrador: $F_{1,20} = 2.419$, $p = 0.136$). **C.** Tiempo de exploración de los demostradores durante los primeros 6 minutos de la prueba. (Izquierda) En los ratones inyectados con vehículo, la exploración social se sesgó sistemáticamente hacia el demostrador derrotado socialmente, mientras que fue aleatoria en los ratones tratados con CNO (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tratamiento x demostrador: $F_{1,21} = 8.117$, $p = 0.01$; prueba *post hoc* de Bonferroni: * $p \leq 0.05$ vs. demostrador neutral en ratones tratados con vehículo). **D.** En los primeros 6 minutos de la prueba, la discriminación afectiva fue significativamente diferente entre los grupos (prueba de t no pareada: $t_{21} = 3.485$, * $p = 0.002$). En el grupo tratado con vehículo, el índice de preferencia fue significativamente diferente del nivel de chance, indicado con una línea punteada (prueba de t de una muestra: $t_{11} = 3.701$, # $p = 0.003$). **E.** La actividad locomotora durante los primeros 6 minutos del test fue significativamente distinta entre los grupos (prueba de Mann-Whitney: $U = 32$, * $p = 0.037$). **F.** No se observaron diferencias significativas entre grupos en la exploración total de ambos demostradores durante el mismo lapso del test (prueba de Mann-Whitney: $U = 52$, * $p = 0.413$). **G.** Índices de preferencia del test y retest agrupados por tratamiento farmacológico (test de Wilcoxon para muestras pareadas: $W = 184$, * $p = 0.002$; test de Wilcoxon de una muestra vs. chance: $W = 218$, # $p \leq 0.001$). Los resultados se expresan como mediana con rango intercuartil para E-G y como media $\pm$ SEM para el resto de la figura. VEH: ratones tratados con

vehículo (n = 12 para E-F y n = 23 para G); CNO: ratones tratados con CNO (n = 11 para E-F y n = 23 para G). Los resultados de B-F corresponden al estadio del test, mientras que en G se incluyen los del test y del retest.

En conjunción con lo reportado en las pruebas de preferencia y reconocimiento social, estos resultados sugieren que las neuronas dopaminérgicas de la VTA participan de forma global en la discriminación de estados afectivos de distinta valencia, sin intervenir en la discriminación básica de estímulos sociales.

2. Efectos de la hipofunción glutamatérgica en interneuronas corticolímbicas sobre la discriminación de estados afectivos

Con el fin de investigar el impacto de una manipulación fisiopatológica relevante para la esquizofrenia sobre el comportamiento socioafectivo, evaluamos la discriminación de estados afectivos de distinta valencia, el funcionamiento social y la interacción prolongada con congéneres en nuestro modelo murino de ablación posnatal temprana del receptor NMDA en interneuronas GABAérgicas corticolímbicas. Para ello, utilizamos dos grupos de animales: por una parte, los ratones *Ppp1r2-Cre*^{+/-}; *Grin1*^{loxP/loxP} (mutantes, *knockouts* o *Grin1* KO), que carecen de receptores NMDA funcionales desde una etapa temprana del desarrollo en la población neuronal mencionada [145]; por otra, sus hermanos *Ppp1r2-cre*^{-/-}; *Grin1*^{loxP/loxP} (controles o CTRL), con receptores NMDA intactos dada la ausencia de expresión de Cre. Como ya fue mencionado, los fenotipos relevantes para la esquizofrenia emergen en la vida adulta de los mutantes, por lo que la evaluación comportamental se llevó a cabo en animales de entre tres y cinco meses de edad.

2.1. Discriminación de estados afectivos de distinta valencia

En primer lugar, evaluamos el comportamiento exploratorio de ratones control y mutantes en la versión apetitiva del paradigma de discriminación afectiva utilizado previamente (Figuras M3 A-C y 6A). Bajo estas condiciones, encontramos que los controles discriminaron a sus congéneres en función de su estado afectivo, mostrando un sesgo de exploración significativo hacia los demostradores neutrales durante los primeros seis minutos de la prueba aproximadamente (Figura 6B izquierda y C). Después de esta fase inicial de reconocimiento y durante el tiempo restante de la prueba, los controles interactuaron de manera similar con ambos tipos de demostradores. En contraste, los ratones *Grin1* KO no mostraron una preferencia consistente, explorando por igual a ambos tipos de demostradores durante toda la sesión (Figura 6B centro). Cuando analizamos las preferencias a nivel individual, encontramos que cada mutante pudo discriminar entre demostradores y desarrollar una preferencia por uno en particular

(Figura 6D). Sin embargo, a nivel grupal, los mutantes no establecieron un sesgo de preferencia basado en el estado afectivo de sus congéneres, como sí observamos en los controles (Figura 6C). En un experimento independiente, encontramos un patrón de comportamiento similar en ratones *wild type* de la línea C57Bl/6J expuestos simultáneamente a dos demostradores neutrales (Figura 6B derecha): a nivel grupal, mostraron una preferencia aleatoria por cualquiera de los demostradores (Figura 6D derecha), aunque a nivel individual exhibieron una preferencia por uno de estos congéneres (Figura 6E derecha), probablemente influenciada por variables no controladas y distintas al estado afectivo. Es importante destacar que el déficit en la discriminación afectiva no puede atribuirse a diferencias en la exploración general de la arena (Figura 6F), el orden de la primera interacción (Figura 6G) o la ubicación de los demostradores en relación con el punto de inicio del ratón evaluado (Figura 6H). Además, el tiempo dedicado a interactuar con los demostradores en los últimos 4 minutos de la prueba fue comparable entre los grupos (Figura 6I), indicando niveles de motivación similares. Estos resultados sugieren que los ratones *Grin1* KO tienen dificultades para reconocer el estado emocional de congéneres novedosos, una habilidad crucial para distinguir entre estímulos sociales en este paradigma.

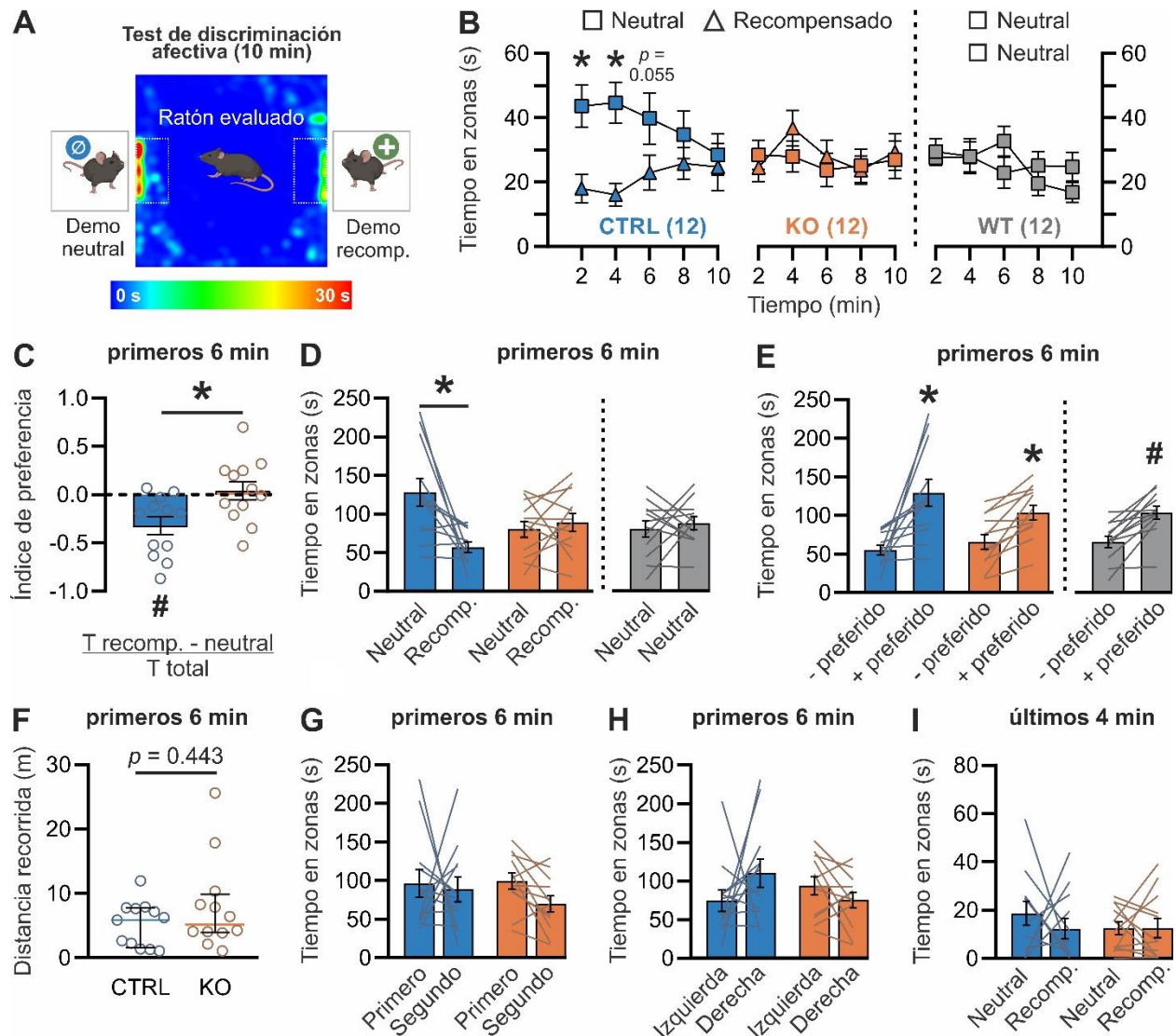
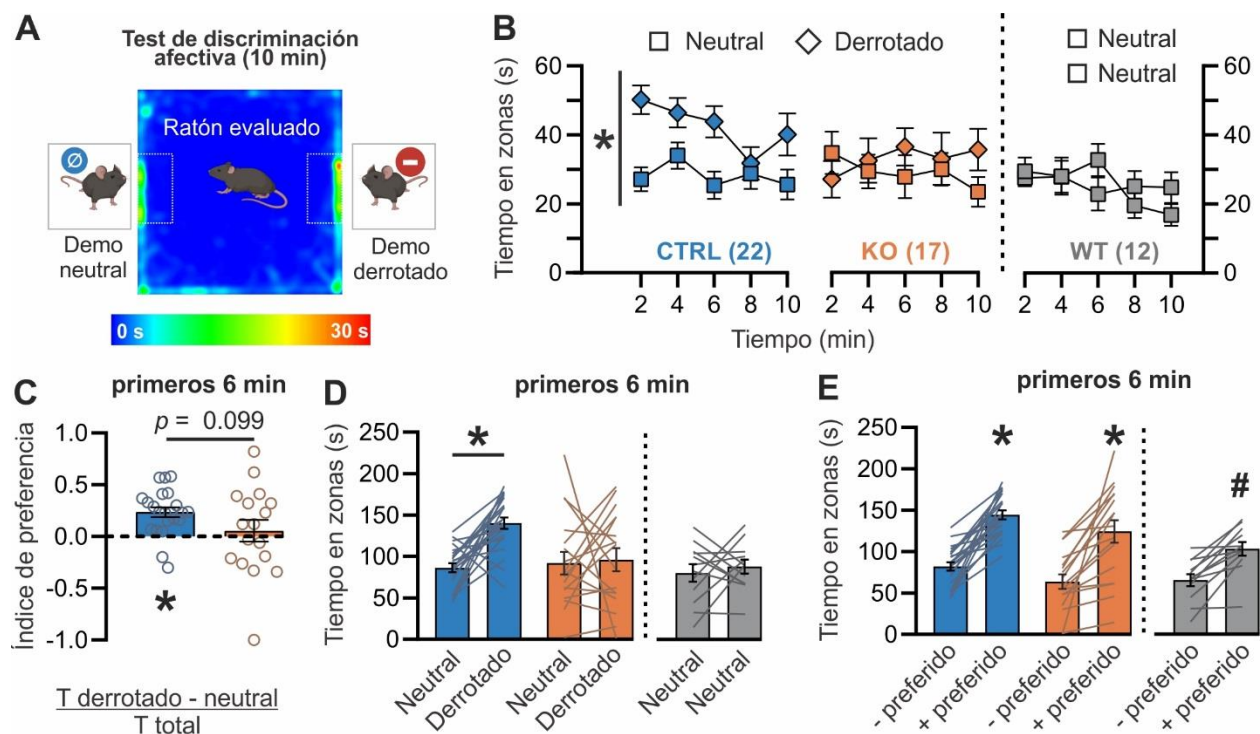


Figura 6. El mutante *Grin1* KO presenta un déficit en la discriminación de estados afectivos. **A.** Mapa de calor de la posición de la cabeza de un control representativo durante toda la sesión, donde el azul y el rojo indican los tiempos de exploración más bajos y más altos, respectivamente. Las zonas virtuales fueron representadas con líneas punteadas. **B.** Tiempos de exploración durante la prueba de discriminación de estados afectivos en la sesión de diez minutos. (*Izquierda*) Los ratones control mostraron un sesgo de exploración hacia el demostrador neutral en comparación con el recompensado (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tiempo x demostrador: $F_{4,88} = 2.051$, $p = 0.094$; factor demostrador: $F_{1,22} = 8.653$, $p = 0.008$; prueba *post hoc* de Bonferroni: $* p \leq 0.05$ vs. demostrador recompensado). (*Centro*) Los ratones *Grin1* KO no mostraron ninguna preferencia durante la sesión de diez minutos (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tiempo x demostrador: $F_{4,88} = 0.805$, $p = 0.525$; factor demostrador: $F_{1,22} = 0.151$, $p = 0.702$). (*Derecha*) Los ratones *wild type* no mostraron un sesgo de exploración cuando fueron expuestos a dos demostradores neutrales (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tiempo x demostrador: $F_{4,88} = 1.929$, $p = 0.113$; factor demostrador: $F_{1,22} = 0.080$, $p = 0.779$). **C.** En los primeros 6 minutos de la prueba, la discriminación afectiva fue significativamente diferente entre los grupos (prueba de t no pareada: $t_{22} = 2.732$, $* p = 0.012$). En los controles, el índice de preferencia fue significativamente diferente del nivel de chance, indicado con una línea punteada (prueba de t de una muestra: $t_{11} = 3.526$, $\# p = 0.005$). **D.** Tiempo de exploración de los demostradores durante los primeros 6 minutos de la prueba. (*Izquierda*) En los controles, la exploración social se sesgó sistemáticamente hacia el demostrador neutral, mientras que fue aleatoria en los ratones *Grin1* KO (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción genotipo x demostrador: $F_{1,22} = 9.398$, $p = 0.006$; prueba *post hoc* de Bonferroni: $* p \leq 0.01$ vs. demostrador recompensado en controles). (*Derecha*) No hubo un sesgo de exploración en el grupo *wild type* expuesto a dos demostradores neutrales (prueba de t pareada: $t_{11} = 0.589$, $p = 0.567$). **E.** Tiempo de exploración durante los primeros 6 minutos según el grado de preferencia hacia los demostradores. (*Izquierda*) No se encontraron diferencias entre los ratones *Grin1* KO y los controles (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción preferencia x genotipo: $F_{1,22} = 2.367$, $p = 0.138$; factor genotipo: $F_{1,22} = 0.453$, $p = 0.508$; $* p \leq 0.001$ factor preferencia: $F_{1,22} = 23.86$, $p \leq 0.001$). (*Derecha*) En el grupo *wild type*, hubo una diferencia significativa en la exploración de los demostradores menos y más preferidos (prueba de t pareada: $t_{11} = 5.113$, $\# p \leq 0.001$). **F.** Actividad locomotora durante los primeros 6 minutos (prueba de Mann-Whitney: $U = 58$, $p = 0.443$). **G.** Tiempo de exploración durante los primeros 6 minutos categorizado según el orden en que los demostradores fueron inicialmente abordados (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{1,22} = 0.441$, $p = 0.513$; factor genotipo: $F_{1,22} = 0.453$, $p = 0.508$; factor orden: $F_{1,22} = 1.294$, $p = 0.268$). **H.** La exploración social en los primeros 6 minutos no se vio afectada por la ubicación espacial de los demostradores (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{1,22} = 2.944$, $p = 0.100$; factor genotipo: $F_{1,22} = 0.452$, $p = 0.508$; factor ubicación: $F_{1,22} = 0.284$, $p = 0.600$). **I.** Tiempo de exploración de cada demostrador durante los últimos 4 minutos de la prueba (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{1,22} = 0.480$, $p = 0.496$; factor genotipo: $F_{1,22} = 0.835$, $p = 0.371$; factor demostrador: $F_{1,22} = 0.428$, $p = 0.520$). Los resultados se expresan como mediana con rango intercuartil para F y como media $\pm$ SEM para el resto de la figura. CTRL: ratones control ($n = 12$); KO: ratones *Grin1* KO ($n = 12$); WT: ratones C57Bl/6 *wild type* ($n = 12$).

Para determinar si el déficit en los mutantes *Grin1* KO se limitaba a estados afectivos resultantes de experiencias placenteras o si se trataba de un fenotipo generalizable a otras valencias, evaluamos a los animales en la versión aversiva del paradigma de discriminación afectiva (Figuras M3 D-F y 7A). Aquí, los ratones control discriminaron entre los dos tipos de demostradores, dedicando significativamente más tiempo a explorar al demostrador derrotado, lo que fue particularmente evidente durante los primeros minutos de la prueba (Figura 7B). El sesgo de preferencia del grupo control contrastó con la falta de preferencia mostrada por los ratones *Grin1* KO, cuyo índice de preferencia no difirió significativamente del azar (Figura 7C). En consonancia con los resultados obtenidos en la versión apetitiva de la prueba, a nivel grupal los mutantes exploraron ambos demostradores de manera equivalente, sin mostrar signos de discriminación basada en estados afectivos, en contraste con lo observado en los controles (Figura 7D). A nivel individual, cada mutante mostró una preferencia por un demostrador particular, independiente del estado afectivo inducido experimentalmente en dicho animal (Figura 7E). En sintonía con la prueba apetitiva, las diferencias observadas entre los grupos experimentales no pudieron ser explicadas por factores ajenos al estado afectivo, como los niveles de actividad locomotora (Figuras 7F), el orden de la primera interacción (Figura 7G), la ubicación de los demostradores en relación con el punto de inicio del ratón evaluado (Figura 7H), ni el tiempo dedicado a interactuar con los demostradores durante los últimos 4 minutos de la prueba (Figura 7I).



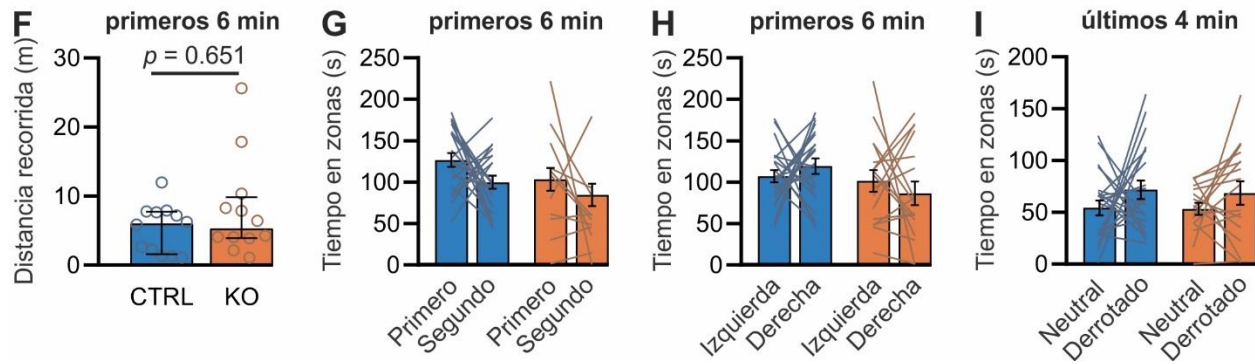


Figura 7. El déficit de discriminación de los ratones *Grin1* KO se extiende a diferentes valencias afectivas.

A. Mapa de calor de la posición de la cabeza de un control representativo durante toda la sesión, donde el azul y el rojo indican los tiempos de exploración más bajos y más altos, respectivamente. Las zonas virtuales fueron representadas con líneas punteadas. **B.** Tiempos de exploración durante la prueba de discriminación de estados afectivos en la sesión de diez minutos. (*Izquierda*) Los ratones control mostraron un sesgo significativo de exploración hacia el demostrador socialmente derrotado (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tiempo x demostrador: $F_{4,168} = 1.672$, $p = 0.159$; * factor demostrador: $F_{1,42} = 16.13$, $p \leq 0.001$). (*Derecha*) Los ratones *Grin1* KO no mostraron un sesgo de preferencia (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción tiempo x demostrador: $F_{4,128} = 1.235$, $p = 0.299$; factor demostrador: $F_{1,32} = 0.508$, $p = 0.481$). A los efectos de comparación, se muestran nuevamente los resultados del grupo *wild type* de la Figura 6. **C.** En los primeros 6 minutos de la prueba, la preferencia por explorar demostradores con diferentes estados afectivos no fue significativamente diferente entre los grupos (prueba de t no pareada: $t_{37} = 1.694$, $p = 0.099$). Sin embargo, el índice de preferencia fue significativamente diferente de chance (línea discontinua) sólo en los ratones control (prueba de t de una muestra: $t_{21} = 4.983$, * $p \leq 0.01$). **D.** En los controles, la exploración social se sesgó sistemáticamente hacia el demostrador derrotado, mientras que en los ratones *Grin1* KO fue aleatoria (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción demostrador x genotipo: $F_{1,37} = 5.607$, $p = 0.023$; prueba *post hoc* de Bonferroni: * $p \leq 0.001$ vs. demostrador neutral para controles). **E.** Tiempo de exploración durante los primeros 6 minutos según el grado de preferencia hacia los demostradores. No se encontraron diferencias entre los ratones *Grin1* KO y los controles (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción preferencia x genotipo: $F_{1,37} = 0.012$, $p = 0.911$; factor genotipo: $F_{1,37} = 4.297$, $p = 0.045$; * factor preferencia: $F_{1,37} = 74.70$, $p \leq 0.001$). **F.** La actividad locomotora durante los primeros 6 minutos fue equivalente entre los grupos (prueba de t no pareada: $t_{41} = 0.456$, $p = 0.651$). **G.** Tiempo de exploración durante los primeros 6 minutos categorizado según el orden en que los demostradores fueron inicialmente abordados (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{1,37} = 0.112$, $p = 0.740$; factor genotipo: $F_{1,37} = 4.297$, $p = 0.045$; factor orden: $F_{1,37} = 3.713$, $p = 0.062$). **H.** La exploración social en los primeros 6 minutos no se vio afectada por la ubicación espacial de los demostradores (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{1,37} = 1.244$; $p = 0.272$; factor genotipo: $F_{1,37} = 4.297$; $p = 0.045$; factor ubicación: $F_{1,37} = 0.012$; $p = 0.912$). **I.** Tiempo de exploración de cada demostrador durante los últimos 4 minutos de la prueba (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{1,37} = 0.013$, $p = 0.911$; factor genotipo: $F_{1,37} = 0.081$, $p = 0.777$; factor demostrador: $F_{1,37} = 2.687$, $p = 0.110$). Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar de la media (SEM). CTRL: ratones control ($n = 22$); KO: ratones *Grin1* KO ($n = 17$); WT: ratones C57Bl/6 *wild type* ($n = 12$).

Dado que la corteza prefrontal medial ha sido implicada en la discriminación de estados afectivos en roedores [12, 23, 28, 29] y se encuentra afectada en pacientes con esquizofrenia [155-157], nos propusimos evaluar si dicha región es reclutada diferencialmente en los controles y mutantes durante la versión aversiva de nuestra prueba de discriminación afectiva. A tal efecto, noventa minutos después de la misma, un subgrupo de ratones control y *Grin1* KO fue anestesiado profundamente y perfundido para estudiar la expresión del marcador de actividad neuronal c-Fos a través de ensayos de inmunofluorescencia, comparándose los niveles de expresión entre ambos grupos (Figura 8A y B). Llamativamente, encontramos que la densidad de neuronas inmunomarcadas en la corteza prefrontal medial se redujo significativamente en los mutantes en comparación con los controles (Figura 8C).

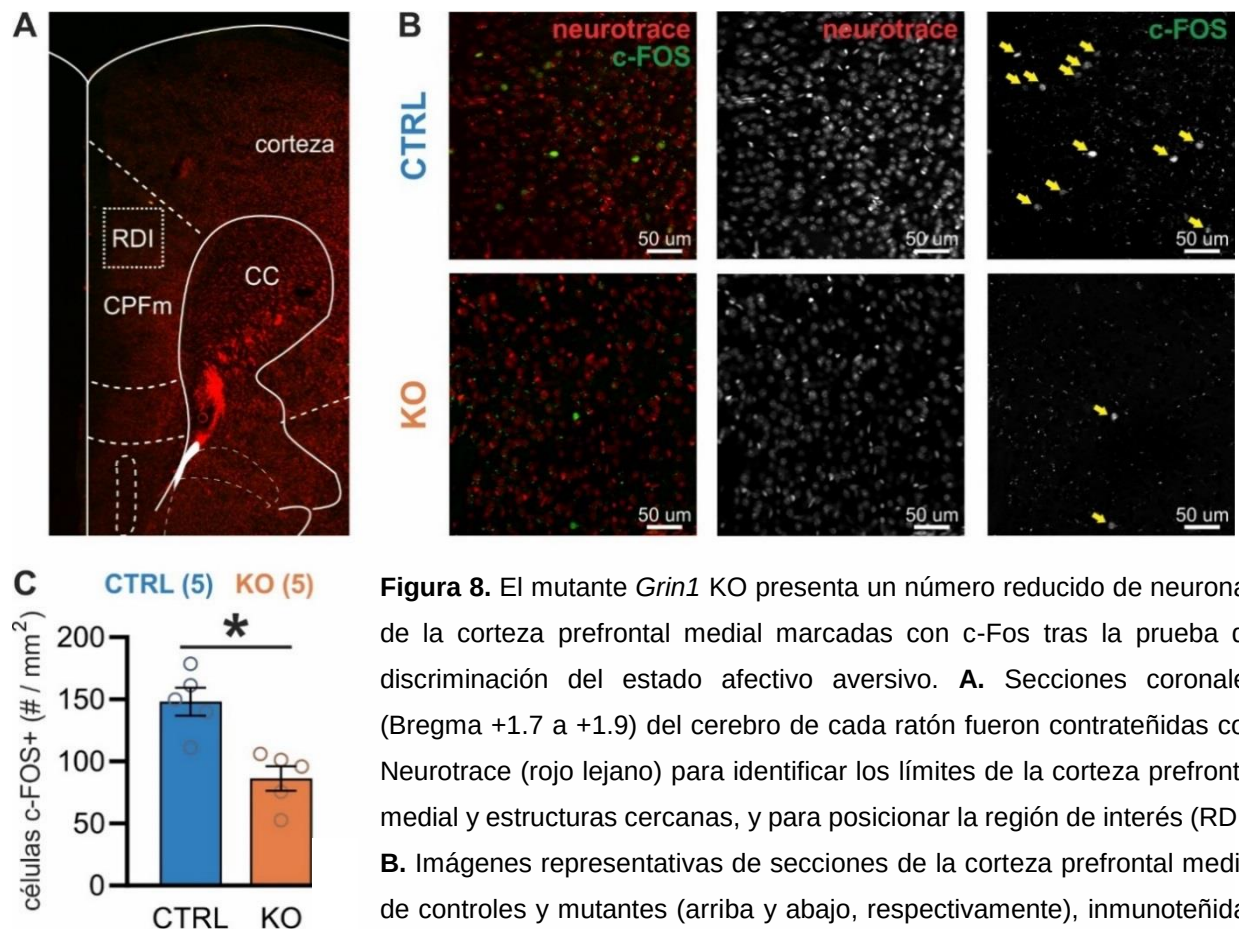


Figura 8. El mutante *Grin1* KO presenta un número reducido de neuronas de la corteza prefrontal medial marcadas con c-Fos tras la prueba de discriminación del estado afectivo aversivo. **A.** Secciones coronales (Bregma +1.7 a +1.9) del cerebro de cada ratón fueron contrateñidas con Neurotrace (rojo lejano) para identificar los límites de la corteza prefrontal medial y estructuras cercanas, y para posicionar la región de interés (RDI). **B.** Imágenes representativas de secciones de la corteza prefrontal medial de controles y mutantes (arriba y abajo, respectivamente), inmunoteñidas para c-Fos (verde) y Neurotrace (rojo). Las flechas amarillas indican las neuronas positivas para c-Fos. **C.** Cuantificación de las células positivas para c-Fos en relación con el área de la RDI. Los ratones *Grin1* KO mostraron un marcado neuronal significativamente menor en comparación con los controles luego de la versión aversiva de la prueba de discriminación de estados aversivos (prueba de t no pareada: $t_8 = 4.129$, * $p = 0.003$). Cada punto representa la densidad promedio de 3 a 6 cuantificaciones independientes por animal. Los esquemas se adaptaron del Allen Mouse Brain Atlas. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. CTRL: ratones control (n = 5); KO: ratones *Grin1* KO (n = 5); CC: cuerpo calloso; CPFm: corteza prefrontal medial. Estos resultados se obtuvieron en colaboración con Martina Gómez Acosta.

neuronas positivas para c-Fos. **C.** Cuantificación de las células positivas para c-Fos en relación con el área de la RDI. Los ratones *Grin1* KO mostraron un marcado neuronal significativamente menor en comparación con los controles luego de la versión aversiva de la prueba de discriminación de estados aversivos (prueba de t no pareada: $t_8 = 4.129$, * $p = 0.003$). Cada punto representa la densidad promedio de 3 a 6 cuantificaciones independientes por animal. Los esquemas se adaptaron del Allen Mouse Brain Atlas. Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. CTRL: ratones control (n = 5); KO: ratones *Grin1* KO (n = 5); CC: cuerpo calloso; CPFm: corteza prefrontal medial. Estos resultados se obtuvieron en colaboración con Martina Gómez Acosta.

En conjunto, estos resultados confirman la existencia de un déficit en la discriminación de estados afectivos en ratones mutantes que carecen del receptor NMDA en interneuronas GABAérgicas de la corteza y el hipocampo desde etapas tempranas del desarrollo posnatal.

2.2. Preferencia social, reconocimiento social y ansiedad

La incapacidad de los ratones *Grin1* KO para discriminar entre congéneres en función de sus estados afectivos podría deberse a un déficit más amplio en el comportamiento social. Con el fin de evaluar la capacidad de los ratones mutantes de reconocer estímulos sociales *per se*, llevamos a cabo la prueba de preferencia social descrita previamente (Figuras M2 A-D y 9A). Tanto en los controles como en los mutantes, observamos una marcada preferencia por la exploración del estímulo social en comparación con un objeto, sin diferencias significativas entre grupos en el tiempo de exploración (Figura 9C y D), en el curso temporal de las interacciones (Figura 9B) o en otras variables relacionadas, como la distancia total recorrida (Figura 9E), el número de entradas a las zonas (Figura 9F) y la duración promedio de las visitas a las mismas (Figura 9G). Estos resultados sugieren que los ratones *Grin1* KO, al igual que los controles, pueden reconocer un congénere como un estímulo socialmente relevante, considerándolo más atractivo que uno inanimado y novedoso.

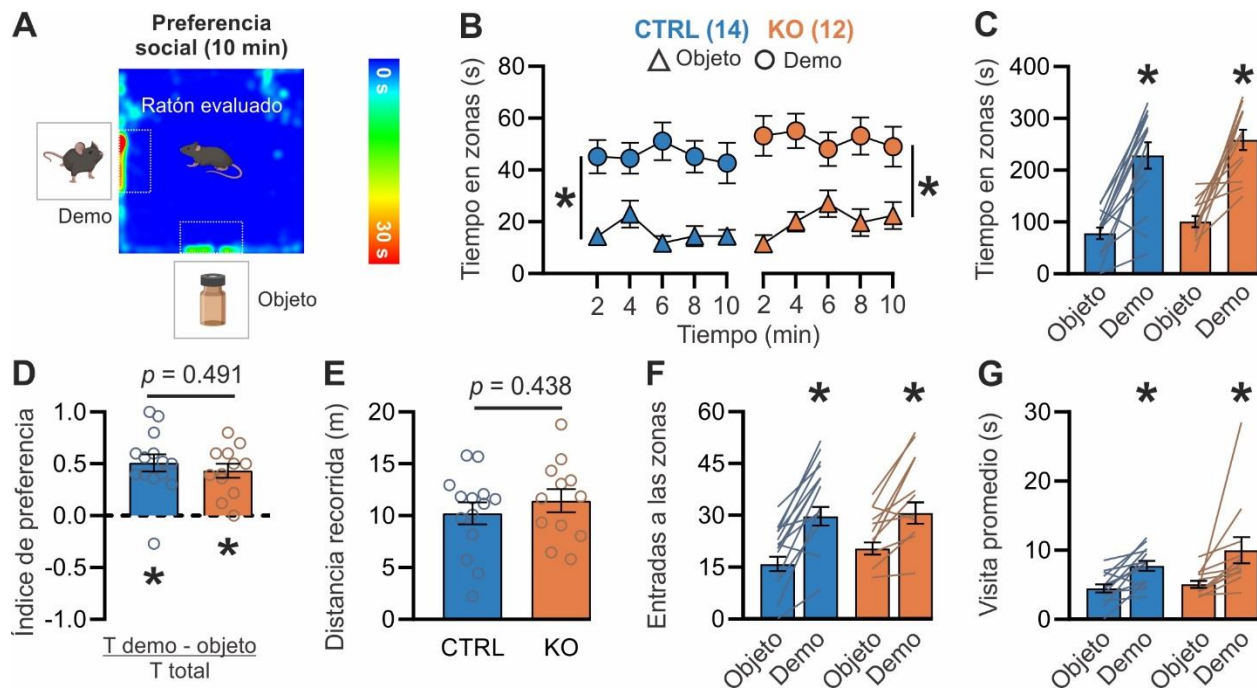


Figura 9. El mutante *Grin1* KO no presenta alteraciones en la preferencia social. **A.** Mapa de calor de la posición de la cabeza de un control representativo durante toda la sesión, donde el azul y el rojo indican los tiempos de exploración más bajos y más altos, respectivamente. Las zonas virtuales fueron representadas con líneas punteadas. **B.** Ambos grupos pasaron más tiempo en la zona del demostrador que en la zona del objeto durante los diez minutos de la prueba (CTRL: ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{4,104} = 1.243$, $p = 0.297$; factor tiempo: $F_{4,104} = 0.486$, $p = 0.746$; factor estímulo:

$F_{1,26} = 28.80$, $p \leq 0.001$; KO: ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{4,88} = 0.971$, $p = 0.428$; factor tiempo: $F_{4,88} = 0.278$, $p = 0.891$; factor estímulo: $F_{1,22} = 48.69$, $p \leq 0.001$). **C.** Tanto los ratones control como los *Grin1* KO pasaron más tiempo explorando al demostrador que al objeto (ANOVA de dos vías de medidas repetidas; interacción genotipo x estímulo: $F_{1,24} = 0.043$, $p = 0.837$; factor genotipo: $F_{1,24} = 1.890$, $p = 0.182$; * factor estímulo: $F_{1,24} = 75.62$, $p \leq 0.001$). **D.** La preferencia social no fue significativamente diferente entre los grupos (prueba de t no pareada: $t_{24} = 0.70$, $p = 0.491$). El índice de preferencia fue significativamente diferente al nivel de chance (línea punteada) tanto en los ratones control como en los *Grin1* KO (pruebas de t de una muestra: CTRL: $t_{13} = 6.128$, * $p \leq 0.001$ *; KO: $t_{11} = 6.363$, * $p \leq 0.001$). **E.** La actividad locomotora fue equivalente entre los grupos (prueba de t no pareada: $t_{24} = 0.789$, $p = 0.438$). **F.** El número acumulado de entradas a la zona social fue mayor que a la zona no social en ambos grupos experimentales (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{1,24} = 1.242$, $p = 0.276$; factor genotipo: $F_{1,24} = 0.773$, $p = 0.388$; * factor estímulo: $F_{1,24} = 57.41$, $p \leq 0.001$). **G.** Finalmente, la duración promedio de la visita a la zona del demostrador fue significativamente mayor que a la zona del objeto en ambos grupos (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{1,24} = 0.731$, $p = 0.401$; factor genotipo: $F_{1,24} = 1.675$, $p = 0.208$; * factor estímulo: $F_{1,24} = 17.92$, $p \leq 0.001$). Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. CTRL: ratones control (n = 14); KO: ratones *Grin1* KO (n = 12).

Nuestro equipo reportó previamente que los ratones *Grin1* KO presentan un déficit en la memoria de trabajo [145]. Por lo tanto, el deterioro observado en la discriminación afectiva podría ser secundario a la incapacidad de recordar una interacción reciente con un demostrador, percibiéndolo como desconocido en un encuentro posterior durante el transcurso mismo de la prueba. Para evaluar la capacidad de los ratones de discriminar congéneres según su novedad, realizamos el test de reconocimiento social descrito previamente (Figuras M2 E-H y 10A).

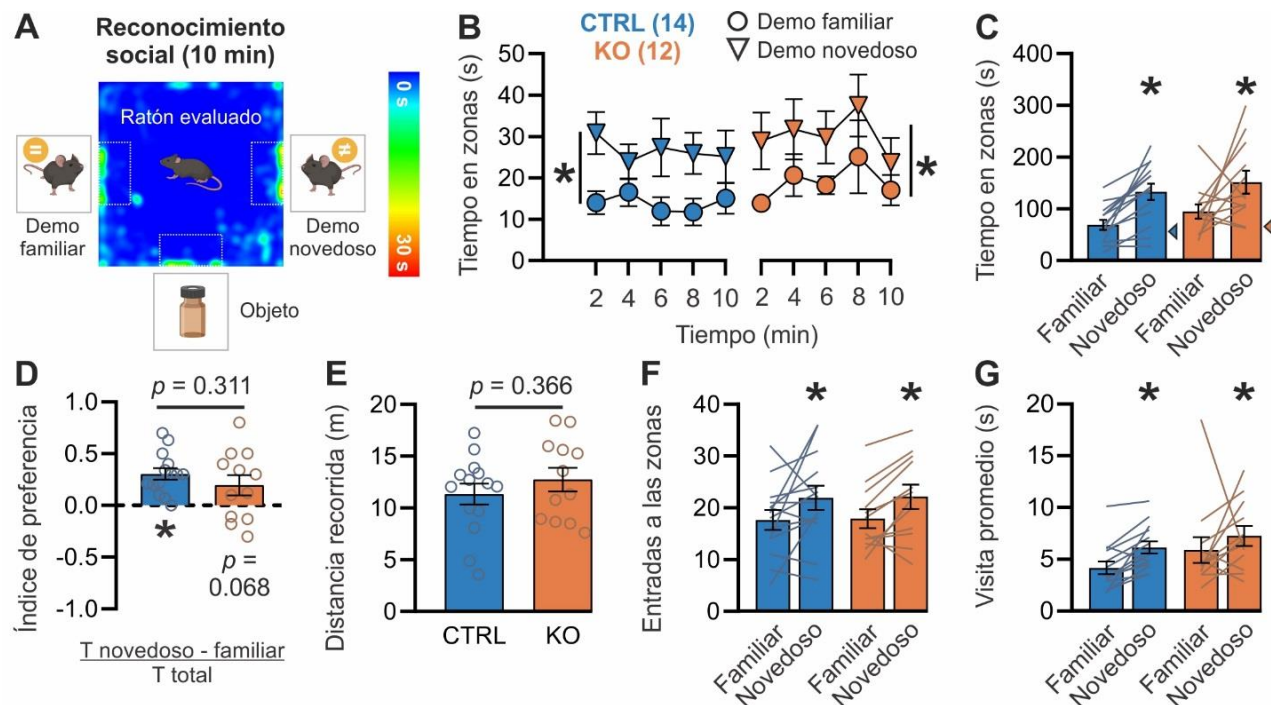


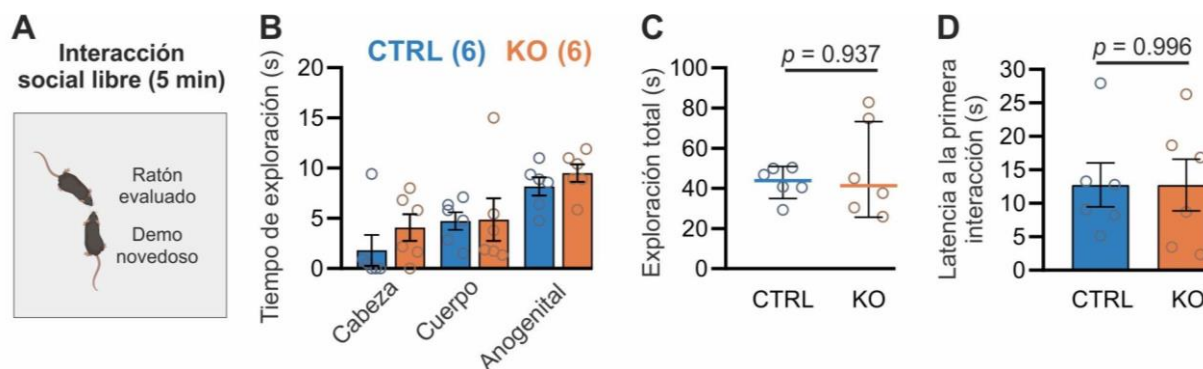
Figura 10. El mutante *Grin1* KO no presenta alteraciones en el reconocimiento social. **A.** Mapa de calor de la posición de la cabeza de un control representativo durante toda la sesión, donde el azul y el rojo indican los tiempos de exploración más bajos y más altos, respectivamente. Las zonas virtuales fueron representadas con líneas punteadas. **B.** Al igual que los controles, los ratones *Grin1* KO pasaron más tiempo en la zona del demostrador novedoso que en la del demostrador familiar durante toda la prueba (CTRL: ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{4,104} = 0.424$, $p = 0.791$; factor tiempo: $F_{4,104} = 0.195$, $p = 0.941$; factor estímulo: $F_{1,26} = 12.16$, $p = 0.002$; KO: ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{4,88} = 0.169$, $p = 0.954$; factor tiempo: $F_{4,88} = 1.374$, $p = 0.250$; factor estímulo: $F_{1,22} = 4.732$, $p = 0.041$). **C.** Hubo una exploración sesgada hacia el demostrador novedoso en ambos grupos (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción genotipo x demostrador: $F_{1,24} = 0.055$, $p = 0.817$; factor genotipo: $F_{1,24} = 1.942$, $p = 0.176$; * factor demostrador: $F_{1,24} = 15.46$, $p \leq 0.001$). Las cabezas de flecha indican el tiempo promedio que cada grupo pasó en la zona del objeto. **D.** La preferencia por la novedad social no fue significativamente distinta entre los grupos (prueba de t no pareada: $t_{24} = 1.035$, $p = 0.311$). El índice de preferencia fue significativamente diferente del nivel de chance (línea discontinua) en los controles y cercano a la significancia en los ratones *Grin1* KO (pruebas de t de una muestra: CTRL: $t_{13} = 5.665$, * $p \leq 0.001$; KO: $t_{11} = 2.024$, $p = 0.068$). **E.** La actividad locomotora fue equivalente entre los grupos (prueba de t no pareada: $t_{24} = 0.921$, $p = 0.366$). **F.** En sintonía con los controles, los mutantes *Grin1* KO entraron en la zona del demostrador novedoso más veces que en la zona del demostrador familiar (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{1,24} = 0.0002$, $p = 0.990$; factor genotipo: $F_{1,24} = 0.009$, $p = 0.925$; * factor estímulo: $F_{1,24} = 9.391$, $p = 0.005$). **G.** En ambos grupos, la duración promedio de la visita al demostrador novedoso fue significativamente mayor que al demostrador familiar (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{1,24} = 0.150$, $p = 0.702$; factor genotipo: $F_{1,24} = 2.290$, $p = 0.143$; * factor estímulo: $F_{1,24} = 4.716$, $p = 0.04$). Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. CTRL: ratones control ($n = 14$); KO: ratones *Grin1* KO ($n = 12$).

Conforme a lo esperado, los controles dedicaron más tiempo a interactuar con el demostrador novedoso que con el familiar (Figura 10B-D). Por su parte, los mutantes mostraron un comportamiento similar, sin diferencias significativas con los controles (Figura 10B-G). Estos resultados indican que los ratones *Grin1* KO son capaces de discriminar un estímulo social en función de su novedad.

Además del déficit mencionado en la memoria de trabajo, estudios previos reportaron que los ratones *Grin1* KO pueden presentar comportamientos de tipo ansioso en contextos específicos [145, 173]. Cabe especular entonces que el déficit en la discriminación afectiva podría derivar de un comportamiento de evitación social inducido por la ansiedad. Por este motivo, también evaluamos a los ratones mutantes en una prueba de interacción social libre con demostradores *wild type* novedosos en una arena abierta (Figura 11A), que puede considerarse como un contexto más ansiogénico que el del paradigma de discriminación afectiva, en el cual se limita el comportamiento del demostrador mediante el confinamiento en el módulo con la malla de alambre. En esta oportunidad, ambos grupos experimentales mostraron un patrón similar de

comportamientos exploratorios (Figura 11B), pasaron tiempos comparables interactuando con el congénere (Figura 11C) y se aproximaron por primera vez al demostrador con una latencia similar (Figura 11D). Estos resultados sugieren que el déficit en la discriminación de estados afectivos no fue causado por evitación social inducida por niveles diferenciales de ansiedad.

Globalmente, nuestros hallazgos indican que la ablación posnatal temprana del receptor NMDA en interneuronas corticolímbicas produce un déficit en la discriminación de estados afectivos en los congénere que no deriva de alteraciones en el comportamiento exploratorio, en la preferencia y reconocimiento social, o en los niveles de ansiedad del mutante *Grin1* KO.



2.3. Funcionamiento social en diferentes contextos

Como se ha señalado previamente, las alteraciones en el procesamiento afectivo son un buen predictor de la disfunción social en pacientes con esquizofrenia [79-83], la cual se manifiesta en dificultades para asumir roles y adaptarse a las normas que regulan distintos entornos sociales [86, 87]. En este marco, evaluamos el impacto de la ablación del receptor NMDA sobre la dinámica social en diferentes contextos.

Para determinar si los ratones *Grin1* KO pueden integrarse normalmente en una jerarquía social, evaluamos a los compañeros de una misma jaula en el test del tubo (Figura 12A). En términos generales, los ratones mutantes y controles formaron jerarquías sociales estables de tipo transitivo [164], con rangos individuales consistentes en días consecutivos de testeo

(Figura 12C). Sin embargo, los ratones *Grin1* KO mostraron una probabilidad significativamente menor al azar de ganar enfrentamientos contra oponentes de tipo control (14%, 11 de 76 peleas, prueba de chi-cuadrado contra el azar, $p \leq 0.001$). En sintonía con lo antedicho, los análisis de distribución de rangos mostraron que los mutantes fueron relegados de las posiciones dominantes dentro de la jerarquía y consistentemente ocuparon las posiciones más subordinadas en todas las jaulas (Figura 12B). Finalmente, encontramos diferencias significativas en el puntaje de David, una métrica alternativa de dominancia [166] que evidenció un rango inferior para los ratones *Grin1* KO dentro de la jerarquía (Figura 12D). Es importante señalar que la incapacidad de los mutantes para integrarse normalmente en la estructura social no puede atribuirse a diferencias en el peso corporal, ya que el mismo fue equivalente entre grupos (Figura 12E).

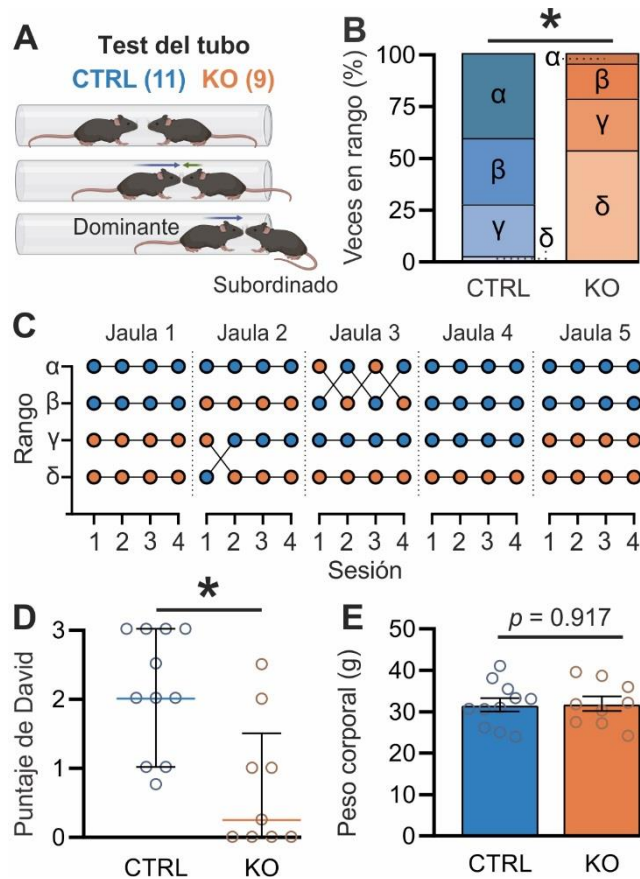


Figura 12. El mutante *Grin1* KO muestra un perfil de subordinación dentro de la jerarquía social. **A.** Los mutantes fueron evaluados en el test del tubo junto a sus compañeros control de la misma jaula y camada. Esta prueba se llevó a cabo utilizando un diseño de todos contra todos. **B.** Distribución de los rangos en ambos grupos experimentales. Hubo diferencias significativas entre grupos en la proporción de veces que ocuparon los rangos más altos dentro de la jerarquía social (prueba de chi-cuadrado: $\chi^2_3 = 31.92$, $* p \leq 0.001$). **C.** Representación esquemática de los rangos a lo largo de las cuatro sesiones para todas las jaulas evaluadas. A lo largo del test, se encontraron jerarquías sociales estables en las que los mutantes ocuparon siempre la posición más subordinada. **D.** Las diferencias de rangos entre grupos fueron confirmadas además mediante la

puntuación normalizada de David (prueba de Mann-Whitney: $U = 15$, $* p = 0.006$). **E.** El peso corporal durante la prueba fue equivalente entre los grupos (prueba de t no pareada: $t_{18} = 0.106$, $p = 0.917$). Los resultados se expresan como mediana con rango intercuartílico para D y media $\pm$ SEM para el resto de la figura. CTRL: ratones de control ($n = 11$); KO: ratones *Grin1* KO ($n = 9$).

Con el fin de evaluar otras dimensiones del funcionamiento social de los ratones *Grin1* KO, llevamos a cabo la prueba de residente-intruso. En condiciones controladas, los ratones macho tienden a desarrollar conductas de defensa territorial frente a la presencia de intrusos, especialmente cuando pudieron habituarse y establecer control sobre un espacio determinado.

Este tipo de comportamiento, expresado frecuentemente mediante agresión hacia congéneres desconocidos, cumple un rol adaptativo en la organización social, ya que permite regular el acceso a recursos limitados, definir jerarquías de dominancia y mantener la estabilidad del entorno social inmediato [167]. Desde esta perspectiva, la agresión no constituye simplemente una respuesta reactiva, sino una estrategia socialmente relevante con valor funcional en contextos naturales. En el test de residente-intruso, utilizamos como residentes a ratones control y *Grin1* KO que habían sido alojados individualmente durante una semana y estudiamos su respuesta ante la intrusión de ratones machos adultos y desconocidos de tipo *wild type* (Figura 13A). Conforme a lo esperado, tras un breve período de investigación social, alrededor del 90% de los controles identificó al demostrador como un intruso y defendió agresivamente su territorio. En contraste, sólo una minoría de los mutantes *Grin1* KO inició un ataque dirigido a expulsar al intruso (Figura 13B). Al considerar solamente los residentes que atacaron, ambos grupos experimentales mostraron latencias de ataque comparables (Figura 13C y D), dedicaron un tiempo similar a la exploración del intruso antes del primer ataque (Figura 13E) y pasaron un tiempo equivalente atacando (Figura 13E). Esto sugiere que los ratones *Grin1* KO no presentan dificultades en la ejecución del comportamiento agresivo sino en la transición entre la exploración social y la defensa activa del territorio.

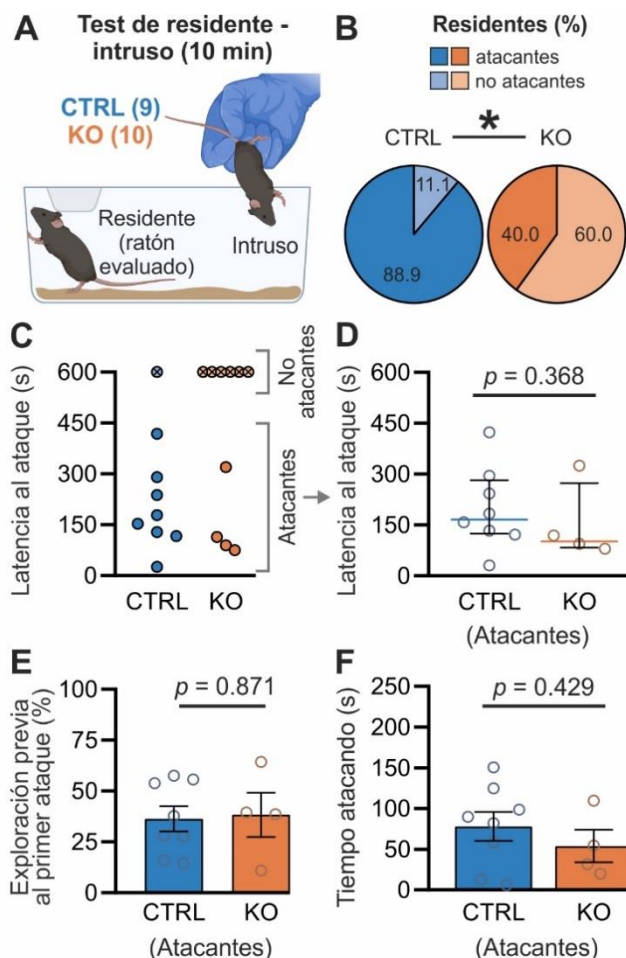


Figura 13. El mutante *Grin1* KO exhibe una reducción en el comportamiento agresivo destinado a defender su territorio. **A.** Los mutantes y sus controles fueron enfrentados en sus jaulas a un congénere C57Bl/6 adulto y novedoso durante 10 minutos en el paradigma de residente - intruso. **B.** La proporción de residentes que atacaron fue significativamente menor en los ratones *Grin1* KO que en los controles (prueba de chi-cuadrado: $\chi^2_1 = 4.866$, $*p = 0.027$). **C-D.** En los residentes que atacaron, la latencia al primer ataque fue equivalente entre los controles y mutantes (prueba de Mann-Whitney: $U = 10$, $p = 0.368$). Los animales que no atacaron se indican con un círculo tachado. **E.** El tiempo en exploración no agresiva previa al primer ataque fue equivalente entre los grupos experimentales (prueba de t no pareada: $t_{10} = 0.166$, $p = 0.871$). **F.** Los residentes *Grin1* KO dedicaron un tiempo similar a los controles atacando a sus respectivos

intrusos (prueba de t no pareada: $t_{10} = 0.825$, $p = 0.429$). Los resultados se expresan como mediana con rango intercuartílico para D y media $\pm$ SEM para el resto de la figura. CTRL: ratones control (n = 9); KO: ratones *Grin1* KO (n = 10).

Globalmente, nuestros hallazgos indican que la ablación posnatal temprana del receptor NMDA en interneuronas corticolímbicas conduce a dificultades funcionales en diferentes contextos de tipo social, involucrando compañeros de jaula como congéneres desconocidos.

2.4. Interacción social prolongada

Las alteraciones en el reconocimiento emocional pueden afectar profundamente la formación y el mantenimiento de las relaciones con pares, derivando potencialmente en retraimiento social, definido como una desvinculación de las actividades sociales [89]. En roedores, los minutos iniciales de interacción con un congénere se han utilizado como un indicador de sociabilidad en diversas tareas. Como resultado, los aspectos del comportamiento social posteriores a la fase inicial de aproximación y reconocimiento han sido frecuentemente ignorados. Para evaluar el impacto de la hipofunción del receptor NMDA en la interacción social prolongada, desarrollamos una prueba que denominamos *Eight-Arm Sociality Task* o EAST (Figura M4). Este paradigma permite evaluar simultáneamente y durante varias horas consecutivas el comportamiento de ocho ratones individuales en un laberinto radial, que pueden explorar un módulo con un objeto inanimado en el extremo de cada brazo o cuatro ratones *wild type* desconocidos en la zona central del aparato (Figura 14A). En nuestro caso, el testeó abarcó la última hora de la fase de luz (*Luz 1*), las doce horas de la fase de oscuridad (*Oscura*) y la primera hora de la fase de luz subsiguiente (*Luz 2*), totalizando 14 horas consecutivas de grabación y monitoreo de la posición de cada ratón evaluado.

En consonancia con los resultados obtenidos en la prueba de preferencia social (Figura 9A), durante la fase de luz 1 los ratones control y *Grin1* KO recorrieron activamente los brazos del laberinto y mostraron tiempos de exploración significativamente mayores del extremo social con respecto al del objeto (Figura 14B y C). En esta fase, no observamos diferencias significativas en los índices de preferencia social entre los grupos (Figura 14D). Durante la fase oscura, la actividad global de ambos grupos experimentales disminuyó gradualmente (Figura 14G y H). En los controles, el sesgo de exploración a favor de la zona social se mantuvo hasta la mitad de esta fase, con una investigación más equilibrada de ambos extremos de los brazos en la segunda mitad de la misma (Figura 14C). Además, la ubicación promedio de estos animales se mantuvo cercana al centro de los brazos, coincidiendo con las fuentes de comida y agua (Figura 14E y F). Al igual que en los controles, los ratones *Grin1* KO mostraron una mayor exploración de la zona social durante la primera mitad de la fase oscura pero, a diferencia de los mismos, aumentaron progresivamente la exploración de la zona del objeto hasta alcanzar su pico en la hora final de

esta fase (Figura 14C). Esa tendencia también se reflejó en la ubicación promedio de los ratones mutantes a lo largo de la fase oscura (Figura 14E). Durante la fase de luz 2, las diferencias entre los ratones controles y mutantes se hicieron evidentes, sugiriendo un fenotipo de retraimiento social en los ratones *Grin1* KO. Mientras que los primeros pasaron más tiempo en la zona de los demostradores (Figura 14C y D) y permanecieron más cerca del extremo social (Figura 14E y F), los segundos mostraron una tendencia opuesta, pasando más tiempo en la zona del objeto (Figura 14C y D) y manteniéndose más alejados del extremo social (Figura 14E y F).

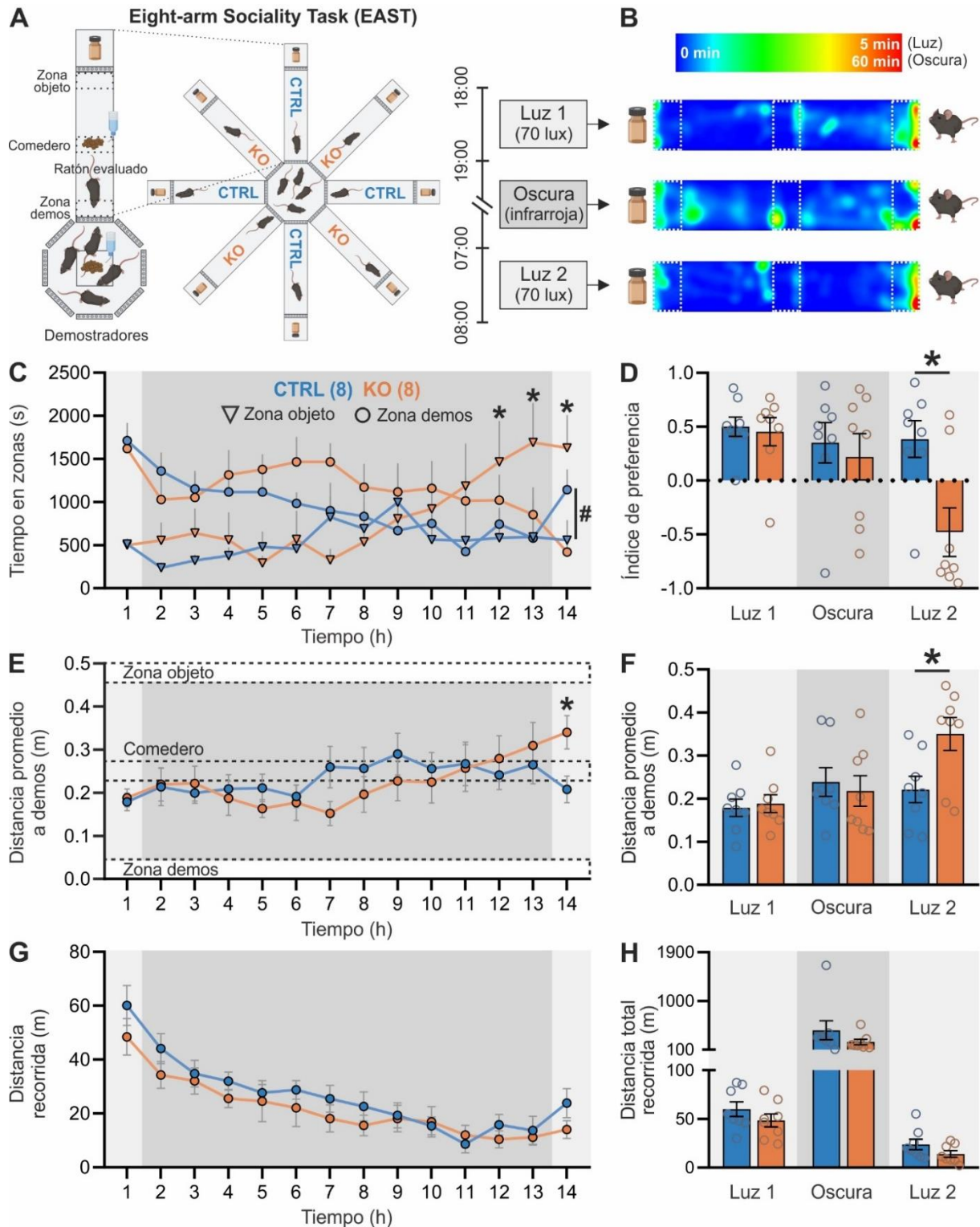


Figura 14. Los ratones *Grin1* KO muestran retracción social tras un período de interacción prolongada. **A.** Esquema del *Eight-Arm Sociality Task* (EAST). Los ratones mutantes y controles fueron colocados en brazos alternados del laberinto durante un período de 14 horas. Las líneas discontinuas indican zonas virtuales utilizadas para cuantificar los comportamientos exploratorios. **B.** Mapas de calor de la posición de la cabeza de un control representativo durante las tres fases de la prueba, donde el azul y el rojo indican los tiempos de exploración más bajos y más altos, respectivamente. **C.** Tiempo de permanencia de los ratones *Grin1* KO y control en la zona social y del objeto. Durante las últimas tres horas de la prueba, los mutantes pasaron un tiempo significativamente mayor en la zona del objeto en comparación con los controles. En la última hora (luz 2), los mutantes pasaron significativamente menos tiempo en la zona de los demostradores que los controles (ANOVA de tres vías de medidas repetidas: interacción de tres vías: $F_{13,182} = 2.490$, $p = 0.004$; prueba *post hoc* LSD de Fisher para la zona del objeto: $* p \leq 0.05$ CTRL vs. KO; para la zona de demostradores: $\# p = 0.061$ CTRL vs. KO). **D.** El índice de preferencia fue significativamente diferente entre los grupos sólo en la fase de luz 2 (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{2,28} = 6.505$, $p = 0.005$; prueba *post hoc* LSD de Fisher: $* p \leq 0.01$ vs. CTRL). **E.** Ubicación espacial promedio en el brazo, calculada como la distancia desde la ventana de exploración de la zona social para cada hora de la prueba (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{13,182} = 2.571$, $p = 0.003$; prueba *post hoc* LSD de Fisher: $* p \leq 0.05$ vs. CTRL). **F.** Durante la segunda fase de luz (luz 2), los mutantes permanecieron significativamente más alejados de los demostradores que los controles (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{2,28} = 6.480$, $p = 0.005$; prueba *post hoc* LSD de Fisher: $* p \leq 0.01$ vs. CTRL). **G.** Actividad locomotora durante cada hora de la prueba (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{13,182} = 0.80$, $p = 0.659$; factor genotipo: $F_{1,14} = 0.967$, $p = 0.342$; factor tiempo: $F_{13,182} = 24.00$, $p \leq 0.001$). **H.** La distancia total recorrida no fue significativamente diferente entre los grupos en ninguna fase de la prueba (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{2,28} = 1.351$, $p = 0.275$; factor genotipo: $F_{1,14} = 1.572$, $p = 0.230$; factor fase: $F_{2,28} = 12.55$, $p \leq 0.001$). Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. CTRL: ratones control; KO: ratones *Grin1* KO.

Los últimos 30 minutos de la fase de luz 2 se caracterizaron por un incremento en los episodios de inmovilidad prolongada —mayores a 60 segundos— (Figura 15A), con la mitad de los ratones permaneciendo inmóviles durante más del 75% del tiempo (Figura 15A y B), presumiblemente para descansar. Aunque el tiempo total de inmovilidad no difirió entre ratones control y *Grin1* KO durante este período (Figura 15B), observamos diferencias significativas en la ubicación en la que los animales se mantuvieron inmóviles. Mientras que los controles se distribuyeron uniformemente a lo largo de los brazos, la mayoría de los mutantes se concentró lo más lejos posible de la zona social (Figura 15A, C y D). En conjunto, estos resultados indican que, después de un período de novedad social y aumento de la actividad general (fases de luz 1 y oscura, respectivamente), los ratones *Grin1* KO muestran un perfil de retraimiento social en el paradigma de interacción prolongada.

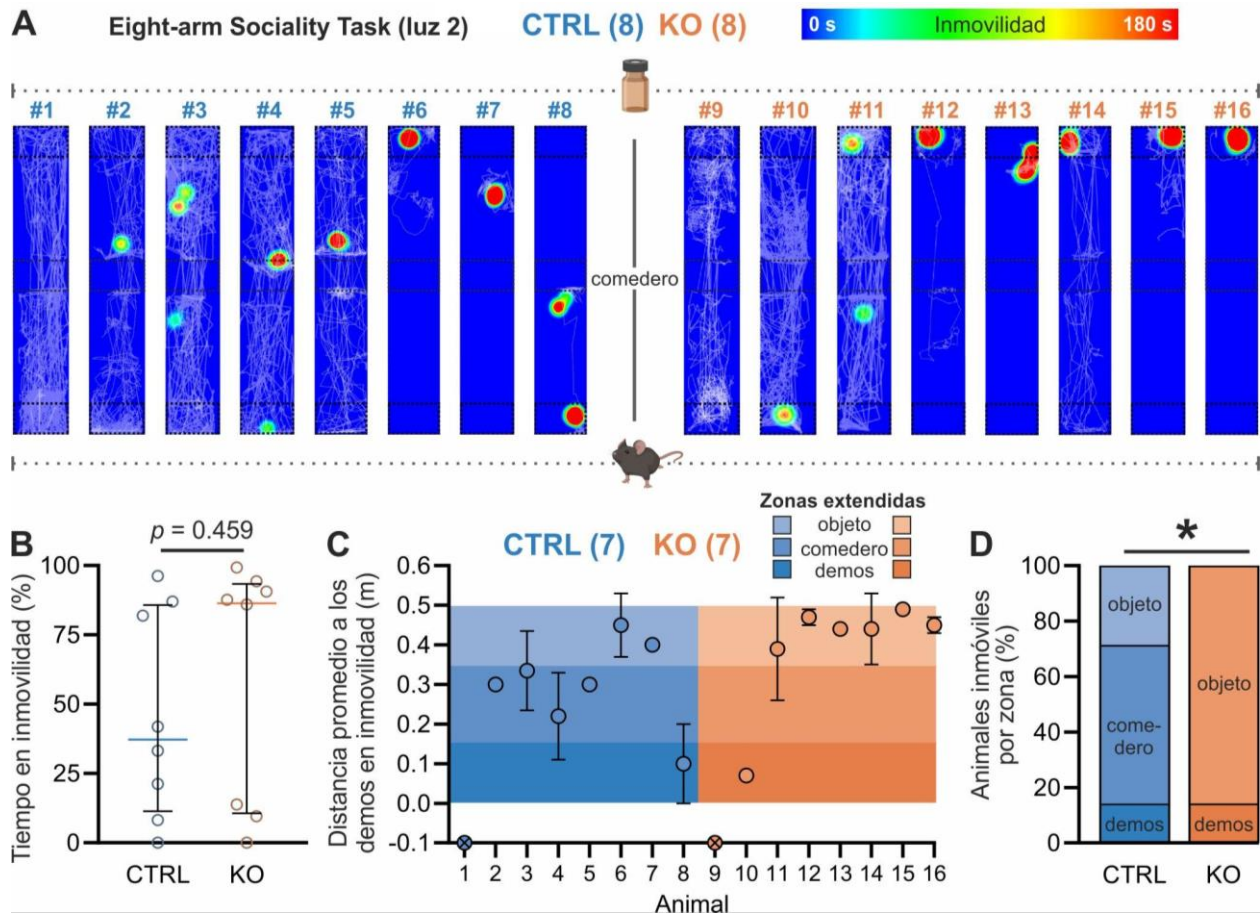
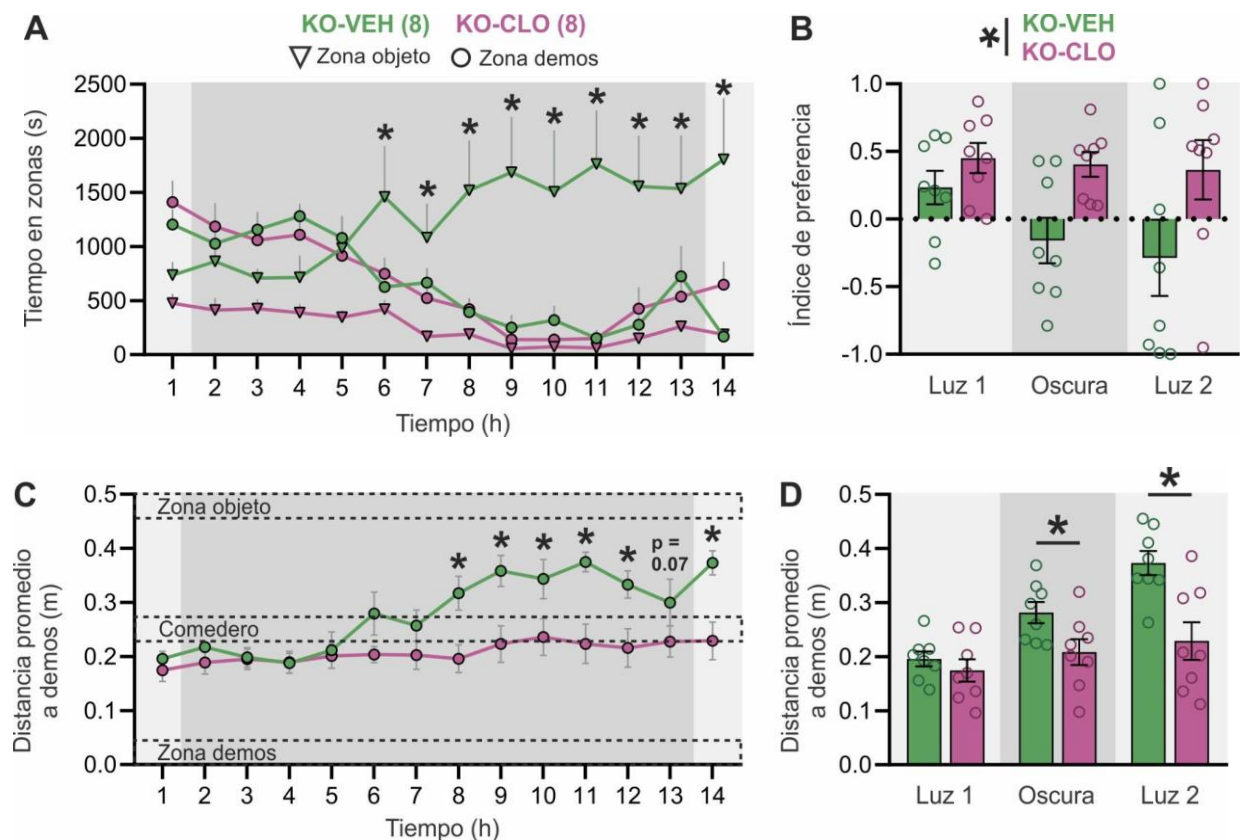


Figura 15. El retraining social del mutante *Grin1* KO se confirma por la ubicación de los episodios de inmovilidad durante la segunda fase de luz. **A.** Mapas de calor que muestran el tiempo de inmovilidad durante los últimos 30 minutos de la prueba para cada ratón individual, donde el azul y el rojo indican los tiempos de inmovilidad más bajos y más altos, respectivamente. El trayecto blanco superpuesto muestra la posición de la cabeza del animal a lo largo del brazo del laberinto. **B.** Porcentaje de tiempo en inmovilidad para ratones control y *Grin1* KO durante el mismo período que en A (prueba de Mann-Whitney: $U = 24.50$, $p = 0.459$). **C.** Posición media de cada ratón durante los períodos de inmovilidad calculada como la distancia desde la ventana de exploración de la zona social. La superficie total del brazo se dividió en tres zonas extendidas correspondientes al objeto, el comedero y los demostradores y los límites de cada una se indican en la figura. Cada punto representa la ubicación media $\pm$ desvío estándar de todos los episodios de inmovilidad de un ratón determinado. Los círculos con cruces indican los animales sin episodios de inmovilidad (CTRL: #1 y KO: #9). **D.** La proporción de mutantes *Grin1* KO que estuvieron inmóviles en cada zona extendida fue significativamente diferente a la de los controles (prueba de chi-cuadrado: $\chi^2_2 = 6.0$, $*p = 0.05$). Dos animales fueron excluidos de este análisis debido a la ausencia de episodios de inmovilidad durante los últimos 30 minutos de la segunda fase de luz.

Con el fin de evaluar la reversibilidad del fenotipo de retraining social detectado en el paradigma de interacción prolongada, tratamos a un grupo independiente de mutantes con clozapina o solvente de forma subcrónica. Este antipsicótico atípico actúa como antagonista de múltiples receptores —incluyendo dopaminérgicos, serotoninérgicos, adrenérgicos, histamínicos

y muscarínicos— y está indicado para el tratamiento de pacientes con esquizofrenia que no responden adecuadamente a fármacos antipsicóticos estándar [174, 175]. La droga fue administrada de forma intraperitoneal una vez al día durante cinco días consecutivos en una nueva camada de animales *Grin1* KO, que recibió la última dosis seis horas antes de la evaluación en el EAST. El tratamiento fue contrabalanceado quince días después de la prueba y todos los animales fueron reevaluados en el paradigma de interacción social prolongada.

Los ratones *Grin1* KO tratados con vehículo mostraron indicios de retracción social más temprano que lo descrito en la Figura 14, ya que su permanencia en la zona del objeto aumentó progresivamente y alcanzó diferencias significativas con el grupo tratado con clozapina desde la sexta hora de testeo (Figura 16A), lo que también se reflejó en la ubicación promedio a lo largo de la segunda mitad de la prueba (Figura 16C y D). En contraste, los ratones *Grin1* KO tratados con clozapina permanecieron más tiempo en la zona social durante la primera mitad de la prueba y durante la fase de luz 2, ubicándose más cerca del comedero hasta el final de la evaluación. Los índices de preferencia fueron significativamente distintos entre los grupos experimentales durante las 14 horas de evaluación (Figura 16B). Mientras que los promedios de estos índices disminuyeron con el transcurso de la prueba en los ratones tratados con vehículo, el tratamiento con clozapina logró mantenerlos constantes. Es importante destacar que, a lo largo de la prueba, la distancia recorrida disminuyó progresivamente en ambos grupos (Figura 16E) y fue equivalente en las tres fases de la misma (Figura 16F).



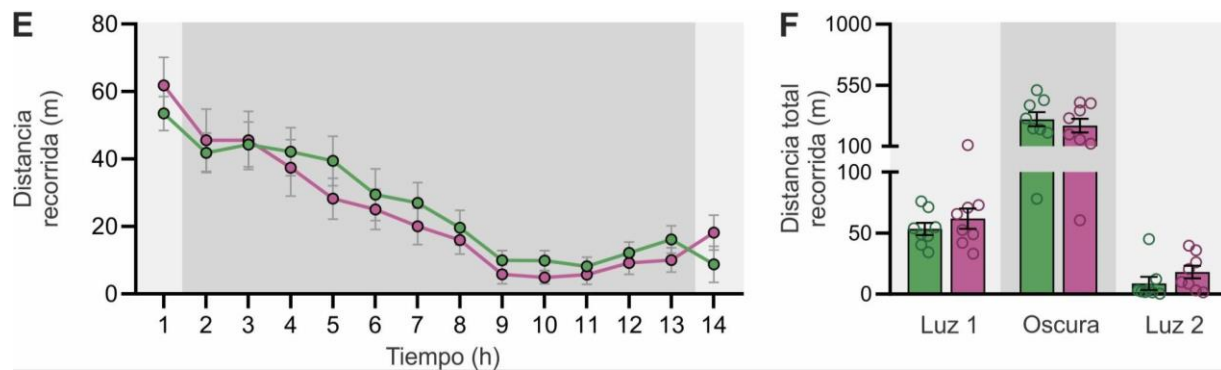


Figura 16. El tratamiento subcrónico con clozapina revierte el fenotipo de retraimiento social del mutante *Grin1* KO. **A.** Tiempo de permanencia de los ratones *Grin1* KO tratados con clozapina o vehículo en la zona social y del objeto. Durante las últimas nueve horas de la prueba, los mutantes tratados con clozapina pasaron significativamente menos tiempo en la zona de objeto que sus pares tratados con vehículo (ANOVA de tres vías de medidas repetidas: interacción de tres vías: $F_{13,182} = 2.489$, $p = 0.004$; prueba *post hoc* LSD de Fisher para la zona del objeto: * $p \leq 0.05$ clozapina vs. vehículo). **B.** El índice de preferencia fue significativamente diferente entre los grupos en la prueba de 14 horas (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: factor fármaco: $F_{1,14} = 5.829$, $p = 0.03$). **C.** Ubicación espacial promedio en el brazo, calculada como la distancia desde la ventana de exploración de la zona social para cada hora de la prueba (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{13,182} = 4.389$, $p \leq 0.001$; prueba *post hoc* LSD de Fisher: * $p \leq 0.01$ vs. vehículo). **D.** Durante las fases oscura y de luz 2, los mutantes tratados con clozapina permanecieron significativamente más cerca de los demostradores que sus pares tratados con vehículo (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{2,28} = 9.305$, $p \leq 0.001$; prueba *post hoc* de Bonferroni: * $p \leq 0.05$ vs. vehículo). Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. KO-VEH y KO-CLO: ratones *Grin1* KO tratados alternativamente con vehículo y clozapina ($n = 8$). **E.** Actividad locomotora durante cada hora de la prueba (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{13,182} = 1.064$, $p = 0.393$; factor droga: $F_{1,14} = 0.121$, $p = 0.733$; factor tiempo: $F_{13,182} = 34.93$, $p \leq 0.001$). **F.** La distancia total recorrida no fue significativamente diferente entre los ratones *Grin1* KO tratados con clozapina y vehículo en ninguna fase de la prueba (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{2,28} = 0.680$, $p = 0.515$; factor droga: $F_{1,14} = 0.121$, $p = 0.733$; factor fase: $F_{2,28} = 52.88$, $p \leq 0.001$). Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. KO-VEH: ratones *Grin1* KO tratados con vehículo ($n = 8$); KO-CLO: ratones *Grin1* KO tratados con clozapina ($n = 8$).

Nuevamente, analizamos el comportamiento de los animales en los últimos 30 minutos de la fase 2. Aunque el tiempo total de inmovilidad no difirió entre ratones *Grin1* KO tratados con vehículo y clozapina, detectamos una tendencia no significativa a una menor inmovilidad en los animales tratados con la droga (Figura 17A). Al igual que en el experimento anterior, observamos diferencias significativas en la ubicación en la que los animales se mantuvieron inmóviles (Figura 17B y C). Mientras que los mutantes que recibieron vehículo se concentraron lo más lejos posible de la zona social, sus pares tratados con clozapina se distribuyeron uniformemente a lo largo de los brazos. En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento subcrónico con

clozapina es capaz de revertir el fenotipo de retraimiento social detectado en el mutante *Grin1* KO sin afectar la actividad locomotora general, al menos durante la extensión del ensayo.

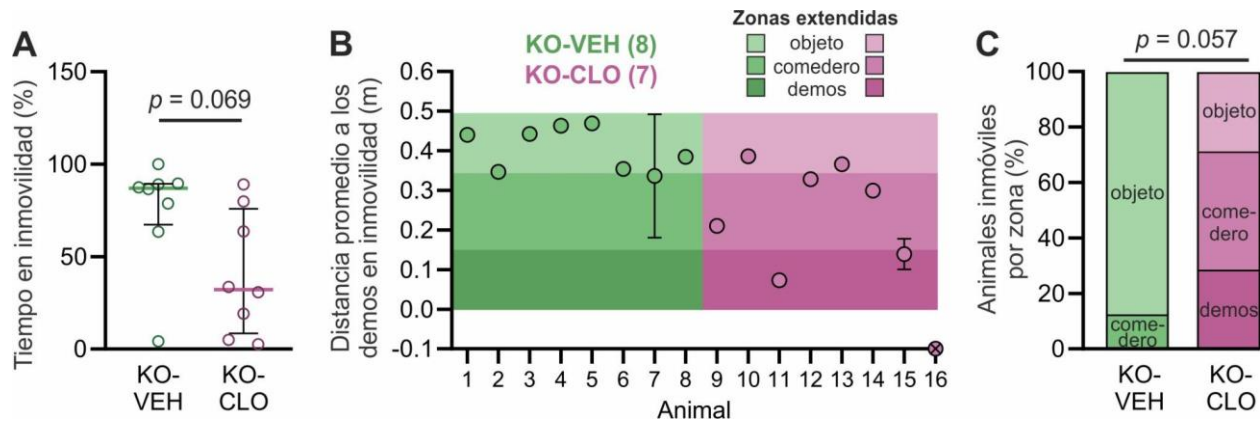


Figura 17. El tratamiento subcrónico con clozapina revierte el fenotipo de retraimiento social del mutante *Grin1* KO. **A.** Porcentaje de tiempo en inmovilidad durante los últimos 30 minutos de la segunda fase de luz (prueba de Mann-Whitney: $U = 14.50$, $p = 0.069$). **B.** Posición media de cada ratón durante los períodos de inmovilidad calculada como la distancia desde la ventana de exploración de la zona social. La superficie total del brazo se dividió en tres zonas extendidas correspondientes al objeto, el comedero y los demostradores y los límites de cada una se indican en la figura. Cada punto representa la ubicación media $\pm$ desvío estándar de todos los episodios de inmovilidad de un ratón determinado. Los círculos con cruces indican los animales sin episodios de inmovilidad (KO-CLO: #16). **C.** La proporción de ratones inmóviles en cada zona extendida fue significativamente diferente entre los grupos de ratones *Grin1* KO tratados con clozapina y vehículo (prueba de Chi-cuadrado: $\chi^2_2 = 5.737$, $p = 0.057$). Un animal fue excluido de este análisis debido a la ausencia de episodios de inmovilidad durante los últimos 30 minutos de la segunda fase de luz. Los resultados se expresan como mediana con rango intercuartílico para A, como media $\pm$ desvío estándar para B y como media $\pm$ SEM para C. KO-VEH: ratones *Grin1* KO tratados con vehículo ($n = 8$); KO-CLO: ratones *Grin1* KO tratados con clozapina ($n = 8$ para A y $n = 7$ para B-C).

DISCUSIÓN

1. Comportamiento socioafectivo normal y neuronas dopaminérgicas de la VTA

En el presente trabajo, nos propusimos como primer objetivo específico examinar la contribución del sistema dopaminérgico al comportamiento socioafectivo normal. Para ello, inhibimos quimiogénicamente la actividad de las neuronas dopaminérgicas de la VTA (Figura 1) durante una batería comportamental para evaluar distintos aspectos del comportamiento social.

En primer lugar, los ratones DAT-Cre utilizados fueron sometidos a una prueba estándar de preferencia social (Figura 2). Conforme a lo esperado [5], los animales inyectados con vehículo evidenciaron una mayor exploración del estímulo social con respecto a uno inanimado. Sin embargo, esta preferencia social emergió de forma tardía —a partir de los cuatro minutos del inicio del ensayo—, lo que contrasta con lo reportado previamente [48], con la puesta a punto de la prueba (Figura M2) y con los resultados obtenidos en el segundo objetivo de este trabajo (Figura 9), donde los ratones expresaron dicha preferencia desde los primeros minutos de evaluación. Cabe aclarar que en esta oportunidad no se utilizaron animales *naïve* sino camadas de ratones que habían sido evaluadas y reevaluadas en las dos versiones del paradigma de discriminación afectiva, en las cuales no se incluyó la presentación de un objeto. Por lo tanto, es razonable suponer que la preexposición reiterada a estímulos sociales pudo haber conferido una saliencia o novedad atípica al objeto, su módulo o su posición en la cámara, la cual podría haber disminuido con el transcurso de la prueba. Por otro lado, la inhibición quimiogénica de la actividad dopaminérgica de la VTA no produjo efectos sobre la preferencia social, al no observarse diferencias entre tratamientos en ninguno de los parámetros evaluados. Dicha ausencia de efectos comportamentales puede interpretarse de distintas maneras. Una posibilidad es que esta prueba evalúe aspectos del comportamiento social que no dependen críticamente de la actividad dopaminérgica del cerebro medio. En consonancia con esta idea, un estudio reciente que utilizó un abordaje quimiogénico similar tampoco observó alteraciones en la preferencia social [48]. Sin embargo, esta interpretación resulta difícil de conciliar con investigaciones previas que implicaron a las neuronas dopaminérgicas de la VTA en funciones sociales involucradas en la prueba de preferencia social, como la aproximación inicial a un congénere novedoso, la investigación social sostenida durante varios minutos y la atribución de valor motivacional o reforzante a las interacciones con pares [47, 48]. No obstante, cabe aclarar que en estos estudios el animal evaluado fue expuesto a un único estímulo (un congénere novedoso), mientras que en la prueba de preferencia social que realizamos deben compararse dos estímulos distintos para establecer un sesgo de exploración hacia el de naturaleza social, lo cual podría involucrar mecanismos parcialmente independientes. Una explicación alternativa

a los resultados obtenidos es que la infección viral haya afectado un número limitado de neuronas dopaminérgicas de la vía mesolímbica, que proyecta principalmente al núcleo accumbens, una región involucrada en la motivación social [50]. Esto podría haber permitido que la aproximación e interacción con el estímulo social se mantuvieran intactas en los animales tratados con CNO, dando lugar a un perfil conductual similar al de los animales control. De hecho, el nivel de exploración del demostrador, evaluado como el tiempo de exploración de este estímulo, fue similar entre los grupos experimentales.

Posteriormente, evaluamos a los ratones DAT-Cre en una prueba de reconocimiento social (Figura 3). Los animales inyectados con vehículo evidenciaron una preferencia esperable por el congénere novedoso sobre el familiar [5]. Por su parte, la inhibición de la actividad dopaminérgica de la VTA no produjo alteraciones en el reconocimiento social, pese a que observamos diferencias significativas en la actividad locomotora entre grupos. Estos resultados contrastan con los del estudio mencionado previamente, en el cual los ratones en los que se inactivaron las neuronas dopaminérgicas de la VTA no desarrollaron una preferencia por el estímulo social novedoso durante la primera mitad de la misma tarea [48]. No obstante, dicho estudio también reportó una reducción en la distancia total recorrida similar a la aquí observada, lo que sugiere que el déficit en el reconocimiento social podría haber estado mediado, al menos en parte, por alteraciones en la actividad locomotora. No puede descartarse que otras diferencias metodológicas entre los estudios contribuyan a las discrepancias observadas, tales como el grado de infección del virus administrado (pendiente de cuantificación en nuestro caso), la cámara comportamental utilizada (arena abierta vs. diseño de tres cámaras) o la dosis de CNO empleadas (3 mg/kg vs. 5 mg/kg). De forma análoga a lo planteado para la prueba de preferencia social, la ausencia de efectos sobre el reconocimiento social aquí reportada podría deberse a un impacto limitado de la infección viral en la VTA sobre la vía mesolímbica, particularmente sobre las neuronas que proyectan hacia estructuras involucradas en la memoria social, como la amígdala [176]. Una explicación alternativa es que, frente a la reducción de la actividad dopaminérgica, los sistemas de neuropéptidos hipotalámicos oxitocina y vasopresina—involucrados en el reconocimiento social y en la modulación de la actividad neuronal de la estructura límbica mencionada [177-180]— hayan favorecido una compensación funcional, resultando en una expresión intacta de la preferencia por la novedad social.

Una vez determinado que bajo nuestras condiciones experimentales no se afectaron capacidades elementales para reconocer y discriminar estímulos sociales *per se*, evaluamos el rol de las neuronas dopaminérgicas de la VTA en la discriminación de estados afectivos de distinta valencia (Figuras 4 y 5). En consonancia con lo reportado previamente [11, 12, 22-31], los ratones DAT-Cre inyectados con vehículo discriminaron de manera consistente a sus congéneres en función de sus estados afectivos, evidenciando un sesgo de preferencia por los demostradores manipulados sobre los neutrales. Además, estos resultados confirman que la

capacidad de discriminación se extiende a estados afectivos derivados tanto de experiencias aversivas como gratificantes. En contraste, reportamos por primera vez que la inhibición de la actividad dopaminérgica de la VTA produce un déficit global y sostenido en la discriminación de estímulos sociales de distinta valencia. Estos hallazgos son coherentes con investigaciones previas que asignan un rol central a la VTA en el procesamiento de la valencia de experiencias emocionalmente relevantes [41, 52, 53].

La VTA es una estructura compleja que envía proyecciones dopaminérgicas a múltiples regiones corticales y subcorticales, las cuales podrían contribuir a distintas funciones implicadas en el comportamiento socioafectivo, como la motivación inicial para interactuar con congéneres, el procesamiento de la valencia de sus estados afectivos y el mantenimiento activo de dicha información en tiempo real (*online*) para su correcta discriminación, lo que finalmente se traduciría en una respuesta comportamental como la exploración preferencial de un congénere que expresa información emocional potencialmente relevante. Por lo tanto, una inactivación generalizada de las neuronas dopaminérgicas de esta región —como la realizada en este trabajo— impide discriminar su impacto sobre regiones y funciones diferenciadas. En particular, las neuronas dopaminérgicas de la VTA participan en la motivación social a través de sus proyecciones hacia el núcleo accumbens, en el cual se produce un aumento en la liberación de dopamina frente a congéneres novedosos, lo que refleja el carácter reforzante de la interacción social [46, 50]. Por lo tanto, la inhibición generalizada de la VTA podría haber afectado el interés de los animales por iniciar y sostener una interacción con sus pares, alterando la discriminación de estados afectivos de forma secundaria. En esta tarea, observamos niveles comparables de exploración total de los demostradores durante el período en que se manifestó el sesgo de preferencia afectiva, lo que sugiere que el efecto reportado no se debe a diferencias putativas en los niveles motivacionales entre grupos. Sin embargo, es importante aclarar que este indicador comportamental no permite descartar de forma concluyente posibles alteraciones en procesos motivacionales más específicos —como el interés selectivo por señales emocionales relevantes— que podrían no reflejarse en el nivel general de exploración social. Las neuronas dopaminérgicas de la VTA también proyectan hacia la amígdala, una estructura implicada en la codificación de estímulos emocionales de distinta valencia [181, 182] e involucrada recientemente en la discriminación de estados emocionales en roedores [11, 27]. Se ha propuesto previamente que la dopamina liberada por las proyecciones mesoamigdalinas potencia la plasticidad neuronal en la amígdala basolateral, favoreciendo la codificación de la valencia de estímulos emocionales tanto en contextos aversivos como apetitivos [183]. En nuestro trabajo, la inhibición quimiogénica generalizada de la VTA pudo haber afectado a este grupo de neuronas de la vía mesolímbica, alterando la codificación de la valencia de los estados afectivos y, en consecuencia, interrumpiendo la preferencia por el demostrador manipulado. Otra región del cerebro anterior que recibe aferencias dopaminérgicas de la VTA y

que ha sido previamente implicada en la discriminación de estados afectivos en roedores [12, 23, 28, 29] es la corteza prefrontal. Esta estructura cumple un rol clave en la memoria de trabajo, entendida como la capacidad de retener y manipular activamente la información a corto plazo para guiar el comportamiento en tareas complejas [184]. Numerosos estudios en animales y humanos han demostrado que la dopamina a nivel de la corteza prefrontal modula el rendimiento en tareas de memoria de trabajo [185], siguiendo una relación en forma de U invertida: un nivel óptimo de dopamina se asocia a un funcionamiento eficaz, mientras que tanto la hipodopaminergia como la hiperdopaminergia producen alteraciones cognitivas [186]. En consonancia con esto, un desbalance dopaminérgico en esta región inducido farmacológicamente deteriora la memoria de trabajo en distintas tareas conductuales [187, 188]. Esta función cognitiva podría estar implicada en nuestra prueba de discriminación afectiva, que no sólo requiere adquirir y codificar la información de la valencia de los congéneres manipulados, sino también mantenerla de forma *online* para compararla con la del demostrador en el estado neutral durante la interacción social. Por consiguiente, podemos hipotetizar que una inhibición quimiogénica generalizada de la VTA pudo haber afectado la vía mesocortical, reduciendo la liberación de dopamina en la corteza prefrontal y, en consecuencia, comprometiendo el desempeño en la prueba mencionada. Para evaluar la contribución específica de cada una de las proyecciones de la VTA mencionadas a la discriminación afectiva, estudios futuros podrían utilizar una estrategia que combinara la administración de un vector viral de transporte retrógrado en distintas regiones blanco —como el núcleo accumbens, la amígdala o la corteza prefrontal— junto a otro que permitiera la expresión Cre-dependiente de un DREADD inhibitorio en la VTA. De este modo, sería posible inhibir selectivamente la actividad dopaminérgica de proyecciones específicas del tracto mesocorticolímbico durante la evaluación comportamental.

2. Comportamiento socioafectivo patológico e hipofunción glutamatérgica en interneuronas GABAérgicas corticolímbicas

En este trabajo, nos propusimos como segundo objetivo específico investigar el impacto de la hipofunción glutamatérgica sobre comportamientos relevantes para la esquizofrenia, como la discriminación de estados afectivos, el funcionamiento social en diferentes contextos y la interacción con congéneres durante períodos prolongados. Para ello, utilizamos ratones mutantes que carecen de receptores NMDA funcionales en un grupo de interneuronas GABAérgicas de la corteza cerebral e hipocámpal desde una etapa temprana del desarrollo.

En primer lugar, logramos fortalecer la validez de apariencia del modelo transgénico, que previamente evidenció indicadores preliminares de disfunción social con baja relevancia traslacional [145]. Observamos que los mutantes *Grin1* KO fueron incapaces de discriminar a sus

congéneres en función de sus estados afectivos, fueran estos inducidos mediante manipulaciones experimentales apetitivas o aversivas (Figuras 6 y 7). Por primera vez, logramos reproducir en un modelo animal relevante para la esquizofrenia una alteración en el procesamiento emocional similar a la reportada en pacientes expuestos a rostros con distinta valencia afectiva [73]. En los animales control, la preferencia afectiva dependió de la versión del paradigma comportamental administrada. En línea con lo observado en el primer objetivo de este trabajo y con estudios previos que utilizaron distintas manipulaciones aversivas para inducir estados afectivos de valencia negativa [11, 12, 22-31], estos animales mostraron una preferencia por los demostradores derrotados frente a los neutrales. Dicho sesgo de preferencia podría reflejar una respuesta evolutiva fundamental orientada a promover comportamientos prosociales hacia congéneres menos favorecidos, como la modulación del dolor, la ayuda dirigida y el comportamiento consolatorio [17-20]. Por su parte, en la versión apetitiva del paradigma de discriminación afectiva, observamos una preferencia por los demostradores neutrales frente a los recompensados, lo cual difiere tanto del primer objetivo de este trabajo como de estudios previos que indujeron estados afectivos de valencia positiva mediante el restablecimiento de la comida y el agua tras un período de privación [11, 12, 23, 29, 30]. Factores que variaron entre objetivos y que afectaron al animal evaluado (como la duración del aislamiento social, las cirugías estereotáxicas o la administración de inyecciones antes de la evaluación comportamental) pudieron haber influido en su estado afectivo y contribuido a la inversión de la preferencia observada en la versión apetitiva del paradigma. No obstante, es importante destacar que obtuvimos resultados consistentes entre distintas camadas evaluadas dentro de cada objetivo de este trabajo.

El déficit observado en los mutantes *Grin1* KO se restringió a la discriminación de información afectiva y no puede atribuirse a una pérdida generalizada de capacidades sociales elementales. De hecho, los animales mostraron una preferencia intacta por sus congéneres frente a objetos inanimados (Figura 9) y diferenciaron a un congénere novedoso de uno familiar (Figura 10). Esta disociación entre sociabilidad general y discriminación afectiva —también reportada en el primer objetivo de este trabajo y documentada previamente [11, 12, 23, 28]— sugeriría que ambas habilidades están reguladas por mecanismos parcialmente independientes. Asimismo, cabe destacar que los comportamientos evaluados en el paradigma de preferencia y reconocimiento social han sido frecuentemente equiparados a la *sociabilidad* en estudios de modelos animales de esquizofrenia [189-193]. Sin embargo, los mismos podrían no reflejar los síntomas del trastorno, que incluye alteraciones en la cognición social, retraimiento social prolongado y dificultades en el funcionamiento social en distintos contextos. El déficit en la discriminación afectiva observado en los mutantes *Grin1* KO tampoco puede ser explicado por el perfil de ansiedad elevada reportado previamente en este modelo animal [145]. Pese a los recaudos metodológicos destinados a minimizar los niveles de ansiedad durante las pruebas

comportamentales (como el uso de arenas pequeñas, bajos niveles de iluminación y una habituación prolongada), realizamos un experimento adicional para determinar si la exploración social podría verse afectada por la ansiedad inducida durante las interacciones con pares (Figura 11). Consideramos que la interacción diádica libre con un congénere novedoso resulta más ansiogénica que la que sucede en nuestra cámara de sociabilidad, ya que en ésta última sólo el ratón evaluado puede iniciar el acercamiento social con el demostrador y se evitan conductas agresivas entre ambos mediante una malla de alambre. En efecto, el escenario de interacción diádica libre favorece las interacciones recíprocas, en las que no sólo los demostradores pueden acercarse al ratón evaluado sino que además pueden surgir episodios agresivos (no detectados en nuestros experimentos). La ausencia de diferencias significativas en esta última prueba descarta la posibilidad de que los déficits observados en el paradigma de discriminación afectiva se deban a una evitación social inducida por mayores niveles de ansiedad en los mutantes *Grin1* KO.

Las habilidades sociocognitivas son fundamentales para facilitar las interacciones con pares y promover la integración en nuevos entornos sociales [194]. Como se mencionó en la introducción, en la esquizofrenia existe una asociación significativa entre los déficits en la cognición social, el funcionamiento social y el síntoma negativo del retraimiento social [63, 78-83, 88, 89]. En este sentido, se ha propuesto que las alteraciones en el reconocimiento y discriminación emocional podrían dar lugar a interacciones sociales aberrantes en diferentes contextos, lo que derivaría a su vez en retraimiento social [89]. En este trabajo reportamos que los ratones *Grin1* KO exhiben un déficit en la formación de jerarquías (Figura 12) y en la defensa de su territorio frente a congéneres intrusos (Figura 13), lo que podría reflejar una dificultad en la evaluación de las claves emitidas por sus congéneres en contextos que requieren una respuesta efectiva e inmediata. Aunque la relevancia traslacional de estas alteraciones parece ser menor que la del déficit en la discriminación de estados afectivos, es importante destacar que este modelo animal también ha mostrado alteraciones en la construcción de nidos y en la conducta de apareamiento [145], lo que apunta a la existencia de una disfunción social más amplia, manifestada en diferentes contextos. En este trabajo, también identificamos un fenotipo de retraimiento social en los mutantes *Grin1* KO cuando fueron evaluados en el EAST (Figuras 14 y 15), lo que subraya la importancia de monitorear el comportamiento social durante períodos prolongados y no sólo en una escala temporal de minutos, como sucede en la mayoría de las investigaciones del campo [7]. La ausencia de alteraciones durante una fase inicial de acercamiento y novedad social —característica de la prueba estándar de preferencia social, del test de interacción social libre y de la primera fase de luz del EAST— puede enmascarar un déficit que sólo se manifiesta a largo término. El aumento sostenido del tiempo de permanencia en la zona del objeto durante la segunda mitad de la fase oscura del EAST, así como los episodios de inmovilidad ubicados lo más lejos posible de la zona social durante la segunda fase de luz,

constituyen indicadores conductuales útiles para modelar alteraciones sociales persistentes con valor traslacional. Dada su disponibilidad actual, sería interesante emplear sistemas de seguimiento en entornos semi-naturalistas para monitorear a largo plazo el comportamiento social de los ratones *Grin1* KO en un contexto grupal [6, 7].

Dado que la esquizofrenia en hombres tiene un inicio más temprano, un peor funcionamiento social y una incidencia ligeramente mayor que en mujeres [195-198], en este trabajo nos centramos exclusivamente en ratones macho. Considerando la literatura sobre diferencias entre sexos en la sintomatología de la esquizofrenia, esta limitación impide extrapolar el impacto de la manipulación de los receptores NMDA a las hembras, lo que justifica la realización de estudios adicionales. Por ejemplo, sería interesante evaluar el comportamiento de las hembras *Grin1* KO en las distintas versiones de nuestro paradigma de discriminación afectiva, considerando que las hembras *wild-type*, al igual que los machos, son capaces de discriminar estados afectivos expresados por sus congéneres [11, 12, 22-25, 27, 29]. Una evaluación preliminar en el EAST reveló que las hembras *Grin1* KO presentan un patrón de interacción social más complejo que el de los machos, caracterizado por una reducción en el tiempo de permanencia en el lado social durante las primeras horas de evaluación (ver Anexo, Figura A2). No obstante, esta disminución estuvo acompañada por una reducción en la actividad locomotora, lo que dificulta la interpretación de los resultados. Además, observamos una mayor variabilidad en las respuestas individuales, posiblemente vinculada a diferencias no controladas en la fase del ciclo estral. Una interpretación adecuada de estos hallazgos requiere de una caracterización conductual más exhaustiva, que incluya evaluaciones de la función olfativa, niveles de ansiedad y memoria, entre otras. Los datos preliminares obtenidos en las hembras se incluyen únicamente para la consideración del lector.

Estudios previos han relacionado la ablación de los receptores NMDA en interneuronas parvalbúmina con déficits en el comportamiento social [151-154]. Aunque se ha observado una discriminación deteriorada entre congéneres y objetos inanimados, discrepancias en la distribución regional, especificidad de tipo celular o el momento de la recombinación entre las líneas Cre utilizadas podrían explicar las diferencias conductuales con el presente trabajo. En primer lugar, si bien la línea PV-Cre empleada en dichos estudios dirige la recombinación de forma selectiva hacia las interneuronas PV+ [199], también induce la eliminación de los receptores NMDA en las neuronas de Purkinje del cerebelo, una estructura involucrada en el control del reconocimiento social [200, 201], que no se ve afectada en nuestros mutantes. En segundo lugar, en los ratones *Grin1* KO, la recombinación ocurre entre los días posnatales 7 y 28 [145]. Estudios previos en ratones *knockout* derivados de PV-Cre estiman el inicio de la ablación del receptor NMDA entre las 4 y 8 semanas de edad, es decir, significativamente después del periodo de maduración del fenotipo de disparo rápido de las neuronas PV, que ocurre entre los días posnatales 6 y 21 [202, 203]. En tercer lugar, la delección adicional del

receptor NMDA en neuronas GABAérgicas positivas para reelina podría contribuir a los fenotipos conductuales observados en este trabajo, ya que aproximadamente el 30% de estas neuronas son afectadas en la línea Ppp1r2-Cre utilizada, pero no en la línea PV-Cre [145].

Nuestro equipo reportó previamente que la ablación selectiva de los receptores NMDA en interneuronas GABAérgicas corticolímbicas durante un período posnatal temprano produce un desbalance excitación/inhibición en la corteza prefrontal que sólo emerge cuando predominan las oscilaciones gamma y theta, asociadas a tareas comportamentales de alta carga cognitiva en las que los pacientes con esquizofrenia presentan dificultades [109]. Podría especularse que la capacidad de discriminar dos estados afectivos de distinta valencia conlleva una mayor carga cognitiva que la que se pone en juego al discriminar un estímulo social de uno inanimado o el grado de novedad de dos congéneres. Por consiguiente, el desbalance excitación/inhibición pudo haber ocurrido en el paradigma de discriminación afectiva y no en las pruebas que evalúan capacidades sociales más elementales, lo que podría explicar las diferencias a nivel comportamental. Dado que el desbalance excitación/inhibición reportado se inclina hacia la excitación, podría haberse esperado un aumento del marcador c-Fos en respuesta al paradigma de discriminación afectiva y no una reducción con respecto al grupo control. Sin embargo, las diferencias reportadas en los niveles de c-Fos (Figura 8) podrían derivar de una menor capacidad de reclutamiento neuronal, dada por una excitabilidad basal elevada en el mutante *Grin1* KO.

Para concluir, evaluamos la validez predictiva del modelo transgénico utilizado. Resulta improbable que la mera restauración de la función del receptor NMDA en las interneuronas afectadas sea suficiente para revertir los fenotipos descritos, dado que las alteraciones conductuales derivadas de su ablación emergen únicamente tras procesos adicionales de desarrollo anómalo durante la adolescencia [145]. Previamente reportamos que un tratamiento crónico con risperidona es capaz de atenuar las alteraciones en la memoria de trabajo y la inhibición por prepulso de la respuesta de sobresalto en los mutantes *Grin1* KO [145]. En este trabajo nos propusimos determinar los efectos de la clozapina sobre el comportamiento social durante períodos prolongados (Figura 16). Dado el efecto limitado de los fármacos antipsicóticos sobre los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia, nuestra expectativa inicial de obtener un efecto terapéutico era baja. Sin embargo, observamos una reversión significativa del fenotipo de retraimiento social en el EAST, sin que se viera afectada la actividad locomotora de los animales evaluados. Estudios previos han reportado que el tratamiento subcrónico con clozapina, a dosis que no afectan la locomoción, no modifica el comportamiento social en ratones *wild type* [204]. Por esta razón, realizamos el experimento exclusivamente en ratones mutantes. Una caracterización exhaustiva del potencial efecto terapéutico de los antipsicóticos en todas las tareas conductuales realizadas excede el alcance del presente estudio. Sin embargo, podemos especular que el tratamiento con fármacos antipsicóticos que

actúan sobre el sistema dopaminérgico podría atenuar las alteraciones en la discriminación afectiva del mutante, dado el rol de dicho sistema en el comportamiento socioafectivo —evidenciado en la primera parte de esta tesis— y el desbalance dopaminérgico reportado previamente en este modelo animal [147].

3. Consideraciones adicionales

Para finalizar, es pertinente señalar algunas observaciones metodológicas generales. Al comienzo de este trabajo, empleamos los protocolos de restricción física y de alivio post-deprivación desarrollados por otros grupos de trabajo a fin de inducir estados afectivos de distinta valencia en ratones *wild-type*. Sin embargo, obtuvimos resultados inconsistentes que no replicaron lo reportado con anterioridad (ver Anexo, Figura A3). Posteriormente, aplicamos los protocolos de derrota social y pre-exposición repetida a una recompensa, los cuales no sólo generaron resultados más confiables, sino que también presentan una serie de ventajas relativas. En primer lugar, ambas manipulaciones favorecieron una preferencia socioafectiva sostenida durante períodos más prolongados que los reportados en estudios previos, que la observaron sólo en los primeros dos minutos de evaluación [11, 12, 22-31]. En segundo lugar, la derrota social aguda es un modelo experimental que desencadena una serie de respuestas neurofisiológicas y comportamentales que podrían considerarse más pronunciadas que las que produce la restricción física breve [205, 206]. Finalmente, la pre-exposición repetida a una recompensa en el contexto de testeo permite inducir un estado afectivo positivo sin requerir restricción previa de agua o alimento, evitando así un componente inicial de tipo aversivo que no puede descartarse en estudios similares [11, 12, 23, 29, 30].

Una limitación del presente trabajo es la ausencia de caracterización de los distintos tipos de demostradores utilizados. Futuros estudios podrían investigar el impacto de las manipulaciones empleadas en pruebas de preferencia condicionada de lugar o en la concentración plasmática de corticosterona, como se ha realizado anteriormente [11, 12], así como en otros comportamientos potencialmente relevantes, tales como la actividad locomotora, las vocalizaciones, la ansiedad y el autoacicalamiento. Como se mencionó en la introducción, un estudio reciente reportó la existencia de ensambles neuronales funcionalmente independientes en la VTA que codifican estímulos de distinta valencia [55]. Estudios futuros podrían utilizar la técnica de recombinación dirigida en poblaciones activas (TRAP) para evaluar si las manipulaciones aplicadas a los demostradores (preexposición a una recompensa y episodios de derrota social) reclutan distintos ensambles neuronales que codifican estímulos de valencia opuesta y si los mismos se reactivan específicamente frente a manipulaciones alternativas congruentes utilizadas en otros estudios, ya sea apetitivas como aversivas.

CONCLUSIÓN

En el presente trabajo investigamos las bases neurobiológicas del comportamiento socioafectivo, tanto en condiciones normales como patológicas, mediante un enfoque experimental que integró herramientas genéticas, neurobiológicas y conductuales en ratones.

En primer lugar, demostramos que las neuronas dopaminérgicas de la VTA desempeñan un rol en la discriminación de estados afectivos expresados por congéneres en el contexto de una interacción social. La inhibición quimiogénica de esta población neuronal abolió la preferencia de los animales por congéneres en estados afectivos de valencia positiva y negativa, sin afectar capacidades sociales elementales, como la discriminación entre estímulos sociales e inanimados o entre congéneres de distinta novedad. Estos hallazgos respaldan parcialmente nuestra primera hipótesis, requiriéndose estudios adicionales para determinar si esta población neuronal participa de manera efectiva en la preferencia y reconocimiento social.

En segundo lugar, demostramos que el modelo murino *Grin1* KO presenta un déficit global en la discriminación de estados afectivos, junto con dificultades funcionales en diferentes contextos sociales y un fenotipo de retraimiento social, el cual fue revertido mediante un tratamiento subcrónico con un fármaco antipsicótico. Estos resultados respaldan nuestra segunda hipótesis, dado que la ablación posnatal temprana del receptor NMDA en interneuronas GABAérgicas corticolímbicas produjo alteraciones comportamentales que reproducen aspectos de la sintomatología negativa y sociocognitiva de la esquizofrenia y que poseen mayor relevancia traslacional que las conductas sociales comúnmente evaluadas en el campo, como la aproximación social, la preferencia social o la interacción libre a corto plazo.

En conclusión, esta tesis aporta evidencia novedosa sobre los sustratos neurobiológicos que subyacen al comportamiento socioafectivo normal, destacando el papel del sistema dopaminérgico del cerebro medio, tradicionalmente asociado a la motivación y al procesamiento de recompensas. Asimismo, nuestro trabajo subraya que la hipofunción glutamatérgica constituye un mecanismo fisiopatológico relevante para trastornos neuropsiquiátricos que presentan alteraciones en el comportamiento socioafectivo, como la esquizofrenia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chen, P., & Hong, W. (2018). Neural circuit mechanisms of social behavior. *Neuron*, 98(1), 16-30.
2. Benedetti, A., Molent, C., Barcik, W., & Papaleo, F. (2022). Social behavior in 16p11. 2 and 22q11. 2 copy number variations: Insights from mice and humans. *Genes, Brain and Behavior*, 21(5), e12787.
3. Dixon AK. The social behaviour of mice and its sensory control. In: Hedrich JH, Bullock G, editors. *The Laboratory Mouse, The Handbook of Experimental Animals*. San Diego, CA: Elsevier; (2004). p. 287–300
4. Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2018). Free dyadic social interaction test in mice. In *Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols* (pp. 93-97). New York, NY: Springer New York.
5. Moy, S. S., Nadler, J. J., Perez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., ... & Crawley, J. N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 3(5), 287-302.
6. De Chaumont, F., Ey, E., Torquet, N., Lagache, T., Dallongeville, S., Imbert, A., ... & Olivo-Marin, J. C. (2019). Real-time analysis of the behaviour of groups of mice via a depth-sensing camera and machine learning. *Nature biomedical engineering*, 3(11), 930-942.
7. Jabarin, R., Netser, S., & Wagner, S. (2022). Beyond the three-chamber test: toward a multimodal and objective assessment of social behavior in rodents. *Molecular Autism*, 13(1), 41.
8. Anderson, D. J., & Adolphs, R. (2014). A framework for studying emotions across species. *Cell*, 157(1), 187-200.
9. Cabanac, M. (2002). What is emotion?. *Behavioural processes*, 60(2), 69-83.
10. Russell, J. A. (2003). Core affect and the psychological construction of emotion. *Psychological review*, 110(1), 145.
11. Ferretti, V., Maltese, F., Contarini, G., Nigro, M., Bonavia, A., Huang, H., ... & Papaleo, F. (2019). Oxytocin signaling in the central amygdala modulates emotion discrimination in mice. *Current Biology*, 29(12), 1938-1953.
12. Scheggia, D., Managò, F., Maltese, F., Bruni, S., Nigro, M., Dautan, D., ... & Papaleo, F. (2020). Somatostatin interneurons in the prefrontal cortex control affective state discrimination in mice. *Nature neuroscience*, 23(1), 47-60.
13. Paul, E. S., Sher, S., Tamietto, M., Winkielman, P., & Mendl, M. T. (2020). Towards a comparative science of emotion: Affect and consciousness in humans and animals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 108, 749-770.
14. Mendl, M., Burman, O. H., & Paul, E. S. (2010). An integrative and functional framework for the study of animal emotion and mood. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1696), 2895-2904.
15. Preckel, K., Kanske, P., & Singer, T. (2018). On the interaction of social affect and cognition: empathy, compassion and theory of mind. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 19, 1-6.

16. Kietzman, H. W., & Gourley, S. L. (2023). How social information impacts action in rodents and humans: the role of the prefrontal cortex and its connections. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 147, 105075.
17. Meyza, K. Z., Bartal, I. B. A., Monfils, M. H., Panksepp, J. B., & Knapska, E. (2017). The roots of empathy: Through the lens of rodent models. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 76, 216-234.
18. Bartal, I. B. A., Decety, J., & Mason, P. (2011). Empathy and pro-social behavior in rats. *Science*, 334(6061), 1427-1430.
19. Panksepp, J. B., & Lahvis, G. P. (2011). Rodent empathy and affective neuroscience. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(9), 1864-1875.
20. Zhang, M., Wu, Y. E., Jiang, M., & Hong, W. (2024). Cortical regulation of helping behaviour towards others in pain. *Nature*, 626(7997), 136-144.
21. Atsak, P., Orre, M., Bakker, P., Cerliani, L., Roozendaal, B., Gazzola, V., ... & Keysers, C. (2011). Experience modulates vicarious freezing in rats: a model for empathy. *PloS one*, 6(7), e21855.
22. Rogers-Carter, M. M., Varela, J. A., Gribbons, K. B., Pierce, A. F., McGoey, M. T., Ritchey, M., & Christianson, J. P. (2018). Insular cortex mediates approach and avoidance responses to social affective stimuli. *Nature neuroscience*, 21(3), 404-414.
23. Dautan, D., Monai, A., Maltese, F., Chang, X., Molent, C., Mauro, D., ... & Papaleo, F. (2024). Cortico-cortical transfer of socially derived information gates emotion recognition. *Nature Neuroscience*, 27(7), 1318-1332.
24. Maltese, F., Pacinelli, G., Monai, A., Bernardi, F., Capaz, A. M., Niello, M., ... & Papaleo, F. (2025). Self-experience of a negative event alters responses to others in similar states through prefrontal cortex CRF mechanisms. *Nature Neuroscience*, 28(1), 122-136.
25. Rogers-Carter, M. M., Djerdjaj, A., Culp, A. R., Elbaz, J. A., & Christianson, J. P. (2018). Familiarity modulates social approach toward stressed conspecifics in female rats. *PLoS One*, 13(10), e0200971.
26. Rogers-Carter, M. M., Djerdjaj, A., Gribbons, K. B., Varela, J. A., & Christianson, J. P. (2019). Insular cortex projections to nucleus accumbens core mediate social approach to stressed juvenile rats. *Journal of Neuroscience*, 39(44), 8717-8729.
27. Djerdjaj, A., Rieger, N. S., Brady, B. H., Carey, B. N., Ng, A. J., & Christianson, J. P. (2023). Social affective behaviors among female rats involve the basolateral amygdala and insular cortex. *Plos one*, 18(10), e0281794.
28. Mohapatra, A. N., Jabarin, R., Ray, N., Netser, S., & Wagner, S. (2024). Impaired emotion recognition in *Cntnap2*-deficient mice is associated with hyper-synchronous prefrontal cortex neuronal activity. *Molecular Psychiatry*, 1-13.
29. Jabarin, R., Mohapatra, A. N., Ray, N., Netser, S., & Wagner, S. (2025). Distinct prelimbic cortex neuronal responses to emotional states of others drive emotion recognition in adult mice. *Current Biology*.
30. Misiólek, K., Klimczak, M., Chrószcz, M., Szumiec, Ł., Bryksa, A., Przyborowicz, K., ... & Harda, Z. (2023). Prosocial behavior, social reward and affective state discrimination in adult male

and female mice. *Scientific Reports*, 13(1), 5583.

31. Jabarin, R., Levy, N., Abergel, Y., Berman, J. H., Zag, A., & Netser, S. Pharmacological modulation of AMPA receptors rescues specific impairments in social behavior associated with the A350V Iqsec2 mutation. *Transl Psychiatry*. 2021; 11 (1): 1–11.

32. Ferretti, V., & Papaleo, F. (2019). Understanding others: emotion recognition in humans and other animals. *Genes, Brain and Behavior*, 18(1), e12544.

33. O'Connell, L. A., & Hofmann, H. A. (2012). Evolution of a vertebrate social decision-making network. *Science*, 336(6085), 1154-1157.

34. O'Connell, L. A., & Hofmann, H. A. (2011). The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. *Journal of Comparative Neurology*, 519(18), 3599-3639.

35. Padilla-Coreano, N., Tye, K. M., & Zelikowsky, M. (2022). Dynamic influences on the neural encoding of social valence. *Nature Reviews Neuroscience*, 23(9), 535-550.

36. Meyer-Lindenberg, A., Domes, G., Kirsch, P., & Heinrichs, M. (2011). Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(9), 524-538.

37. Caldwell, H. K. (2017). Oxytocin and vasopressin: powerful regulators of social behavior. *The Neuroscientist*, 23(5), 517-528.

38. Froemke, R. C., & Young, L. J. (2021). Oxytocin, neural plasticity, and social behavior. *Annual Review of Neuroscience*, 44(1), 359-381.

39. Albers, H. E. (2012). The regulation of social recognition, social communication and aggression: vasopressin in the social behavior neural network. *Hormones and behavior*, 61(3), 283-292.

40. Skuse, D. H., & Gallagher, L. (2009). Dopaminergic-neuropeptide interactions in the social brain. *Trends in cognitive sciences*, 13(1), 27-35.

41. Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M., & Hikosaka, O. (2010). Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron*, 68(5), 815-834.

42. Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: functions, signaling, and association with neurological diseases. *Cellular and molecular neurobiology*, 39(1), 31-59.

43. Laviolette, S. R. (2007). Dopamine modulation of emotional processing in cortical and subcortical neural circuits: evidence for a final common pathway in schizophrenia?. *Schizophrenia bulletin*, 33(4), 971-981.

44. De Leonibus, E., Verheij, M. M., Mele, A., & Cools, A. (2006). Distinct kinds of novelty processing differentially increase extracellular dopamine in different brain regions. *European Journal of Neuroscience*, 23(5), 1332-1340.

45. Robinson, D. L., Heien, M. L., & Wightman, R. M. (2002). Frequency of dopamine concentration transients increases in dorsal and ventral striatum of male rats during introduction of conspecifics. *Journal of Neuroscience*, 22(23), 10477-10486.

46. Robinson, D. L., Zitzman, D. L., Smith, K. J., & Spear, L. P. (2011). Fast dopamine release events in the nucleus accumbens of early adolescent rats. *Neuroscience*, 176, 296-307.
47. Gunaydin, L. A., Grosenick, L., Finkelstein, J. C., Kauvar, I. V., Fenno, L. E., Adhikari, A., ... & Deisseroth, K. (2014). Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell*, 157(7), 1535-1551.
48. Bariselli, S., Hörnberg, H., Prévost-Solié, C., Musardo, S., Hatstatt-Burklé, L., Scheiffele, P., & Bellone, C. (2018). Role of VTA dopamine neurons and neuroligin 3 in sociability traits related to nonfamiliar conspecific interaction. *Nature communications*, 9(1), 3173.
49. Solié, C., Girard, B., Righetti, B., Tapparel, M., & Bellone, C. (2022). VTA dopamine neuron activity encodes social interaction and promotes reinforcement learning through social prediction error. *Nature neuroscience*, 25(1), 86-97.
50. Dai, B., Sun, F., Tong, X., Ding, Y., Kuang, A., Osakada, T., ... & Lin, D. (2022). Responses and functions of dopamine in nucleus accumbens core during social behaviors. *Cell reports*, 40(8).
51. Bariselli, S., Glangetas, C., Tzanoulinou, S., & Bellone, C. (2016). Ventral tegmental area subcircuits process rewarding and aversive experiences. *Journal of neurochemistry*, 139(6), 1071-1080.
52. Ungless, M. A., Magill, P. J., & Bolam, J. P. (2004). Uniform inhibition of dopamine neurons in the ventral tegmental area by aversive stimuli. *Science*, 303(5666), 2040-2042.
53. Danjo, T., Yoshimi, K., Funabiki, K., Yawata, S., & Nakanishi, S. (2014). Aversive behavior induced by optogenetic inactivation of ventral tegmental area dopamine neurons is mediated by dopamine D2 receptors in the nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(17), 6455-6460.
54. Ungless, M. A. (2004). Dopamine: the salient issue. *Trends in neurosciences*, 27(12), 702-706.
55. Koutlas, I., Patrikiou, L., van der Starre, S. E., Danko, D., Wolterink-Donselaar, I. G., Luijendijk, M. C., ... & Meye, F. J. (2025). Distinct ventral tegmental area neuronal ensembles are indispensable for reward-driven approach and stress-driven avoidance behaviors. *Nature Communications*, 16(1), 3147.
56. Lauretani, F., Giallauria, F., Testa, C., Zinni, C., Lorenzi, B., Zucchini, I., ... & Maggio, M. G. (2024). Dopamine pharmacodynamics: New insights. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5293.
57. Halász, B., Fuxe, K., Agnati, L. F., Kalia, M., Goldstein, M., Andersson, K., ... & Härfstrand, A. (1985). Dopaminergic systems in the brain and pituitary. *The dopaminergic system*, 11-25.
58. GBD 2019 Mental Disorders Collaborators. (2022). Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet Psychiatry*, 9(2), 137-150.
59. Andreasen, N. C. (2010). Concept of schizophrenia: past, present, and future. *Schizophrenia*, 1-8.
60. Weinreb, S., Li, F., & Kurtz, M. M. (2022). A meta-analysis of social cognitive deficits in schizophrenia: Does world region matter?. *Schizophrenia Research*, 243, 206-213.

61. Green, M. F., Horan, W. P., & Lee, J. (2015). Social cognition in schizophrenia. *Nature Reviews Neuroscience*.
62. Harvey, P. D., & Penn, D. (2010). Social cognition: the key factor predicting social outcome in people with schizophrenia?. *Psychiatry (Edgmont)*, 7(2), 41.
63. Pinkham, A. E. (2014). Social cognition in schizophrenia. *J Clin Psychiatry*, 75(Suppl 2), 14-9.
64. Green, M. F., Penn, D. L., Bentall, R., Carpenter, W. T., Gaebel, W., Gur, R. C., ... & Heinssen, R. (2008). Social cognition in schizophrenia: an NIMH workshop on definitions, assessment, and research opportunities. *Schizophrenia bulletin*, 34(6), 1211-1220.
65. Van Hooren, S., Versmissen, D., Janssen, I., Myin-Germeys, I. À., à Campo, J., Mengelers, R., ... & Krabbendam, L. (2008). Social cognition and neurocognition as independent domains in psychosis. *Schizophrenia Research*, 103(1-3), 257-265.
66. Allen, D. N., Strauss, G. P., Donohue, B., & van Kammen, D. P. (2007). Factor analytic support for social cognition as a separable cognitive domain in schizophrenia. *Schizophrenia research*, 93(1-3), 325-333.
67. Kucharska-Pietura, K., & Mortimer, A. (2013). Can antipsychotics improve social cognition in patients with schizophrenia?. *CNS drugs*, 27(5), 335-343.
68. Penn, D. L., Sanna, L. J., & Roberts, D. L. (2008). Social cognition in schizophrenia: an overview. *Schizophrenia bulletin*, 34(3), 408-411.
69. Haime, Z., Watson, A. J., Crellin, N., Marston, L., Joyce, E., & Moncrieff, J. (2021). A systematic review of the effects of psychiatric medications on social cognition. *BMC psychiatry*, 21, 1-26.
70. Kurtz, M. M., Gagen, E., Rocha, N. B., Machado, S., & Penn, D. L. (2016). Comprehensive treatments for social cognitive deficits in schizophrenia: A critical review and effect-size analysis of controlled studies. *Clinical psychology review*, 43, 80-89.
71. Tan, B. L., Lee, S. A., & Lee, J. (2018). Social cognitive interventions for people with schizophrenia: a systematic review. *Asian Journal of Psychiatry*, 35, 115-131.
72. Kerr, S. L., & Neale, J. M. (1993). Emotion perception in schizophrenia: specific deficit or further evidence of generalized poor performance?. *Journal of abnormal psychology*, 102(2), 312.
73. Marwick, K., & Hall, J. (2008). Social cognition in schizophrenia: a review of face processing. *British Medical Bulletin*, 88(1), 43-58.
74. Tsoi, D. T., Lee, K. H., Khokhar, W. A., Mir, N. U., Swalli, J. S., Gee, K. A., ... & Woodruff, P. W. (2008). Is facial emotion recognition impairment in schizophrenia identical for different emotions? A signal detection analysis. *Schizophrenia research*, 99(1-3), 263-269.
75. Heimberg, C., Gur, R. E., Erwin, R. J., Shtasel, D. L., & Gur, R. C. (1992). Facial emotion discrimination: III. Behavioral findings in schizophrenia. *Psychiatry research*, 42(3), 253-265.
76. Hoekert, M., Kahn, R. S., Pijnenborg, M., & Aleman, A. (2007). Impaired recognition and expression of emotional prosody in schizophrenia: review and meta-analysis. *Schizophrenia research*, 96(1-3), 135-145.

77. Lin, Y., Ding, H., & Zhang, Y. (2018). Emotional prosody processing in schizophrenic patients: a selective review and meta-analysis. *Journal of Clinical Medicine*, 7(10), 363.
78. Fett, A. K. J., Viechtbauer, W., Penn, D. L., van Os, J., & Krabbendam, L. (2011). The relationship between neurocognition and social cognition with functional outcomes in schizophrenia: a meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(3), 573-588.
79. Hooker, C., & Park, S. (2002). Emotion processing and its relationship to social functioning in schizophrenia patients. *Psychiatry research*, 112(1), 41-50.
80. Kee, K. S., Green, M. F., Mintz, J., & Brekke, J. S. (2003). Is emotion processing a predictor of functional outcome in schizophrenia?. *Schizophrenia bulletin*, 29(3), 487-497.
81. Irani, F., Seligman, S., Kamath, V., Kohler, C., & Gur, R. C. (2012). A meta-analysis of emotion perception and functional outcomes in schizophrenia. *Schizophrenia research*, 137(1-3), 203-211.
82. Couture, S. M., Penn, D. L., & Roberts, D. L. (2006). The functional significance of social cognition in schizophrenia: a review. *Schizophrenia bulletin*, 32(suppl_1), S44-S63.
83. Poole, J. H., Tobias, F. C., & Vinogradov, S. (2000). The functional relevance of affect recognition errors in schizophrenia. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 6(6), 649-658.
84. Brissos, S., Molodynski, A., Dias, V. V., & Figueira, M. L. (2011). The importance of measuring psychosocial functioning in schizophrenia. *Annals of general psychiatry*, 10, 1-7.
85. American Psychiatric Association. (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders* (5th ed.). Arlington, VA: American Psychiatric Publishing.
86. Burns, T., & Patrick, D. (2007). Social functioning as an outcome measure in schizophrenia studies. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 116(6), 403-418.
87. Munroe-Blum, H., Collins, E., McCleary, L., & Nuttall, S. (1996). The social dysfunction index (SDI) for patients with schizophrenia and related disorders. *Schizophrenia Research*, 20(1-2), 211-219.
88. Yolland, C. O., Carruthers, S. P., Toh, W. L., Neill, E., Sumner, P. J., Thomas, E. H., ... & Rossell, S. L. (2021). The relationship between negative symptoms and both emotion management and non-social cognition in schizophrenia spectrum disorders. *Journal of the International Neuropsychological Society*, 27(9), 916-928.
89. Porcelli, S., van der Werff, S., Aghajani, M., Glennon, J. C., van Heukelum, S., Mogavero, F., ... & Serretti, A. (2019). Social brain, social dysfunction and social withdrawal. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 97, 10-33.
90. Farina, E. A., Assaf, M., Corbera, S., & Chen, C. M. (2022). Factors related to passive social withdrawal and active social avoidance in schizophrenia. *The Journal of nervous and mental disease*, 210(7), 490-496.
91. Marder, S. R., & Galderisi, S. (2017). The current conceptualization of negative symptoms in schizophrenia. *World Psychiatry*, 16(1), 14-24.
92. Tandon, R., Nasrallah, H. A., & Keshavan, M. S. (2009). Schizophrenia, "just the facts" 4.

Clinical features and conceptualization. *Schizophrenia research*, 110(1-3), 1-23.

93. Demjaha, A., & Murray, R. M. (2016). Overview of schizophrenia: Dimensions of psychopathology. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 23, pp. 5-15). Elsevier.

94. Arango, C., & Carpenter, W. T. (2010). The schizophrenia construct: symptomatic presentation. *Schizophrenia*, 09-23.

95. Owen, M. J., & Sawa, A. (2016). Mortensen pb. *Schizophrenia Lancet*, 388, 86-97.

96. Correll, C. U., & Schooler, N. R. (2020). Negative symptoms in schizophrenia: a review and clinical guide for recognition, assessment, and treatment. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 519-534.

97. Green, M. F., Nuechterlein, K. H., Gold, J. M., Barch, D. M., Cohen, J., Essock, S., ... & Marder, S. R. (2004). Approaching a consensus cognitive battery for clinical trials in schizophrenia: the NIMH-MATRICES conference to select cognitive domains and test criteria. *Biological psychiatry*, 56(5), 301-307.

98. McCutcheon, R. A., Keefe, R. S., & McGuire, P. K. (2023). Cognitive impairment in schizophrenia: aetiology, pathophysiology, and treatment. *Molecular psychiatry*, 28(5), 1902-1918.

99. Bowie, C. R., & Harvey, P. D. (2006). Cognitive deficits and functional outcome in schizophrenia. *Neuropsychiatric disease and treatment*, 2(4), 531-536.

100. Sjöberg, E. A. (2017). Logical fallacies in animal model research. *Behavioral and brain functions*, 13, 1-13.

101. Jones, C. A., Watson, D. J. G., & Fone, K. (2011). Animal models of schizophrenia. *British journal of pharmacology*, 164(4), 1162-1194.

102. Lipska, B. K., & Weinberger, D. R. (2000). To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology*, 23(3), 223-239.

103. Belzung, C., & Lemoine, M. (2011). Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression. *Biology of mood & anxiety disorders*, 1, 1-14.

104. Nestler, E. J., & Hyman, S. E. (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nature neuroscience*, 13(10), 1161-1169.

105. Geyer, M. A., & Moghaddam, B. (2002). Animal models relevant to schizophrenia disorders. *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress*, 50, 690-701.

106. Gordon, J. A. (2010). Testing the glutamate hypothesis of schizophrenia. *Nature neuroscience*, 13(1), 2-4.

107. Abi-Dargham, A., & Grace, A. A. (2010). Dopamine and schizophrenia. *Schizophrenia*, 413-432.

108. Lally, J., & MacCabe, J. H. (2015). Antipsychotic medication in schizophrenia: a review. *British medical bulletin*, 114(1), 169-179.

109. Pafundo, D. E., Pretell Annan, C. A., Fulginiti, N. M., & Belforte, J. E. (2021). Early NMDA

receptor ablation in interneurons causes an activity-dependent E/I imbalance in vivo in prefrontal cortex pyramidal neurons of a mouse model useful for the study of schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 47(5), 1300-1309.

110. Liu, Y., Ouyang, P., Zheng, Y., Mi, L., Zhao, J., Ning, Y., & Guo, W. (2021). A selective review of the excitatory-inhibitory imbalance in schizophrenia: underlying biology, genetics, microcircuits, and symptoms. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 664535.

111. Uhlhaas, P. J., & Singer, W. (2010). Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nature reviews neuroscience*, 11(2), 100-113.

112. Howes, O. D., & Shatalina, E. (2022). Integrating the neurodevelopmental and dopamine hypotheses of schizophrenia and the role of cortical excitation-inhibition balance. *Biological psychiatry*, 92(6), 501-513.

113. Uliana, D. L., Lisboa, J. R. F., Gomes, F. V., & Grace, A. A. (2024). The excitatory-inhibitory balance as a target for the development of novel drugs to treat schizophrenia. *Biochemical pharmacology*, 116298.

114. Paoletti, P., Bellone, C., & Zhou, Q. (2013). NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14(6), 383-400.

115. Olney, J. W., Newcomer, J. W., & Farber, N. B. (1999). NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *Journal of psychiatric research*, 33(6), 523-533.

116. Javitt, D. C., & Zukin, S. R. (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *The American journal of psychiatry*, 148(10), 1301-1308.

117. Lahti, A. C., Koffel, B., LaPorte, D., & Tamminga, C. A. (1995). Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 13(1), 9-19.

118. Krystal, J. H., Karper, L. P., Seibyl, J. P., Freeman, G. K., Delaney, R., Bremner, J. D., ... & Charney, D. S. (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans: psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of general psychiatry*, 51(3), 199-214.

119. Harrison, P. J., & Owen, M. J. (2003). Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *The Lancet*, 361(9355), 417-419.

120. Moghaddam, B. (2003). Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. *Neuron*, 40(5), 881-884.

121. Lee, G., & Zhou, Y. (2019). NMDAR hypofunction animal models of schizophrenia. *Frontiers in molecular neuroscience*, 12, 185.

122. Gainetdinov, R. R., Mohn, A. R., & Caron, M. G. (2001). Genetic animal models: focus on schizophrenia. *Trends in neurosciences*, 24(9), 527-533.

123. Olney, J. W., & Farber, N. B. (1995). Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Archives of general psychiatry*, 52(12), 998-1007.

124. Nakazawa, K., Zsiros, V., Jiang, Z., Nakao, K., Kolata, S., Zhang, S., & Belforte, J. E. (2012). GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology*, 62(3), 1574-1583.

125. Hu, H., Gan, J., & Jonas, P. (2014). Fast-spiking, parvalbumin+ GABAergic interneurons: From cellular design to microcircuit function. *Science*, 345(6196), 1255-1263.
126. Caballero, A., & Tseng, K. Y. (2016). GABAergic function as a limiting factor for prefrontal maturation during adolescence. *Trends in neurosciences*, 39(7), 441-448.
127. Donato, F., Rompani, S. B., & Caroni, P. (2013). Parvalbumin-expressing basket-cell network plasticity induced by experience regulates adult learning. *Nature*, 504(7479), 272-276.
128. Chung, D. W., Wills, Z. P., Fish, K. N., & Lewis, D. A. (2017). Developmental pruning of excitatory synaptic inputs to parvalbumin interneurons in monkey prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(4), E629-E637.
129. Lu, J., Tucciarone, J., Lin, Y., & Huang, Z. J. (2014). Input-specific maturation of synaptic dynamics of parvalbumin interneurons in primary visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(47), 16895-16900.
130. Shu, Y., Hasenstaub, A., & McCormick, D. A. (2003). Turning on and off recurrent balanced cortical activity. *Nature*, 423(6937), 288-293.
131. Cardin, J. A., Carlén, M., Meletis, K., Knoblich, U., Zhang, F., Deisseroth, K., ... & Moore, C. I. (2009). Driving fast-spiking cells induces gamma rhythm and controls sensory responses. *Nature*, 459(7247), 663-667.
132. Sohal, V. S., Zhang, F., Yizhar, O., & Deisseroth, K. (2009). Parvalbumin neurons and gamma rhythms enhance cortical circuit performance. *Nature*, 459(7247), 698-702.
133. Hoftman, G. D., & Lewis, D. A. (2011). Postnatal developmental trajectories of neural circuits in the primate prefrontal cortex: identifying sensitive periods for vulnerability to schizophrenia. *Schizophrenia bulletin*, 37(3), 493-503.
134. Gao, R., & Penzes, P. (2015). Common mechanisms of excitatory and inhibitory imbalance in schizophrenia and autism spectrum disorders. *Current molecular medicine*, 15(2), 146-167.
135. Nahar, L., Delacroix, B. M., & Nam, H. W. (2021). The role of parvalbumin interneurons in neurotransmitter balance and neurological disease. *Frontiers in psychiatry*, 12, 679960.
136. Sakurai, T., & Gamo, N. J. (2019). Cognitive functions associated with developing prefrontal cortex during adolescence and developmental neuropsychiatric disorders. *Neurobiology of Disease*, 131, 104322.
137. Jackson, M. E., Homayoun, H., & Moghaddam, B. (2004). NMDA receptor hypofunction produces concomitant firing rate potentiation and burst activity reduction in the prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(22), 8467-8472.
138. Breier, A., Malhotra, A. K., Pinals, D. A., Weisenfeld, N. I., & Pickar, D. (1997). Association of ketamine-induced psychosis with focal activation of the prefrontal cortex in healthy volunteers. *The American journal of psychiatry*.
139. Vollenweider, F. X., Leenders, K. L., Scharfetter, C., Antonini, A., Maguire, P., Missimer, J., & Angst, J. (1997). Metabolic hyperfrontality and psychopathology in the ketamine model of psychosis using positron emission tomography (PET) and [18F] fluorodeoxyglucose (FDG). *European neuropsychopharmacology*, 7(1), 9-24.

140. Grunze, H. C., Rainnie, D. G., Hasselmo, M. E., Barkai, E., Hearn, E. F., McCarley, R. W., & Greene, R. W. (1996). NMDA-dependent modulation of CA1 local circuit inhibition. *Journal of Neuroscience*, 16(6), 2034-2043.
141. Li, Q., Clark, S., Lewis, D. V., & Wilson, W. A. (2002). NMDA receptor antagonists disinhibit rat posterior cingulate and retrosplenial cortices: a potential mechanism of neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, 22(8), 3070-3080.
142. Homayoun, H., & Moghaddam, B. (2007). NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience*, 27(43), 11496-11500.
143. Akbarian, S., & Huang, H. S. (2006). Molecular and cellular mechanisms of altered GAD1/GAD67 expression in schizophrenia and related disorders. *Brain research reviews*, 52(2), 293-304.
144. Eyles, D. W., McGrath, J. J., & Reynolds, G. P. (2002). Neuronal calcium-binding proteins and schizophrenia. *Schizophrenia research*, 57(1), 27-34.
145. Belforte, J. E., Zsiros, V., Sklar, E. R., Jiang, Z., Yu, G., Li, Y., ... & Nakazawa, K. (2010). Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nature neuroscience*, 13(1), 76-83.
146. Alvarez, R. J., Pafundo, D. E., Zold, C. L., & Belforte, J. E. (2020). Interneuron NMDA receptor ablation induces hippocampus-prefrontal cortex functional hypoconnectivity after adolescence in a mouse model of schizophrenia. *Journal of Neuroscience*, 40(16), 3304-3317.
147. Nakao, K., Jeevakumar, V., Jiang, S. Z., Fujita, Y., Diaz, N. B., Pretell Annan, C. A., ... & Nakazawa, K. (2019). Schizophrenia-like dopamine release abnormalities in a mouse model of NMDA receptor hypofunction. *Schizophrenia bulletin*, 45(1), 138-147.
148. Nakao, K., & Nakazawa, K. (2014). Brain state-dependent abnormal LFP activity in the auditory cortex of a schizophrenia mouse model. *Frontiers in neuroscience*, 8, 168.
149. González Sanabria, J. (2023). Rol de la corteza prefrontal medial en la codificación de información contextual en un modelo murino de esquizofrenia. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
150. Pretell Annan, C.A. (2023). Rol de las interneuronas parvalbúmina positivas en un modelo animal útil para el estudio fisiopatológico de la esquizofrenia. (Tesis doctoral, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires).
151. Zoicas, I., & Kornhuber, J. (2019). The role of the N-methyl-D-aspartate receptors in social behavior in rodents. *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5599.
152. Saunders, J. A., Tatard-Leitman, V. M., Suh, J., Billingslea, E. N., Roberts, T. P., & Siegel, S. J. (2013). Knockout of NMDA receptors in parvalbumin interneurons recreates autism-like phenotypes. *Autism Research*, 6(2), 69-77.
153. Billingslea, E. N., Tatard-Leitman, V. M., Anguiano, J., Jutzeler, C. R., Suh, J., Saunders, J. A., ... & Siegel, S. J. (2014). Parvalbumin cell ablation of NMDA-R1 causes increased resting network excitability with associated social and self-care deficits. *Neuropsychopharmacology*, 39(7), 1603-1613.
154. Ferri, S. L., Pallathra, A. A., Kim, H., Dow, H. C., Raje, P., McMullen, M., ... & Brodtkin, E. S.

- (2020). Sociability development in mice with cell-specific deletion of the NMDA receptor NR1 subunit gene. *Genes, Brain and Behavior*, 19(1), e12624.
155. Gao, W. J., Yang, S. S., Mack, N. R., & Chamberlin, L. A. (2022). Aberrant maturation and connectivity of prefrontal cortex in schizophrenia—contribution of NMDA receptor development and hypofunction. *Molecular psychiatry*, 27(1), 731-743.
156. Millan, M. J., Agid, Y., Brüne, M., Bullmore, E. T., Carter, C. S., Clayton, N. S., ... & Young, L. J. (2012). Cognitive dysfunction in psychiatric disorders: characteristics, causes and the quest for improved therapy. *Nature reviews Drug discovery*, 11(2), 141-168.
157. Selemon, L. D., & Zecevic, N. (2015). Schizophrenia: a tale of two critical periods for prefrontal cortical development. *Translational psychiatry*, 5(8), e623-e623.
158. Bäckman, C. M., Malik, N., Zhang, Y., Shan, L., Grinberg, A., Hoffer, B. J., ... & Tomac, A. C. (2006). Characterization of a mouse strain expressing Cre recombinase from the 3' untranslated region of the dopamine transporter locus. *genesis*, 44(8), 383-390.
159. Augood, S. J., Westmore, K., McKenna, P. J., & Emson, P. C. (1993). Co-expression of dopamine transporter mRNA and tyrosine hydroxylase mRNA in ventral mesencephalic neurones. *Molecular brain research*, 20(4), 328-334.
160. Bello Gay, E. P. (2012). Estudio funcional del receptor dopaminérgico D2 en el sistema nervioso central mediante el uso de ratones mutantes inducibles. (Tesis doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires).
161. Yang, M., Silverman, J. L., & Crawley, J. N. (2011). Automated three-chambered social approach task for mice. *Current protocols in neuroscience*, 56(1), 8-26.
162. Sterley, T. L., & Bains, J. S. (2021). Social communication of affective states. *Current Opinion in Neurobiology*, 68, 44-51.
163. Kraeuter, A. K., Guest, P. C., & Sarnyai, Z. (2019). Free dyadic social interaction test in mice. *Pre-Clinical Models: Techniques and Protocols*, 93-97.
164. Fan, Z., Zhu, H., Zhou, T., Wang, S., Wu, Y., & Hu, H. (2019). Using the tube test to measure social hierarchy in mice. *Nature Protocols*, 14(3), 819-831.
165. Noaín, D., Pérez-Millán, M. I., Bello, E. P., Luque, G. M., Cordero, R. C., Gelman, D. M., ... & Rubinstein, M. (2013). Central dopamine D2 receptors regulate growth-hormone-dependent body growth and pheromone signaling to conspecific males. *Journal of Neuroscience*, 33(13), 5834-5842.
166. De Vries, H. A. N. (1998). Finding a dominance order most consistent with a linear hierarchy: a new procedure and review. *Animal behaviour*, 55(4), 827-843.
167. Koolhaas, J. M., Coppens, C. M., de Boer, S. F., Buwalda, B., Meerlo, P., & Timmermans, P. J. (2013). The resident-intruder paradigm: a standardized test for aggression, violence and social stress. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (77), 4367.
168. Miczek, K. A., & O'Donnell, J. M. (1978). Intruder-evoked aggression in isolated and nonisolated mice: effects of psychomotor stimulants and L-dopa. *Psychopharmacology*, 57, 47-55.
169. Paxinos, G., & Franklin, K. B. J. (2001). The mouse brain in stereotaxic coordinates. 2nd

Edition, Academic Press, San Diego.

170. Wilson, C. A., & Koenig, J. I. (2014). Social interaction and social withdrawal in rodents as readouts for investigating the negative symptoms of schizophrenia. *European Neuropsychopharmacology*, 24(5), 759-773.
171. Szlachta, M., Pabian, P., Kuśmider, M., Solich, J., Kolasa, M., Żurawek, D., ... & Faron-Górecka, A. (2017). Effect of clozapine on ketamine-induced deficits in attentional set shift task in mice. *Psychopharmacology*, 234, 2103-2112.
172. Midway, S., Robertson, M., Flinn, S., & Kaller, M. (2020). Comparing multiple comparisons: practical guidance for choosing the best multiple comparisons test. *PeerJ* 8: e10387.
173. Jiang, Z., Rompala, G. R., Zhang, S., Cowell, R. M., & Nakazawa, K. (2013). Social isolation exacerbates schizophrenia-like phenotypes via oxidative stress in cortical interneurons. *Biological psychiatry*, 73(10), 1024-1034.
174. Fitton, A., & Heel, R. C. (1990). Clozapine: a review of its pharmacological properties, and therapeutic use in schizophrenia. *Drugs*, 40, 722-747.
175. Siskind, D., McCartney, L., Goldschlager, R., & Kisely, S. (2016). Clozapine v. first-and second-generation antipsychotics in treatment-refractory schizophrenia: systematic review and meta-analysis. *The British Journal of Psychiatry*, 209(5), 385-392.
176. Garrido Zinn, C., Clairis, N., Silva Cavalcante, L. E., Furini, C. R. G., de Carvalho Myskiw, J., & Izquierdo, I. (2016). Major neurotransmitter systems in dorsal hippocampus and basolateral amygdala control social recognition memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(33), E4914-E4919.
177. Bielsky, I. F., Hu, S. B., Szegda, K. L., Westphal, H., & Young, L. J. (2004). Profound impairment in social recognition and reduction in anxiety-like behavior in vasopressin V1a receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology*, 29(3), 483-493.
178. Ferguson, J. N., Young, L. J., Hearn, E. F., Matzuk, M. M., Insel, T. R., & Winslow, J. T. (2000). Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nature genetics*, 25(3), 284-288.
179. Bielsky, I. F., & Young, L. J. (2004). Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides*, 25(9), 1565-1574.
180. Ferguson, J. N., Aldag, J. M., Insel, T. R., & Young, L. J. (2001). Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *Journal of Neuroscience*, 21(20), 8278-8285.
181. Garavan, H., Pendergrass, J. C., Ross, T. J., Stein, E. A., & Risinger, R. C. (2001). Amygdala response to both positively and negatively valenced stimuli. *Neuroreport*, 12(12), 2779-2783.
182. Pignatelli, M., & Beyeler, A. (2019). Valence coding in amygdala circuits. *Current opinion in behavioral sciences*, 26, 97-106.
183. Correia, S. S., & Goossens, K. A. (2016). Input-specific contributions to valence processing in the amygdala. *Learning & Memory*, 23(10), 534-543.
184. Baddeley, A. (2020). Working memory. *Memory*, 71-111.
185. Ott, T., & Nieder, A. (2019). Dopamine and cognitive control in prefrontal cortex. *Trends in*

cognitive sciences, 23(3), 213-234.

186. Vijayraghavan, S., Wang, M., Birnbaum, S. G., Williams, G. V., & Arnsten, A. F. (2007). Inverted-U dopamine D1 receptor actions on prefrontal neurons engaged in working memory. *Nature neuroscience*, 10(3), 376-384.

187. Sawaguchi, T., & Goldman-Rakic, P. S. (1991). D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science*, 251(4996), 947-950.

188. Murphy, B. L., Arnsten, A. F., Goldman-Rakic, P. S., & Roth, R. (1996). Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), 1325-1329.

189. Del Pino, I., García-Frigola, C., Dehorter, N., Brotons-Mas, J. R., Alvarez-Salvado, E., de Lagrán, M. M., ... & Rico, B. (2013). *ErbB4* deletion from fast-spiking interneurons causes schizophrenia-like phenotypes. *Neuron*, 79(6), 1152-1168.

190. Cao, W., Li, J. H., Lin, S., Xia, Q. Q., Du, Y. L., Yang, Q., ... & Luo, J. H. (2022). NMDA receptor hypofunction underlies deficits in parvalbumin interneurons and social behavior in neurotrophin 3 R451C knockin mice. *Cell Reports*, 41(10).

191. Ma, Q., Jiang, L., Chen, H., An, D., Ping, Y., Wang, Y., ... & Hu, W. (2023). Histamine H2 receptor deficit in glutamatergic neurons contributes to the pathogenesis of schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(9), e2207003120.

192. Golani, I., Tadmor, H., Buonanno, A., Kremer, I., & Shamir, A. (2014). Disruption of the *ErbB* signaling in adolescence increases striatal dopamine levels and affects learning and hedonic-like behavior in the adult mouse. *European Neuropsychopharmacology*, 24(11), 1808-1818.

193. Takao, K., Kobayashi, K., Hagihara, H., Ohira, K., Shoji, H., Hattori, S., ... & Miyakawa, T. (2013). Deficiency of *schurri-2*, an MHC enhancer binding protein, induces mild chronic inflammation in the brain and confers molecular, neuronal, and behavioral phenotypes related to schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 38(8), 1409-1425.

194. Scott, R., Poole, K. L., Schmidt, L. A., & Hassan, R. (2025). Caring Too Much or Too Little? Relations Among Motivations for Social Withdrawal, Empathy, and Prosociality in Emerging Adulthood. *Scandinavian Journal of Psychology*.

195. Thorup, A., Albert, N., Bertelsen, M., Petersen, L., Jeppesen, P., Le Quack, P., ... & Nordentoft, M. (2014). Gender differences in first-episode psychosis at 5-year follow-up—two different courses of disease? Results from the OPUS study at 5-year follow-up. *European Psychiatry*, 29(1), 44-51.

196. Lappin, J. M., Heslin, M., Lomas, B., Jones, P. B., Doody, G. A., Reininghaus, U. A., ... & Morgan, C. (2018). Early sustained recovery following first episode psychosis: Evidence from the AESOP10 follow-up study. *Schizophrenia Research*, 199, 341-345.

197. Grossman, L. S., Harrow, M., Rosen, C., Faull, R., & Strauss, G. P. (2008). Sex differences in schizophrenia and other psychotic disorders: a 20-year longitudinal study of psychosis and recovery. *Comprehensive psychiatry*, 49(6), 523-529.

198. Perry, W., Moore, D., & Braff, D. (1995). Gender differences on thought disturbance measures among schizophrenic patients. *The American journal of psychiatry*, 152(9), 1298-1301.

199. Hippenmeyer, S., Vrieseling, E., Sigrist, M., Portmann, T., Laengle, C., Ladle, D. R., & Arber,

- S. (2005). A developmental switch in the response of DRG neurons to ETS transcription factor signaling. *PLoS biology*, 3(5), e159.
200. Carta, I., Chen, C. H., Schott, A. L., Dorizan, S., & Khodakhah, K. (2019). Cerebellar modulation of the reward circuitry and social behavior. *Science*, 363(6424), eaav0581.
201. Tsai, P. T., Hull, C., Chu, Y., Greene-Colozzi, E., Sadowski, A. R., Leech, J. M., ... & Sahin, M. (2012). Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature*, 488(7413), 647-651.
202. Goldberg, E. M., Jeong, H. Y., Kruglikov, I., Tremblay, R., Lazarenko, R. M., & Rudy, B. (2011). Rapid developmental maturation of neocortical FS cell intrinsic excitability. *Cerebral cortex*, 21(3), 666-682.
203. Doischer, D., Hosp, J. A., Yanagawa, Y., Obata, K., Jonas, P., Vida, I., & Bartos, M. (2008). Postnatal differentiation of basket cells from slow to fast signaling devices. *Journal of Neuroscience*, 28(48), 12956-12968.
204. de Moura Linck, V., Herrmann, A. P., Goerck, G. C., Iwu, M. M., Okunji, C. O., Leal, M. B., & Elisabetsky, E. (2008). The putative antipsychotic alstonine reverses social interaction withdrawal in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 32(6), 1449-1452.
205. Hollis, F., & Kabbaj, M. (2014). Social defeat as an animal model for depression. *ILAR journal*, 55(2), 221-232.
206. Keeney, A., Jessop, D. S., Harbuz, M. S., Marsden, C. A., Hogg, S., & Blackburn-Munro, R. E. (2006). Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. *Journal of neuroendocrinology*, 18(5), 330-338.

ANEXO

1. Expresión del DREADD inhibitorio en las neuronas dopaminérgicas de la VTA de los ratones DAT-Cre

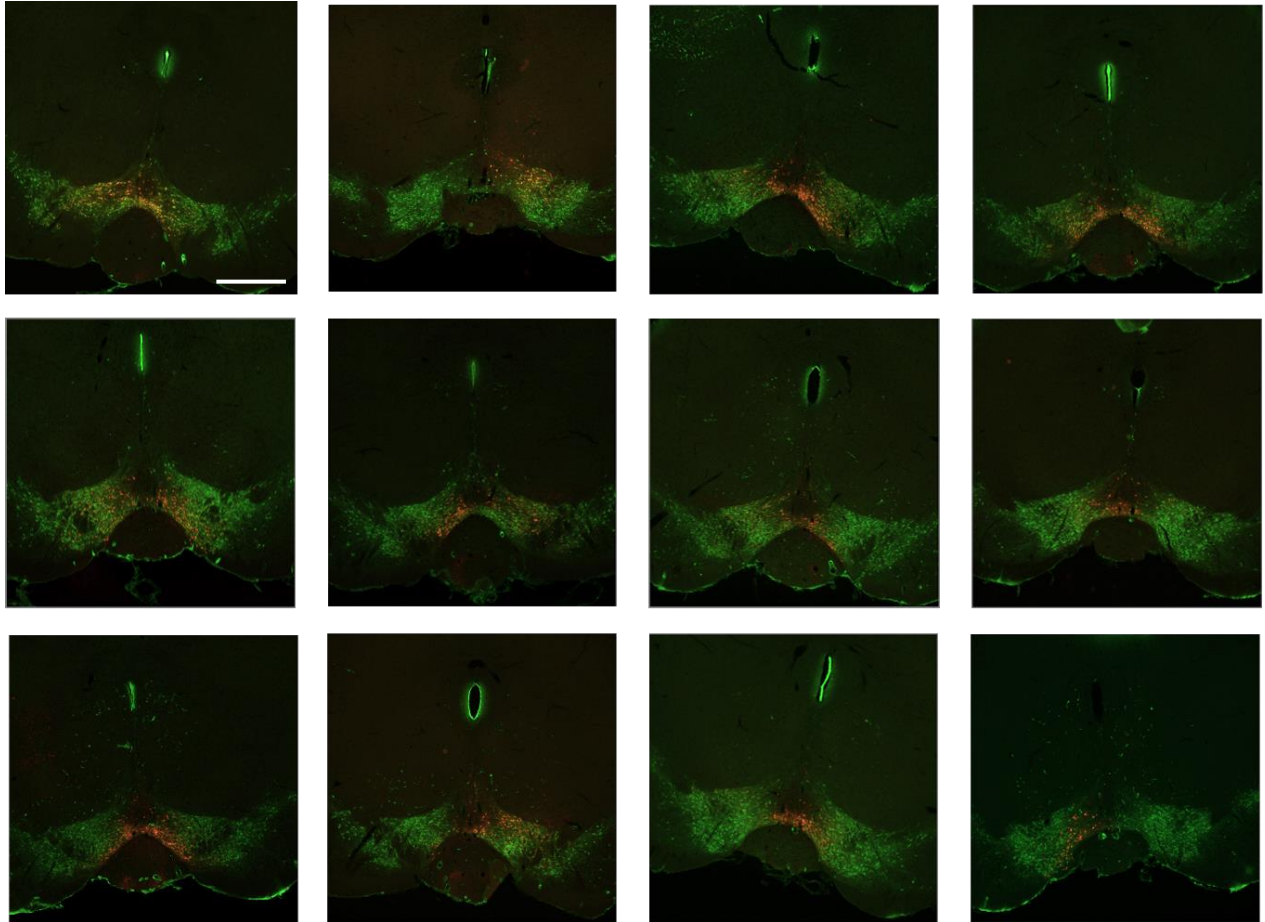


Figura A1. Inhibición quimiogénica de la actividad dopaminérgica de la VTA. En este panel se incluyen imágenes de secciones coroneales del mesencéfalo de ratones DAT-Cre de la primera camada evaluada. Las imágenes se seleccionaron en función de la coordenada anteroposterior en la que se detectó la mayor expresión viral del marcador mCherry (Bregma -3.40 a -3.60). La barra de la escala representa 1 mm.

2. Interacción social prolongada en hembras *Grin1* KO y control en el EAST

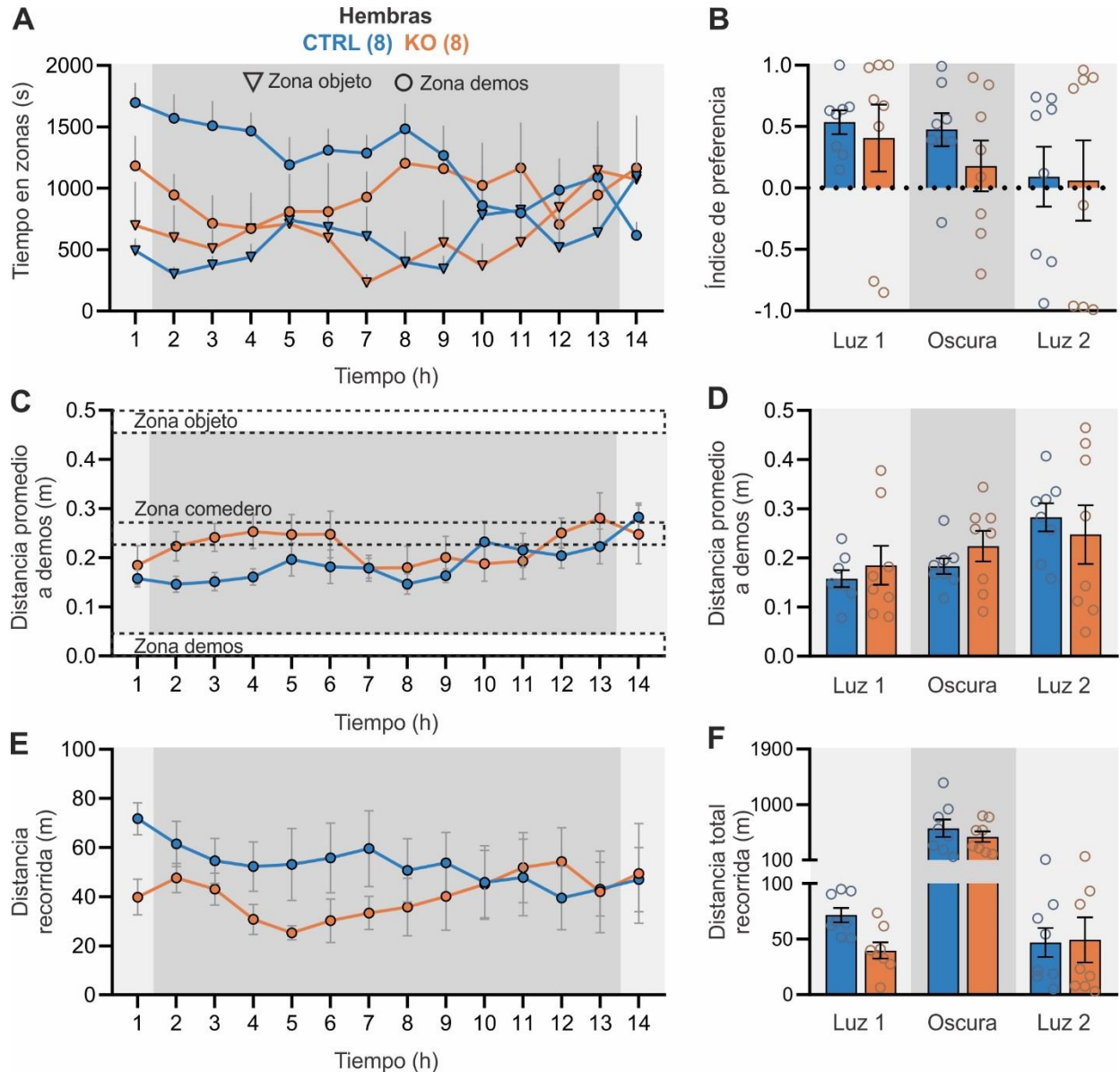


Figura A2. Con el fin de evaluar el comportamiento social de hembras *Grin1* KO y control durante un período prolongado, llevamos a cabo el EAST en dos camadas independientes de animales, utilizando el mismo protocolo experimental que en machos. En esta oportunidad, utilizamos como estímulo social a hembras *wild-type* de la misma edad. **A.** Tiempo de permanencia en la zona social y del objeto (ANOVA de tres vías de medidas repetidas: interacción de tres vías: $F_{13,182} = 1.346$, $p = 0.190$; interacción de dos vías genotipo x estímulo: $F_{1,14} = 0.459$, $p = 0.509$; factor genotipo: $F_{1,14} = 0.600$, $p = 0.452$). **B.** Índice de preferencia (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{2,28} = 0.342$, $p = 0.713$; factor genotipo: $F_{1,14} = 0.335$, $p = 0.572$; factor fase: $F_{2,28} = 3.077$, $p = 0.062$). **C.** Ubicación espacial promedio en el brazo, calculada como la distancia desde la ventana de exploración de la zona social para cada hora de la prueba (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{13,182} = 1.580$, $p = 0.094$; factor genotipo: $F_{1,14} = 0.986$; $p = 0.338$). **D.** Distancia promedio a los demostradores en cada fase de la prueba (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{2,28} = 1.154$, $p = 0.330$; factor genotipo: $F_{1,14} = 0.077$,

$p = 0.786$; factor fase: $F_{2,28} = 6.449$, $p = 0.05$). **E.** Actividad locomotora durante cada hora de la prueba (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{13,182} = 1.500$, $p = 0.121$; factor genotipo: $F_{1,14} = 0.843$, $p = 0.374$; factor tiempo: $F_{13,182} = 0.672$, $p = 0.789$). **F.** Distancia total recorrida en cada fase de la prueba (ANOVA de dos vías de medidas repetidas: interacción: $F_{2,28} = 0.630$, $p = 0.540$; factor genotipo: $F_{1,14} = 0.843$, $p = 0.374$; factor fase: $F_{2,28} = 38.50$, $p \leq 0.001$). Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM. CTRL: hembras control ($n = 8$); KO: hembras *Grin1* KO ($n = 8$).

3. Variantes del test de discriminación afectiva en animales *wild-type*

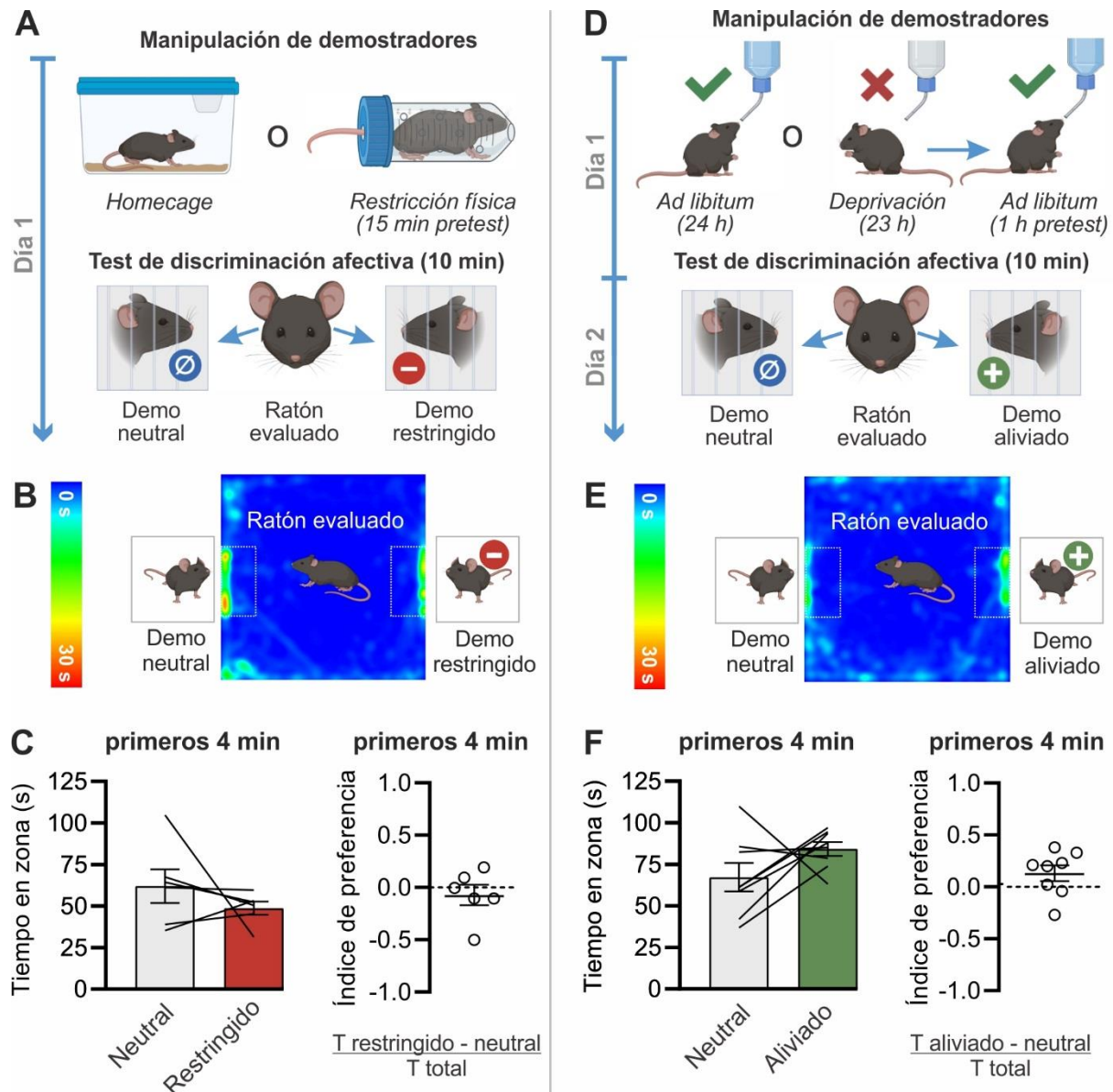


Figura A3. Con el fin de evaluar otras alternativas para alterar el estado afectivo de los animales, utilizamos manipulaciones experimentales desarrolladas recientemente por otros equipos de trabajo [11, 12]. **(A-C)** En una variante aversiva del paradigma, los ratones *wild-type* evaluados ($n = 6$) pudieron interactuar durante 10 minutos con un demostrador restringido físicamente en un tubo *falcon* durante 15 minutos antes del test y con un demostrador neutral que permaneció inalterado en su jaula de origen durante el mismo

lapso. **A.** Diseño experimental. **B.** Mapa de calor de la posición de la cabeza de un ratón C57Bl/6 *wild type* representativo durante toda la sesión, donde el azul y el rojo indican los tiempos de exploración más bajos y más altos, respectivamente. Las zonas virtuales fueron representadas con líneas punteadas. **C.** (*Izquierda*) Los animales evaluados exploraron por un tiempo similar a ambos demostradores durante los primeros cuatro minutos del test (prueba de t pareada: $t_6 = 1.018$, $p = 0.355$). (*Derecha*) El índice de preferencia no fue significativamente distinto del nivel de chance, representado con la línea punteada (prueba de t de una muestra: $t_5 = 0.674$, $p = 0.530$). **(D-F)** En una variante apetitiva del paradigma, los ratones *wild-type* evaluados ($n = 8$) pudieron interactuar durante 10 minutos con un demostrador neutral que recibió agua *ad libitum* dentro de su jaula hasta el comienzo de la prueba, junto con uno que fue privado de agua durante 23 horas y que volvió a acceder a la misma durante 1 hora antes de la prueba de manera *ad libitum*. **D.** Diseño experimental. **E.** Mapa de calor de la posición de la cabeza de un ratón C57Bl/6 *wild type* representativo durante toda la sesión, donde el azul y el rojo indican los tiempos de exploración más bajos y más altos, respectivamente. Las zonas virtuales fueron representadas con líneas punteadas. **F.** (*Izquierda*) Los animales evaluados exploraron por un tiempo similar a ambos demostradores durante los primeros cuatro minutos del test (prueba de t pareada: $t_7 = 1.502$, $p = 0.177$). (*Derecha*) El índice de preferencia no fue significativamente distinto del nivel de chance, representado con la línea punteada (prueba de t de una muestra: $t_7 = 1.740$, $p = 0.125$). Los resultados se expresan como media $\pm$ SEM.