



***INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE
ABAPERIDONA, UN NUEVO ANTIPSICÓTICO***

5-HT_{2A} / D₂ Y α_1 -ADRENÉRGICO.

***MODELOS IN VITRO E IN VIVO PREDICTIVOS DE
EFICACIA Y EFECTOS SECUNDARIOS***

Marta Príncipe i Mota

Febrer 2004



Departament de Bioquímica i Biologia Molecular.
Facultat de Biologia. Universitat de Barcelona.
Curs de Doctorat de Biomedicina 2000-2002

***INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE ABAPERIDONA, UN
NUEVO ANTIPSICÓTICO 5-HT_{2A} / D₂ Y α₁-ADRENÉRGICO.
MODELOS IN VITRO E IN VIVO PREDICTIVOS DE EFICACIA Y
EFECTOS SECUNDARIOS***

Memoria realizada por Marta Príncep i
Mota en el Centro de Investigación y
Desarrollo del Grupo Ferrer para
optar al título de Doctor por la
Facultad de Biología de la
Universidad de Barcelona

Director de la Tesis Doctoral,
Dr. Antonio Guglietta, Director del
Centro de Investigación y Desarrollo
del Grupo Ferrer

Tutor de la Tesis Doctoral, Dr. Marçal Pastor i Anglada
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular,
Facultad de Biología, Universidad de Barcelona

Barcelona, febrero de 2004



El proyecto de esta memoria surgió de manera bastante improvisada un noviembre de hace tres años. Como consecuencia de una conversación con Antonio, al cabo de una semana estaba matriculada en los cursos de doctorado. Tuve suerte entonces, me matriculé el último día posible, y la he seguido teniendo durante todo este tiempo.

En este punto, quisiera expresar mi agradecimiento a las personas que han colaborado y hecho posible que este proyecto se lleve a cabo.

En primer lugar a Antonio, que me dio la oportunidad y ánimos de realizarlo, además de ser un crítico severo y recordame siempre que ‘no me enrolle’. A Marçal, que desde la facultad me ha facilitado el enfoque académico del tema y dedicado bastante de su escaso tiempo en ayudarme.

A Cristina, por todo el trabajo de revisión, análisis de datos y representación gráfica realizado y sobre todo por aguantar todas las manías y cambios que he ido introduciendo a medida que se desarrollaba el trabajo. A Jose y Daniel, que han revisado con cariño el manuscrito y animado cuando era necesario.

A Sonia, Imma, Cristina Tarragó y Fabiana, que han seguido el día a día con un ‘venga, un poco más, tú puedes’. Efectivamente Sonia, al final he podido.

Finalmente a dos personas, Rafael Maldonado y Miquel LLobera, que sin prácticamente conocerme, me han brindado su experiencia, ayuda y consejos cuando los he solicitado.

Como me dijo Rafael hace tiempo, discutir con uno mismo es bastante limitante. Discutir con todos vosotros ha sido gratificante. A todos, muchísimas gracias.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1.- Esquizofrenia	2
I.2.- Etiología y patogenia	7
I.3.- Genes candidatos	11
I.4.- Substrato neuroanatómico	15
I.5.- Mecanismo de acción de los fármacos. Terapéutica.	18
I.6.- Compuestos 7-[3-[1-piperidinil]propoxi]cromenonas como antipsicóticos atípicos potenciales. Antecedentes.	26
II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	29
III.- MATERIALES Y MÉTODOS	33
III.1.- Animales	34
III.2.- Compuestos y soluciones	35
III.3.- Ensayos <i>in vitro</i> .	37
III.3.1.- Ensayos de radioligando	37
III.3.2.- Ensayos <i>ex -vivo</i>	43
III.4.- Ensayos funcionales	44
III.4.1.- Ensayos funcionales <i>in vitro</i>	44
III.4.2.- Ensayos funcionales <i>in vivo</i>	45
III.5.- Modelos conductuales	46
III.5.1.- Modelos conductuales predictivos de actividad antipsicótica	46
III.5.1.1.- Inhibición del comportamiento de escalada ('climbing') inducido por apomorfina en ratón	46
III.5.1.2.- Inhibición de la hiperactividad inducida por apomorfina, p-cloroanfetamina (PCA) o dizocilpina (MK801) en ratón.	48

ÍNDICE

III.5.1.3.- Inhibición de los déficits sensorimotores (Prepulse Inhibition, PPI) inducidos por apomorfina o fenciclidina en rata.	50
III.5.1.4.- Inhibición de las sacudidas de cabeza ('Head-twitches') inducidas por DOI [1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano] en ratón NMRI	54
III.5.1.5.- Reversión de la hipolocomoción inducida por mCPP [1-3-clorofenil)piperazina] en ratas	55
III.5.1.6.- Protección a la letalidad inducida por noradrenalina en ratón	57
III.5.2.- Modelos conductuales predictivos de efectos adversos relacionados con el mecanismo de acción	58
III.5.2.1.- Inducción de catalepsia en ratas tras tratamiento agudo y subagudo	58
III.5.2.2.- Inhibición de la estereotipia inducida por apomorfina o d-anfetamina en ratas	60
III.5.2.3.- Inhibición del comportamiento de aseo ('grooming') inducido por SKF-38393 en ratón.	61
III.5.2.4.- Actividad motora espontánea en ratas.	61
III.5.2.5.- Protección a la letalidad inducida por fisostigmina en ratón	62
III.6.- Determinación de efectos neuroendocrinos y cardiovasculares relacionados con el mecanismo de acción	63
III.6.1.- Determinación de los niveles de prolactina en suero de ratas.	63
III.6.2.- Determinación de la presión arterial y frecuencia cardiaca en rata consciente.	63
IV.- RESULTADOS	65
IV.1.- Resultados de ensayos <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i>	66
IV.1.1.- Ensayos de radioligando	66
IV.1.2.- Ensayos de unión <i>ex vivo</i>	68

ÍNDICE

IV.2.- Resultados de ensayos funcionales <i>in vitro</i> y <i>in vivo</i>	70
IV.2.1.- <i>In vitro</i>	70
IV.2.2.- <i>In vivo</i>	71
IV.3.- Resultados de modelos conductuales	73
IV.3.1.- Resultados de modelos predictivos de actividad antipsicótica	73
IV.3.1.1.- Mecanismos dopaminérgicos	75
IV.3.1.2.- Mecanismos serotoninérgicos	78
IV.3.1.3.- Mecanismos adrenérgicos	80
IV.3.1.4.- Mecanismos glutamatoérgicos	80
IV.3.2.- Resultados de modelos predictivos de efectos secundarios relacionados con el mecanismo de acción	82
IV.3.2.1.- Modelos de EPS y otros efectos motores	84
IV.3.2.2.- Modelos predictivos de efectos anticolinérgicos	88
IV.4.- Resultados de efectos neuroendocrinos y cardiovasculares relacionados con el mecanismo de acción	88
IV.4.1.- Efectos neuroendocrinos	88
IV.4.2.- Efectos sobre los parámetros cardiovasculares <i>in vivo</i>	90
V.- DISCUSIÓN	93
VI.- CONCLUSIONES	112
VII.- BIBLIOGRAFÍA	116
	141

Relación de Tablas y Figuras

Tablas

Tabla 1. *Áreas funcionales afectadas en los pacientes esquizofrénicos y déficits cognitivos asociados.*

Tabla 2. *Relación de parentesco e incidencia de la esquizofrenia.*

Tabla 3. *Resumen de algunos cromosomas, genes y polimorfismos de receptores implicados en la etiología de la esquizofrenia.*

Tabla 4. *Fármacos comercializados para el tratamiento de la esquizofrenia según el mecanismo de acción.*

Tabla 5. *Actividad in vitro e in vivo (vía oral) de los compuestos de la serie 7-[3-(1-piperidinil)propoxi]chromenonas y compuestos de referencia.*

Tabla 6. *Obtención de tejidos para estudios de afinidad a radioligando.*

Tabla 7. *Condiciones del ensayo de competición en receptores procedentes de animales de experimentación.*

Tabla 8. *Condiciones de ensayos de competición en receptores clonados humanos.*

Tabla 9. *Descripción de los tipos de ensayos realizados en la prueba del PPI.*

Tabla 10. *Perfil de unión a radioligando de Abaperidona y los antipsicóticos de referencia (K_i).*

Tabla 11. *Ensayos de unión ex-vivo de Abaperidona y los antipsicóticos de referencia.*

Tabla 12. *Resultados de los ensayos funcionales in vitro e in vivo.*

Tabla 13. *Resultados de modelos conductuales predictivos de actividad antipsicótica.*

Tabla 14. *Modelos conductuales predictivos de efectos secundarios relacionados con el mecanismo de acción.*

Tabla 15. *Ratios de actividad in vitro e in vivo entre distintos receptores.*

Figuras

Fig. 1. Resumen de los tipos de trastornos que se engloban en los déficits cognitivos y la sintomatología positiva y negativa en la esquizofrenia.

Fig. 2. Hipótesis sobre la etiología de la esquizofrenia. Interrupciones en el desarrollo prenatal del cerebro por causas genéticas y/o ambientales (primera fase) incrementarían la vulnerabilidad del individuo (predisposición) a subsiguientes factores estresantes ambientales (segunda fase), originando la aparición de la esquizofrenia. Ni los cambios prenatales (panel del medio) ni los factores ambientales tardíos (panel superior) por si solos son capaces de inducir la enfermedad (Van den Buuse et al., 2003)

Fig. 3. Esquema teórico de la implicación de los genes susceptibles de inducir esquizofrenia en la plasticidad neuronal en una sinapsis glutamatoérgica. Las sinapsis monoaminérgicas, colinérgicas y GABAérgicas también estarían implicadas (Harrison & Owen, Lancet, 2003).

Fig. 4. Esquema del efecto que induciría un agente antagonista D₂ sobre los receptores postsinápticos en las cuatro zonas mayoritarias que inervan las vías dopaminérgicas.

Fig. 5. Relación del ratio de atipicidad de algunos de los antipsicóticos típicos y atípicos comercializados (Richelson, 1999).

Fig. 6. Representación de las interacciones de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico en el circuito cortico-estriado-talámico (Schmidt et al., 1995).

Fig. 7. Representación esquemática de la estructura inicial de las series de compuestos desarrollados como potenciales antipsicóticos.

Fig. 8. Representación de la fórmula química de Abaperidona y otros antipsicóticos atípicos.

Fig. 9. Prueba del comportamiento de escalada. A: animal tratado con vehículo + Apomorfina. B: animal tratado con compuesto antagonista D₂ + Apomorfina.

Fig. 10. Detalle de una sensora del Actímetro DAS 16 (Panlab sl). Consta en la parte superior de la arena de experimentación, en la parte inferior la unidad de contajes y un perímetro cuadrangular con células de rayos infrarrojos que permite el contaje del nº de rearings.

Fig. 11. Animal Acoustic Startle System. Cámara de insonorización en el que sea hallan las sensoras y los altavoces. En la poyata, de izquierda a derecha: los amplificadores, la torreta de control del tipo de ondas emitidas-recibidas, ordenador en el que se programan los trial y digitaliza la señal de respuesta.

Fig. 12. Animal Acoustic Startle System. Detalle del interior de una caja de insonorización. Se observa centrado el altavoz que emite ruidos (el de tonos se halla en la tapa superior no visible en la foto), está rodeado de 4 plataformas-sensoras- con jaulas para ratas. En la zona superior de la imagen se observa la rejilla del ventilador que emite un ruido de fondo continuo y regular (background noise) durante todo el experimento.

Fig. 13. Esquema del Videomex-X System, visto por detrás. Se muestran las conexiones entre la cámara de vídeo, el convertidor de señal (Videomex-X) y el ordenador.

Fig. 14. Catalepsia. Demostración de las posiciones utilizadas para la valoración, A: posición de 3 cm; B: posición de 9 cm; C: cruzamiento homolateral.

Fig. 15. Unión ex-vivo de Abaperidona, Risperidona y Haloperidol, 6 μ mol/2mL/kg sc durante 7 días, a receptores D₂ en córtex frontal y estriado y receptores 5-HT_{2A} en córtex. Control: grupo administrado con vehículo. n=10 animales por grupo de tratamiento.

Fig. 16. Efecto de distintas concentraciones de Abaperidona sobre la inhibición ejercida por clonidina de las contracciones inducidas eléctricamente en vaso deferente de rata. ** p<0.01 y *** p<0.001 Abaperidona+clonidina vs clonidina (Student t-Test).

Fig. 17. Efecto de distintas concentraciones crecientes (0.001 a 0.006 mg/kg) de Abaperidona por vía endovenosa sobre la acción de 50 μ g/kg de metoxamina en la presión arterial de rata desmedulada.

Fig. 18. Regresiones lineales del efecto de Abaperidona y los antipsicóticos de referencia, dosis única vía oral, en modelos conductuales predictivos de eficacia. A: inhibición de la escalada inducida por Apomorfina (1 mg/kg sc) en ratón. B: inhibición de la hiperactividad inducida por PCA (5 mg/kg sc) en ratón C: inhibición de la hiperactividad inducida por of Apomorfina (1 mg/kg sc) en ratón. D: inhibición de la hiperactividad inducida por MK801 (0.5 mg/kg sc) en ratón. E. inhibición de las sacudidas de cabeza inducidas por DOI (3 mg/kg ip) en ratón. F: Protección a la letalidad inducida por noradrenalina (1.25 mg/kg ev) en ratón. Los datos son porcentajes de inhibición versus el grupo control. n= 10-15 por grupo de tratamiento.

Fig. 19. Representación del efecto de Abaperidona y Risperidona, a la dosis de 0.5 mg/kg vo, sobre el comportamiento de escalada inducido por apomorfina (1 mg/Kg sc) en ratón a las 2, 4, 6 y 8 h de la administración del producto. Medias de los porcentajes de inhibición respecto al control por tiempo de valoración.

Fig. 20. Efecto de Abaperidona, Risperidona y Clozapina vo, sobre los déficits sensorimotrices inducidos por Apomorfina (0.5 mg/Kg sc) en rata Wistar (n=12). +p<0.05 grupos vehículo-vehículo vs vehículo-apomorfina (t-Student); *p<0.05 grupos compuesto-apomorfina vs vehículo apomorfina (ANOVA, t de Dunnett).

Fig. 21. Curvas representativas de la ASR de ratas Wistar administradas con distinto tratamiento: 1) Abaperidona-Apomorfina, 2) Abaperidona-vehículo, 3) vehículo-apomorfina y 4) vehículo-vehículo. Izquierda: Curvas de en un ensayo de tipo T1 (pulso). Derecha: Curvas de un ensayo de tipo T2 (prepulso+pulso).

Fig. 22. Diagramas de caja del efecto de Abaperidona y los antipsicóticos atípicos de referencia sobre la distancia recorrida en la reversión a la hipolocomoción inducida por m-CPP (2 mg/kg ip) en la rata. Los valores representan la mediana y percentiles 25 y 75 de la distancia recorrida (cm). Kruskal-Wallis: H=22.3, gl=12, p=0.034; *p<0.05 vs control (test de Mann-Whitney). n=10-11 por grupo de tratamiento.

Fig. 23. Efecto de Abaperidona (ABA), Risperidona (RIS), Clozapina (CLZ), Olanzapina (OLZ) y Prazosin (PRZ), dosis única por vía oral, sobre los déficits sensorimotoreos inducidos por Fenciclidina (PCP) (3 mg/Kg sc) en rata S-D (n=12-16). *p<0.05 grupo vehículo-vehículo vs vehículo-PCP (t-Student).

Fig. 24. Regresión lineal de los efectos de Abaperidona y los antipsicóticos de referencia, dosis única vía oral, en modelos predictivos de efectos secundarios relacionados con el mecanismo de acción. A: Inducción de catalepsia en ratas. B: inhibición de la actividad motora espontánea en ratas. C: inhibición de la estereotipia inducida por Apomorfina (1.5 mg/kg sc) en ratas. D: inhibición de la estereotipia inducida por d-Anfetamina (3 mg/kg sc) en ratas. E: inhibición del aseo inducido por SKF 38393 (2.5 mg/kg ip) en ratón. Los datos son porcentajes de inhibición versus el grupo control. n= 10-15 por grupo de tratamiento.

Fig. 25. Regresión lineal de la inducción de catalepsia en rata de Abaperidona y Risperidona por vía intraperitoneal. Los números representan porcentaje de catalepsia respecto a la máxima puntuación posible. n=10-15 ratas.

Fig. 26. Efecto de Abaperidona y los antipsicóticos de referencia en la inducción de la catalepsia en rata, vía oral, en dosis repetida durante 17 días. Porcentaje de catalepsia por grupo de tratamiento y día. La representación del grupo control es la media de los dos grupos controles.

Fig. 27. Diagramas de caja del efecto de Abaperidona y los antipsicóticos de referencia, dosis única, vía oral, sobre la actividad motora espontánea. Los valores representan distancia recorrida (cm). * p<0.05 vs vehículo correspondiente (U de Mann-Whitney). n=10-12 ratas por grupo. CNT, vehículo; ABA, Abaperidona; RIS, Risperidona; HAL, Haloperidol; CLZ, Clozapina.

Fig. 28. Niveles de prolactina en suero (mg/ml) 3 h después de la administración oral de Abaperidona, Risperidona o Haloperidol (5 mg/kg/día), 1 o 3 días consecutivos en rata. Los valores representan la media±error estandar (n= 5 animales). p<0.05 todos los tratamientos vs control en ambas administraciones (no señalado), * p<0.05 diferencias entre tratamientos (Bonferroni's post-hoc test).

Fig. 29. Cambios en la presión arterial media y frecuencia cardíaca (PAM y FC) tras administración única, por vía oral, de Abaperidona-HCl (ABA), Risperidona (RIS) y Clozapina (CLZ) en rata consciente. Los valores representan la media ± error estandar de 5 animales. *p<0.05 y +p<0.01 vs grupo control (ANOVA, Dunnett's post hoc test).

Fig. 30. Cambios en la frecuencia cardíaca y presión arterial media (FC y PAM) tras administración endovenosa de Abaperidona (ABA) o Prazosina (PRZ) en rata consciente. Los valores representan la media ± error estandar de 5 animales. *p<0.05 vs valores basales (ANOVA de medidas repetidas).

Fig. 31. Relación entre la dosis diaria y el nivel de ocupación de receptores 5-HT_{2A} (azul) y D₂ (rojo) para Risperidona, Olanzapina y Clozapina. La línea horizontal muestra el nivel teórico esperado de ocupación del receptor D₂ a la dosis máxima de Clozapina (Kapur et al, 1999).

I.-INTRODUCCIÓN

I.-INTRODUCCIÓN

I.1.- Esquizofrenia.

El término de esquizofrenia significa 'escisión de la mente' y fue utilizado por primera vez por Eugen Bleuler en 1908. Es una enfermedad psiquiátrica severa de etiología desconocida. La prevalencia se sitúa alrededor del 1% de la población general, sin distinción de etnia, sexo o factores socio-culturales.

Debido a la elevada heterogeneidad de los síntomas entre sujetos, la esquizofrenia se considera un síndrome clínico mas que una enfermedad unitaria (Kerns & Berenbaum, 2002; Sawa & Snyder, 2002).

La esquizofrenia se caracteriza por la aparición temprana y estable de déficits cognitivos (función ejecutiva, procesamiento sensorimotor, vigilancia, memoria verbal y de trabajo, aprendizaje), síntomas positivos (alucinaciones, pensamientos desorganizados, ideas fijas, habla sin sentido) o exacerbación de conductas normales (psicosis), a menudo alternados con síntomas negativos (anhedonia, asocialidad, carencias afectivas), que pueden coexistir con déficits psicomotores, depresión y/o ansiedad, generando una disminución o pérdida de las funciones normales (Fig.1 y Tabla 1). Esta sintomatología afecta a la percepción del mundo y del propio yo (Braff et al., 1991; Rowley et al, 2001; Sawa & Snyder, 2002).

Aunque la apreciación de la importancia de los distintos síntomas en el desarrollo de la esquizofrenia ha ido variando en el tiempo según avances científicos y sobre todo terapéuticos, las investigaciones de finales de los 90 subrallan la importancia de los déficits cognitivos como el eje central de la enfermedad. Las disfunciones cognitivas suelen aparecer previas en el tiempo a los síntomas positivos y negativos, mientras que los síntomas negativos pueden no producirse en algunos casos (Sharma & Antonova, 2003).

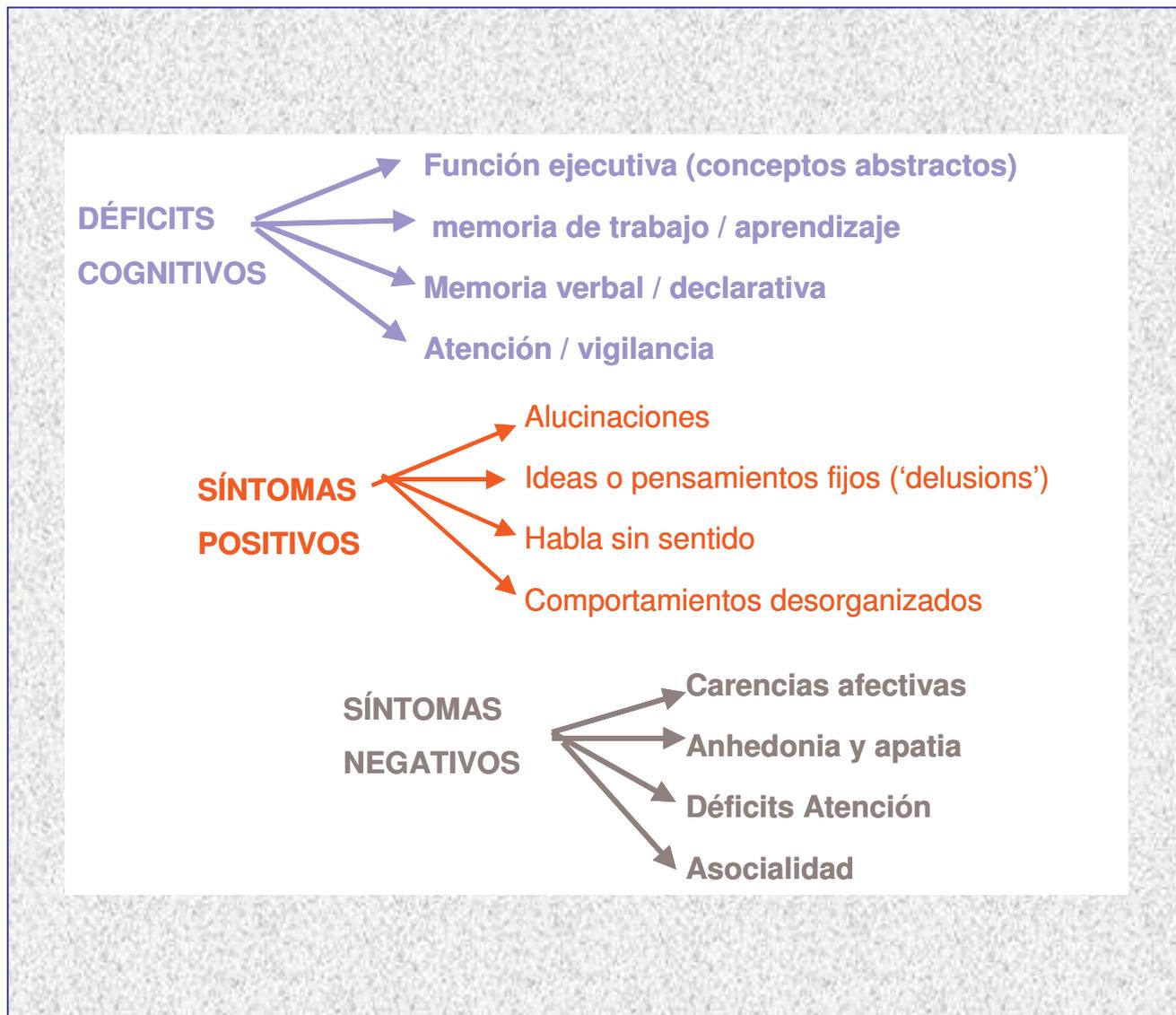


Fig.1.- Resumen de los tipos de trastornos que se engloban en los déficits cognitivos y la sintomatología positiva y negativa en la esquizofrenia

Tabla 1. Areas funcionales afectadas en los pacientes esquizofrénicos y déficits cognitivos asociados.

Área funcional	Elementos cognitivos relacionados
Funciones sociales	Memoria declarativa Vigilancia
Funcionamiento ocupacional	Funciones ejecutivas Memoria declarativa Memoria de trabajo Vigilancia
Vida independiente	Funciones ejecutivas Memoria declarativa Memoria de trabajo

Origen: Sharma & Antonova (2003)

Según el *Diagnostic and Statistical Manual, Fourth Edition (DMS-IV)*, un paciente debe presentar síntomas indicativos de trastornos continuados durante varios meses para diagnosticarse como esquizofrenia. Junto a los síntomas positivos debe mostrar síntomas negativos durante un periodo de tiempo de aproximadamente un mes y/o déficits sociales/ocupacionales que afecten a una o más áreas primordiales de funcionamiento (p. ej, trabajo, relaciones interpersonales) durante un periodo significativo de tiempo a partir de la aparición del trastorno.

Existen cinco subtipos de esquizofrenia tipificados:

- Tipo Paranoide. Se caracteriza por la presencia predominante de ideas o pensamientos fijos ('delusions') y alucinaciones auditivas. Sin embargo, las funciones cognitivas están conservadas. Este subtipo identifica a un paciente que presenta un mejor pronóstico y una mejor relación con la familia, que los otros subtipos.

-
- Tipo Desorganizado. Presencia de habla y pensamientos desorganizados. Es el tipo más severo, impidiendo la realización de tareas simples imprescindibles para la vida diaria.
 - Tipo Catatónico. Se caracteriza por marcadas anomalías psicomotoras, que pueden manifestarse como inmovilidad absoluta (estupor) tanto como incrementos de la actividad motora (excitación).
 - Tipo Indiferenciado. Presenta indistintamente sintomatología de cualquiera de las tipologías anteriores.
 - Tipo Residual. El sujeto no experimenta síntomas psicóticos en el momento del diagnóstico, pero presentó como mínimo un episodio previo.

La aparición de la esquizofrenia se produce generalmente en la pubertad o edades adultas tempranas, entre los 15 y los 45 años, con un 90% en hombres y un 70% en mujeres en las que se diagnostica antes de los 30 años. Es recurrente durante toda la vida del sujeto, con un patrón de brotes psicóticos agudos superpuestos a periodos de ajuste.

Aunque el riesgo y la prevalencia de la esquizofrenia son comparables para hombres y mujeres, si existen diferencias de género en distintos aspectos como la edad de aparición (primeros 20 en hombres frente finales de los 20 en mujeres, con un pico en los 45-50 coincidiendo con inicio de menopausia), síntomas (algunos estudios sugieren mayor prevalencia de síntomas negativos en hombres y afectivos en mujeres) o respuestas a tratamiento (las mujeres en general son mejores respondedoras), probablemente relacionados con las diferencias hormonales entre ambos sexo (Halbreich & Kahn, 2003).

A pesar que los pacientes tratados se recuperan en cierta medida durante los primeros cinco años de haber iniciado el tratamiento, el 65% presentan recaídas recurrentes durante un periodo de varios años y sólo un 30 % son capaces de llevar una vida mínimamente normal. Entre un 20%-30% de pacientes son resistentes a la medicación (Meltzer & McGurk, 1999; Gee et al., 2003).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente 24 millones de personas padecen esquizofrenia, siendo la cuarta causa de discapacidad en el mundo y

causando una elevadísima tasa de hospitalización. Se considera la esquizofrenia como la enfermedad psiquiátrica más cara y la mayor parte de este coste se debe a la disminución o pérdida de las funciones cognitivas normales (Knapp, 1997).

Los esquizofrénicos son pacientes con importantes comorbilidades, como elevado riesgo de obesidad, hiperlipidemia, diabetes, hipertensión y trastornos cardiovasculares, enfermedades de transmisión sexual, fumadores compulsivos y abuso de alcohol (Green et al., 2003). Esto incrementa considerablemente su mortalidad respecto a la población en general, contabilizándose hasta un 60% de las muertes prematuras no asociadas a suicidio. Un 10-15% pueden llegar a cometer suicidio. Los pacientes esquizofrénicos viven una media de 9 a 12 años menos que la población normal, por lo que actualmente la esquizofrenia se cataloga como una enfermedad que acorta la vida ('life-shortening disease').

En este acortamiento de vida influyen mayoritariamente dos factores, ambientes donde hay elevado riesgo de comportamientos poco salubres (fumar o consumir sustancias de abuso, falta de ejercicio y/o dieta pobre) junto un problema médico, en el que a pesar de la elevada prevalencia de estas morbilidades, están menos controladas que en el resto de población. Estudios epidemiológicos han demostrado que más del 40% de pacientes esquizofrénicos hospitalizados presentan enfermedades físicas, pero de éstas, un 45-50% no son detectadas por el médico responsable (Hall et al., 1981; Koran et al., 1989; Lambert et al., 2003).

La esquizofrenia es una enfermedad socialmente estigmatizada, todavía asociada a peligrosidad, lo que genera un alejamiento social a diferencia de otras enfermedades mentales que despiertan mayor compasión (Angermeyer & Matschinger, 2003).

I.2.- Etiología y patogenia

La causa o causas de la esquizofrenia no han sido todavía identificadas. Desde principios de los años 80 se propuso la implicación de factores ambientales así como de factores genéticos, estimándose la participación de la herencia en un porcentaje del 40 al 70% en la aparición de la esquizofrenia (Gottesman & Shields, 1982)

Según la hipótesis del origen de la esquizofrenia durante el neurodesarrollo fetal, actualmente más aceptada, este sería un proceso de doble fase ('two hits'). En una primera fase la convergencia de los factores genéticos con factores ambientales prenatales induciría cambios estructurales y/o funcionales en regiones cerebrales clave para el procesamiento e integración de la información. En una segunda fase, el adulto joven predispuesto, debido a factores estresantes psicosociales, que se consideran los agentes causales finales, desarrollaría la esquizofrenia. La existencia de un largo periodo de latencia entre la lesión cerebral primaria y la aparición de la esquizofrenia podría explicarse por el hecho de que el desarrollo cerebral y la mielinización neuronal continúan durante toda la infancia y juventud, siendo una época de elevada vulnerabilidad (Murray & Lewis, 1987; Harrison, 1999; Rowley et al., 2001; Van den Buuse et al., 2003) (Fig. 2).

Varias líneas de evidencia apoyan el origen de la esquizofrenia durante el neurodesarrollo fetal, incluyendo estudios genéticos, epidemiológicos y estudios neuropatológicos postmortem. Además, para establecer una relación causal de los distintos factores con los cambios en el cerebro y el comportamiento, se han utilizado distintos modelos experimentales con animales. En estos modelos, que van desde lesiones neonatales a manipulaciones ambientales post-natales, a pesar de sus limitaciones, han demostrado alteraciones a largo plazo de comportamiento y/o cambios moleculares en regiones cerebrales concretas que mimetizan o están asociadas a la esquizofrenia (Lipska & Weindberger, 1997; Van den Buuse et al., 2003).

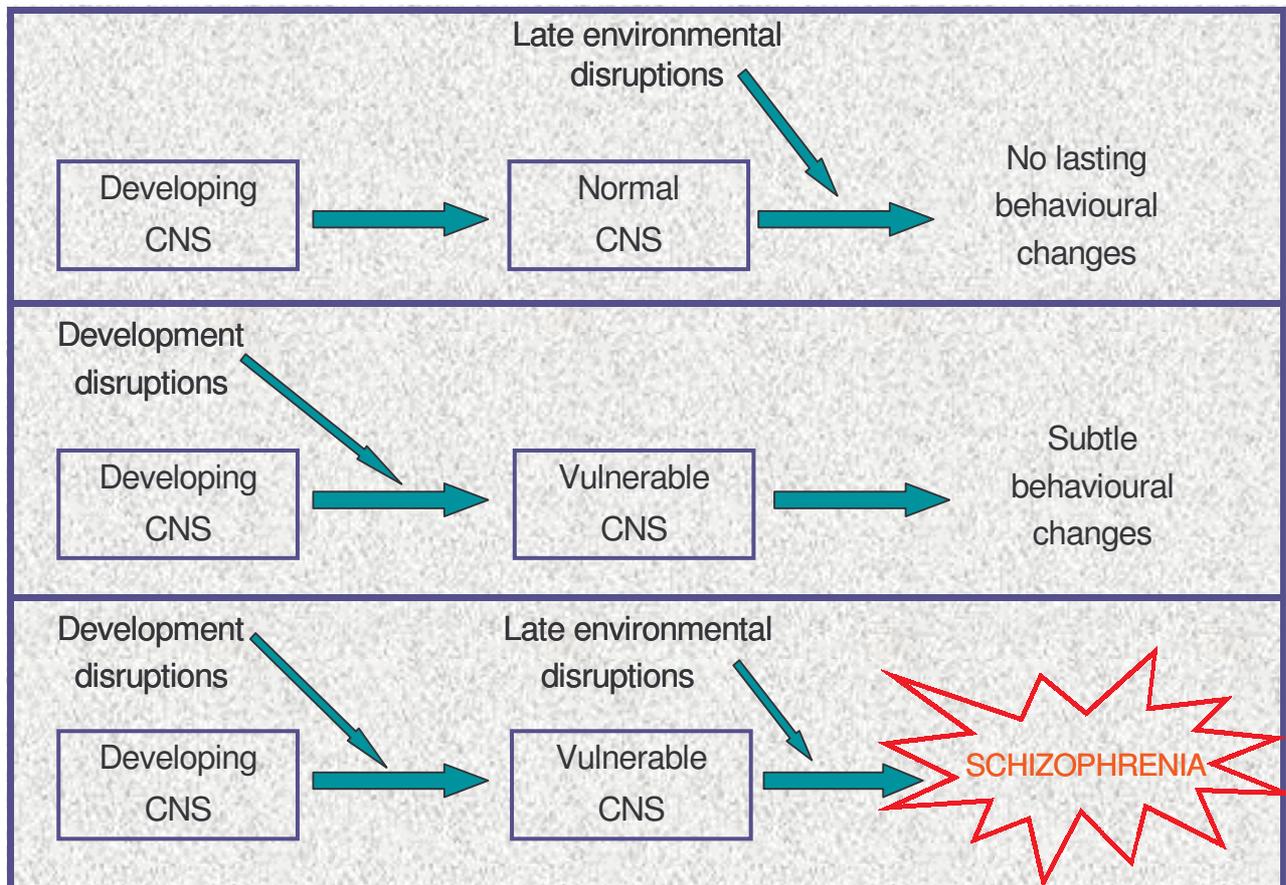


Fig. 2. Hipótesis sobre la etiología de la esquizofrenia. Interrupciones en el desarrollo prenatal del cerebro por causas genéticas y/o ambientales (primera fase) incrementarían la vulnerabilidad del individuo (predisposición) a subsiguientes factores estresantes ambientales (segunda fase), originando la aparición de la esquizofrenia. Ni los cambios prenatales (panel del medio) ni los factores ambientales tardíos (panel superior) por si solos son capaces de inducir la enfermedad (Van den Buuse et al., 2003).

Estudios genéticos de mellizos, adopciones y familias con algún paciente establecen claramente el riesgo creciente de esquizofrenia de estos casos respecto a la población normal (Tabla 2), aunque no se transmite mediante patrones de herencia Mendeliana. Por otro lado, ya que los monocigóticos comparten el 100% de la dotación genética, se concluye que los factores ambientales están obviamente implicados.

Tabla 2. Relación de parentesco e incidencia de la esquizofrenia

Relaciones genéticas	Incidencia
Población general	1%
Hermano esquizofrénico	8%
Un progenitor esquizofrénico	12%
Gemelo dicigótico esquizofrénico	14%
Dos progenitores esquizofrénicos	39%
Gemelo monocigóticos esquizofrénico	47%-89%

Origen: Gottesman & Shields (1982) y la página web de NIH (www.nimnh.nih.gov/research/genetics.htm).

Como resultado de abundantes estudios epidemiológicos, se han podido asociar distintos factores ambientales pre- y post-natales que suponen un riesgo creciente de desarrollar esquizofrenia:

- Infecciones virales neonatales, conocidas como 'efecto estacional', ya que los nacidos en invierno presentan mayor probabilidad de contraerlas. El odds ratio de desarrollar esquizofrenia en neonatales afectados es 5 veces superior que en neonatales sanos (Kirch DG, 1993; Suvisaari et al., 2003).
- Complicaciones obstétricas tales como malnutrición maternal o hipoxia durante la vida fetal en etapas claves para el desarrollo del SNC. Se ha

encontrado una asociación positiva entre este factor y un incremento del volumen ventricular en esquizofrénicos adultos (Verdoux et al., 1997; Dalman et al, 1999).

- Edad paternal avanzada. Una edad paternal superior a los 45 años confiere un odd ratio de 2.8 veces superior de aparición esquizofrenia en la descendencia que una edad paternal inferior (Malaspina et al., 2001; Dalman & Allebeck, 2002).

En consecuencia, los esfuerzos para entender y tratar este desorden se focalizan en tres grandes áreas de investigación:

- Evaluar genes candidatos de conferir susceptibilidad a la esquizofrenia.
- Examinar las anomalías neuroanatómicas de cerebros de pacientes esquizofrénicos.
- Estudiar el mecanismo de acción de los fármacos que alivian los síntomas de la esquizofrenia, a nivel clínico y preclínico, este último objeto principal del presente trabajo.

I.3.- Genes candidatos.

La hipótesis mayoritariamente aceptada sugiere que no existe un único gen causal, sino que se trata de un desorden poligénico en el que se hallan implicados varios genes con un efecto menor co-actuando o interactuando entre sí en combinación con los distintos factores ambientales (Dubertret et al., 1998).

Estudios de linkage, linkage-desequilibrio y con anterioridad, debido a la complejidad de la transmisión de los distintos loci, los estudios de asociación genética, han permitido la identificación de un importante número de genes o regiones cromosómicas que pueden contribuir a la susceptibilidad por la esquizofrenia (Tabla 3 y Fig 3).

A pesar del gran número de estudios realizados, los resultados sobre la importancia de cada uno de estos genes en la aparición de la esquizofrenia son a menudo contradictorios. Además de las propias limitaciones metodológicas (potencia de muestra, ausencia de sesgo, estratificaciones poblacionales o emparejamiento con controles correctos), los distintos fenotipos de esquizofrenia y las posibles variaciones genotípicas entre poblaciones han dificultado encontrar asociaciones robustas.

Debido a la implicación de los receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos en la esquizofrenia, se aceleró la investigación de los genes que codifican para los receptores D₂ y 5HT_{2A} principalmente (más información en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink> y <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

Los receptores dopaminérgicos D₂ se codifican en el cromosoma 11q22-23, presentan 7 intrones y 8 exones, una cadena carboxilica terminal corta y el tercer dominio intracelular largo. En base a su secuencia de amino ácidos y a su organización génica forman parte de la familia D₂ (receptores D₂, D₃, D₄). Por 'splicing' se generan dos variantes funcionales del receptor, D_{2L} y D_{2S}, que difieren en la longitud del tercer dominio intracelular. Se han descrito distintos polimorfismos (*Taq IA*, *Taq I B* y *Taq 1 C*) y deleciones que inducen cambios en la funcionalidad del receptor o en su respuesta a los fármacos antipsicóticos respectivamente. Sin embargo, estos polimorfismos se han relacionado mayoritariamente con el abuso de alcohol y en menor medida con la esquizofrenia (Tabla 3) (Itokawa M. et al 1993; Kawanishi et al., 2000; Wong et al, 2000; Rana et al., 2001).

Tabla 3. Resumen de algunos cromosomas, genes y polimorfismos de receptores implicados en la etiología de la esquizofrenia.

Gen/Polimorfismo	Cromosoma	Efecto	Referencia
COMT y Val-COMT polimorfismo	22q11 microdelección, SNPs	Déficits en metabolismo cortical dopamina	Edgan et al., 2001
PRODH2		Déficits sensorimotors	Liu et al, 2002
G72	13q34 (SNPs)	Regulación señal glutaminérgica. Acción sinérgica.	Chumakov et al 2002
DAAO	12q24		
NRG1	8p12-p21	Migración neuronal y plasticidad sináptica	Stefansson et al 2002
DTNBP1	6p22.3	Formación y mantenimiento sinapsis	Straub et al 2002
RGS4	1q21-22 (SNPs)	Regulador negativo de receptores mGlu	Chowdhari et al 2002
DISC-1	1q42	Inducción de psicosis. ¿Función normal?	Sawa & Snyder 2002
T102C polimorfismo	13q14-q21	Codificación receptor 5-HT _{2A} . ¿Función?	Williams et al 1996
-1438G/A plimorfismo		Respuesta a antipsicóticos	Arranz et al., 1998
Bal I polimorfismo	3q13.3	Incremento afinidad por ligandos del D ₃ R	Lundstrom et al 1996
TaqIA polimorfismo	11q22-23	Promotor receptor D ₂ . Predisposición a NMS	Suzukie et al., 2001
141C Ins/Del	Región promot D ₂	Menor n ^o receptores D ₂ menor edad aparición	Himei et al., 2002
Ser/Cys311 polimorf	D ₂ R 3 rd Intraloop domain	Decr. agonist binding	Cravchick et al 1996
Pro310Ser polimorf		Altered rec. coupling Gi	

COMT: Catecol-O-metil transferasa; DISC-1: Disrupted in Schizophrenia; DTNBP1: dysbindin; NMS: Neuroleptic Malignant Syndrome; NRG1: Neuregulin 1; PRODH2: Prolina deshidrogenasa; RGS4: regulador G-prot signalling-4 SNPs: polimorfismos en nucleotidos aislados.

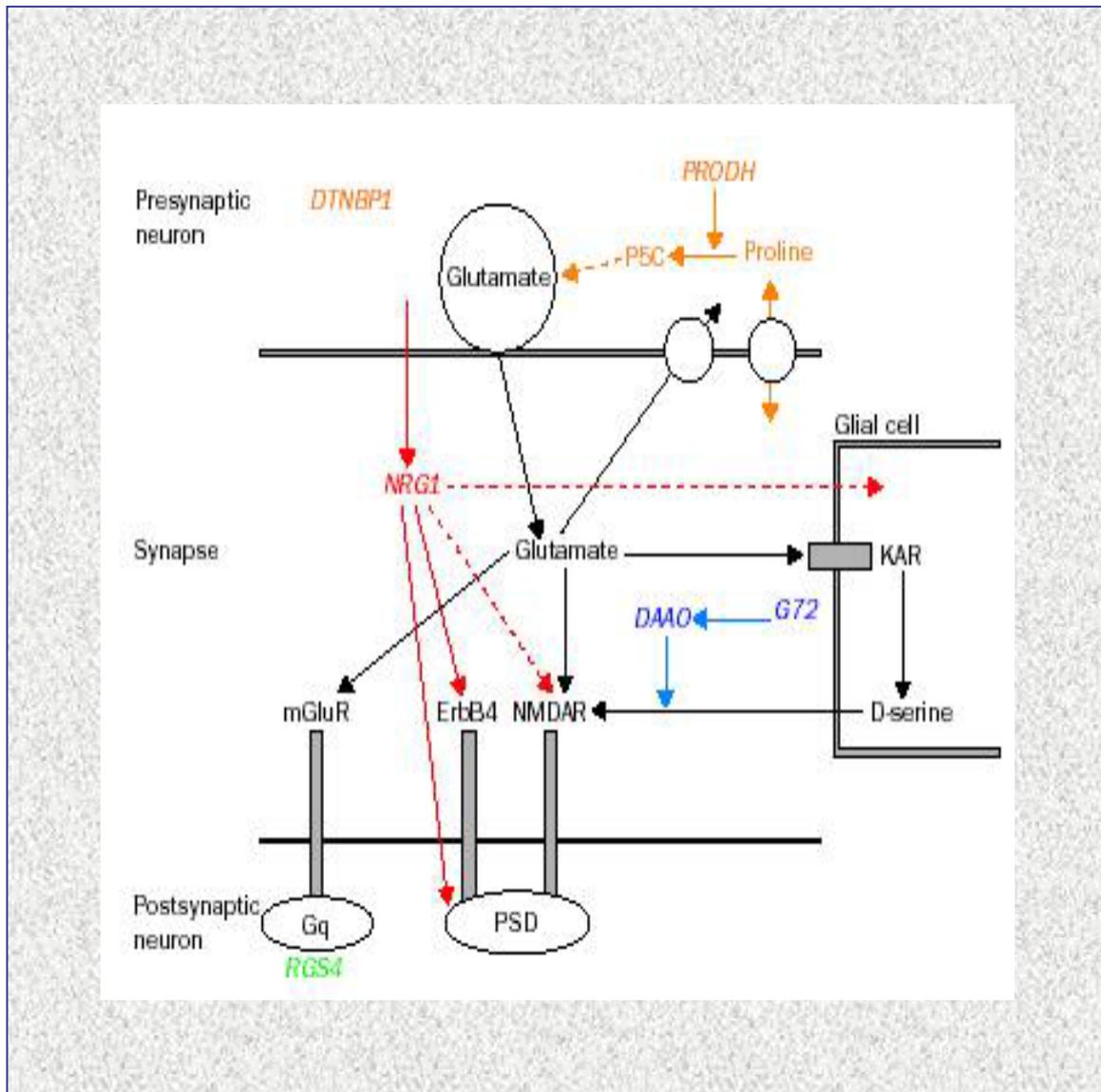


Fig. 3. Esquema teórico de la implicación de los genes susceptibles de inducir esquizofrenia en la plasticidad neuronal en una sinapsis glutamatoérgica. Las sinapsis monoaminérgicas, colinérgicas y GABAérgicas también estarían implicadas. Flechas sólidas: interacciones directas; flechas punteadas: interacciones indirectas; Gq: GTP-binding proteins; KAR: receptor kainato; mGluR: receptor glutamato metabotrópico; NMDAR: receptor NMDA; PSD: densidad proteínas postsinápticas. (Harrison & Owen, Lancet, 2003).

El gen del receptor 5-HT_{2A} se localiza en el cromosoma 13q14-q21. Se caracteriza por tener 2 intrones en la secuencia codificadora, igual que el del receptor 5-HT_{2C} y a diferencia del otro receptor de la familia 5-HT₂, el 5-HT_{2B}, con los que comparte una elevada homología en la secuencia aminoacídica (Barnes & Sharp, 1999). Se han identificado distintas variantes genéticas, siendo la *T102C* la que ha presentado una asociación más fuerte con la esquizofrenia y el *-1438G/A* en la respuesta a los antipsicóticos. Existen muchas otras variantes descritas pero su posible asociación con este desorden o la respuesta a fármacos es menos robusta (Kawanishi et al., 2000).

Más novedosa es la sugerencia que deficiencias en los niveles de la proteína Reelin, implicada en el control de las migraciones neuronales, inducen carencias neuronales en córtex e hipocampo. En cerebros de esquizofrénicos se ha detectado un descenso del 30 al 50% en los niveles de Reelin en ambas áreas, pudiendo tener un papel relevante en disfunciones cognitivas (Fatemi et al. 2000).

La aplicación de nuevas tecnologías disponibles como los microarrays o el estudio de la expresión génica en cerebros de pacientes esquizofrénicos permitirá un avance importante en esta área (Kawanishi et al., 2000; Palfreyman et al., 2002).

I.4.- Substrato neuroanatómico.

En general los desórdenes neuropsiquiátricos se han diagnosticado basándose en cambios en el comportamiento y a algunos déficits neurológicos específicos. La carencia de descriptores a escala anatómica y/o celular dificultó la comprensión de la neurobiología de estos desórdenes. Sin embargo, con las últimas técnicas de imagen, tanto *in vivo* como en cerebros post-mortem, y de novedades en inmunohistoquímica y microarrays, permiten relacionar cambios macroscópicos, celulares y moleculares subyacentes en estos desórdenes.

En los cerebros de pacientes esquizofrénicos, y también en el de pacientes con desórdenes afectivos, se han detectado cambios patomorfológicos en la arquitectura cerebral, tanto globales como en áreas concretas, principalmente en las áreas corticales frontales y temporales y el hipocampo (Lehrmann et al., 2003; Scherk et al, 2003).

A escala macroscópica, estudios en pacientes no medicados y en los primeros brotes psicóticos, describen ligeros decrementos de aproximadamente un 6% del peso total del cerebro, demostrando que no son meros artefactos debidos a tratamiento o dieta, tal como sugerían algunos de los primeros estudios. Meta-análisis recientes confirman que el peso del cerebro se reduce leve pero perceptiblemente en la esquizofrenia y que estos cambios son detectables ya en la adolescencia de los pacientes (Fannon et al., 2000; Harrison et al., 2003; Sporn et al, 2003).

Estos cambios volumétricos se detectan principalmente en las áreas corticales y del hipocampo, que participan en las funciones cognitivas deterioradas en la esquizofrenia. Por un lado se han identificado incrementos en el volumen ventricular, siendo uno de los cambios morfométricos más consistente en los distintos trabajos publicados. Por otro, se ha detectado una disminución del tamaño del área límbicoestriada periventricular, tálamo, hipocampo y cortex temporal superior, circundantes a dichos ventrículos, así como una considerable asimetría entre ambos hemisferios (Heckers & Konradi, 2002; Highley et al., 2003; Gaser et al, 2004; Roth et al, 2004).

Se especula si este decremento volumétrico se debe a una pérdida neuronal o de una disminución del tamaño de las neuronas, lo que encajaría mejor con las alteraciones sinápticas corroboradas en estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales (Harrison PJ,

1999; Harrison et al., 2003). En respuesta a este punto, anomalías morfológicas celulares han sido descritas en neuronas piramidales, interneuronas, glías y oligodendrocitos, tanto en pacientes esquizofrénicos como afectados de desórdenes bipolares y depresión.

Varios estudios confirman un incremento de la densidad de las neuronas piramidales, sin embargo relacionada con descensos en el tamaño del soma y un descenso del número/tamaño de dendritas principalmente en la lámina V y algo menos en la lámina III en la esquizofrenia y los desórdenes bipolares (Pierri et al., 2001; Broadbelt et al., 2002; Chana et al., 2003). Sin embargo, aunque ambas patologías comparten una reducción en la densidad de glías, en los desórdenes bipolares y también en depresión, esta reducción está asociada a una hipertrofia de las mismas, que no se detecta en los pacientes esquizofrénicos, confirmando que se trata de distintas patologías mentales con rasgos morfológicos distintivos propios (Rajkowska et al., 2001; Cotter et al., 2002).

A nivel de los oligodendrocitos, existen numerosos trabajos en los que se describe un descenso tanto en el número como en el tamaño del soma en cerebros de pacientes esquizofrénicos y de otros desórdenes psiquiátricos, corroborados mediante microarrays por un descenso en la expresión de los genes que los expresan (Tkachev et al., 2003). Estos cambios en la mielinización coinciden en la adolescencia (mielinización final de neuronas en córtex prefrontal) y pérdidas relacionadas con la edad, coincidiendo con los picos de edad descritos en la aparición de esta enfermedad. Estos defectos en la mielinización se han descrito a nivel macroscópico como una disminución de la sustancia blanca respecto a la sustancia gris en cerebros de estos pacientes adolescentes y de edad (Barzokis et al., 2003; Davis et al., 2003).

Estas anomalías citoarquitectónicas vienen acompañadas de cambios en la arquitectura molecular del cerebro de pacientes esquizofrénicos y relacionados con los sistemas de neurotransmisores (dopaminérgicos, serotoninérgicos, glutamatérgicos, etc) implicados en la patofisiología de esta enfermedad. Estos cambios sucederían en el ámbito de proteínas presinápticas implicadas en el transporte axonal y liberación de los neurotransmisores, relacionados con la pérdida de proteínas asociadas al citoesqueleto como 'microtubule-associated protein-2' (MAP2), 'sinophilin' proteína asociada a las espinas dendríticas y también de la proteína asociada a vesículas sinápticas 'synaptophysin' en áreas corticales claves en la esquizofrenia (Dean B, 2000; Lidow et al., 2001; Mukaetova-Ladinska et al., 2002). O a nivel del cerebelo, donde se ha descrito un incremento de la

proteína axonal quimiorrepelente 'semaphorin 3A' en pacientes esquizofrénicos (Eastwood et al, 2003). O en las 'receptor-interacting proteins' de distintos receptores, como la regulación al alza de las proteínas 'calcyon' asociadas al receptor dopaminérgico D₁ o la proteína 'filamin A' asociada al receptor dopaminérgico D₂. (Koh et al., 2003). Es un área de estudio bastante novedosa en la que debe profundizarse y replicarse resultados antes de poder discutir la importancia de cada uno de estos cambios.

Existen numerosos trabajos sobre el efecto del tratamiento con antipsicóticos sobre estos cambios volumétricos, macroscópicos y ultraestructurales y su relación con la sintomatología esquizofrénica, en los que se concluye que la interacción entre la estructura cerebral y la respuesta al tratamiento varía según el fármaco utilizado (Lidow et al., 2001; Savas et al, 2002; Arango et al., 2003), aunque no es objetivo de este trabajo profundizar en ello.

En consecuencia, todos estos cambios morfológicos generan un grave problema de desconexión sináptica en la red neuronal, con la consiguiente disfuncionalidad detectada en la esquizofrenia (Scherk et al, 2003). Con todo, estas anormalidades citoarquitectónicas junto con la ausencia de gliosis típica de los procesos neurodegenerativos apoyarían la hipótesis del origen relacionado con lesiones/defectos durante el desarrollo neuronal de la esquizofrenia (Harrison, 1999; Sawa & Snyder, 2002).

I.5.- Mecanismo de acción de los fármacos. Terapéutica.

En los años 50, la observación empírica de que Clorpromazina, un fármaco que bloqueaba los receptores dopaminérgicos D₂, era efectivo frente a los síntomas psicóticos, junto con la observación que la administración crónica de amfetamina u otros activadores de la transmisión dopaminérgica inducían estados psicóticos, muy parecidos a la esquizofrenia, impulsó el desarrollo de compuestos bloqueantes de la transmisión dopaminérgica a nivel de los receptores D₂ como agentes terapéuticos para este desorden, a los que se denominó **neurolépticos** (Van Rossum 1966; Seeman et al. 1976).

Así, la '**Hipótesis Hiperdopaminérgica**' (Fig 4) sugiere que la excesiva producción de dopamina en las vías mesolímbicas, tanto a nivel presináptico como por un incremento del número de receptores D₂ o su activación postsináptica, es responsable de la aparición de síntomas positivos. Por otro lado, un tono de transmisión reducida en la vía mesocortical podría explicar los síntomas negativos y déficits cognitivos observados. Este fenómeno, denominado **hipofrontalidad**, ha sido confirmado por estudios metabólicos y neuropatológicos del cortex prefrontal en pacientes y sujetos control.

Sin embargo, este tipo de fármacos neurolépticos únicamente paliaba los síntomas positivos, demostrando poca o nula eficacia frente a los síntomas negativos y déficits cognitivos. Es más, el tratamiento con estos agentes inducía efectos secundarios graves y su uso quedaba limitado por la aparición de efectos motores - los síntomas extrapiramidales (EPS)- y neuroendocrinos - la hiperprolactinemia- adversos, debidos al bloqueo de los receptores D₂ en las vías nigroestriada y tuberoinfundibular respectivamente (Carlsson, 1988; Seeman 2002).

La incidencia de EPS durante el tratamiento con antipsicóticos como Haloperidol, agente bloqueante D₂, era muy elevada. Un porcentajes del 50 al 75% de los pacientes tratados presentaban sintomatología de aparición rápida reversible (disonía aguda, acatisia y parkinsonismo) y un 20% disquinesia tardía no reversible (Casey DE, 1997). Tradicionalmente se postuló que la aparición de EPS era insoluble de la actividad antipsicótica (Fardé et al., 1989).

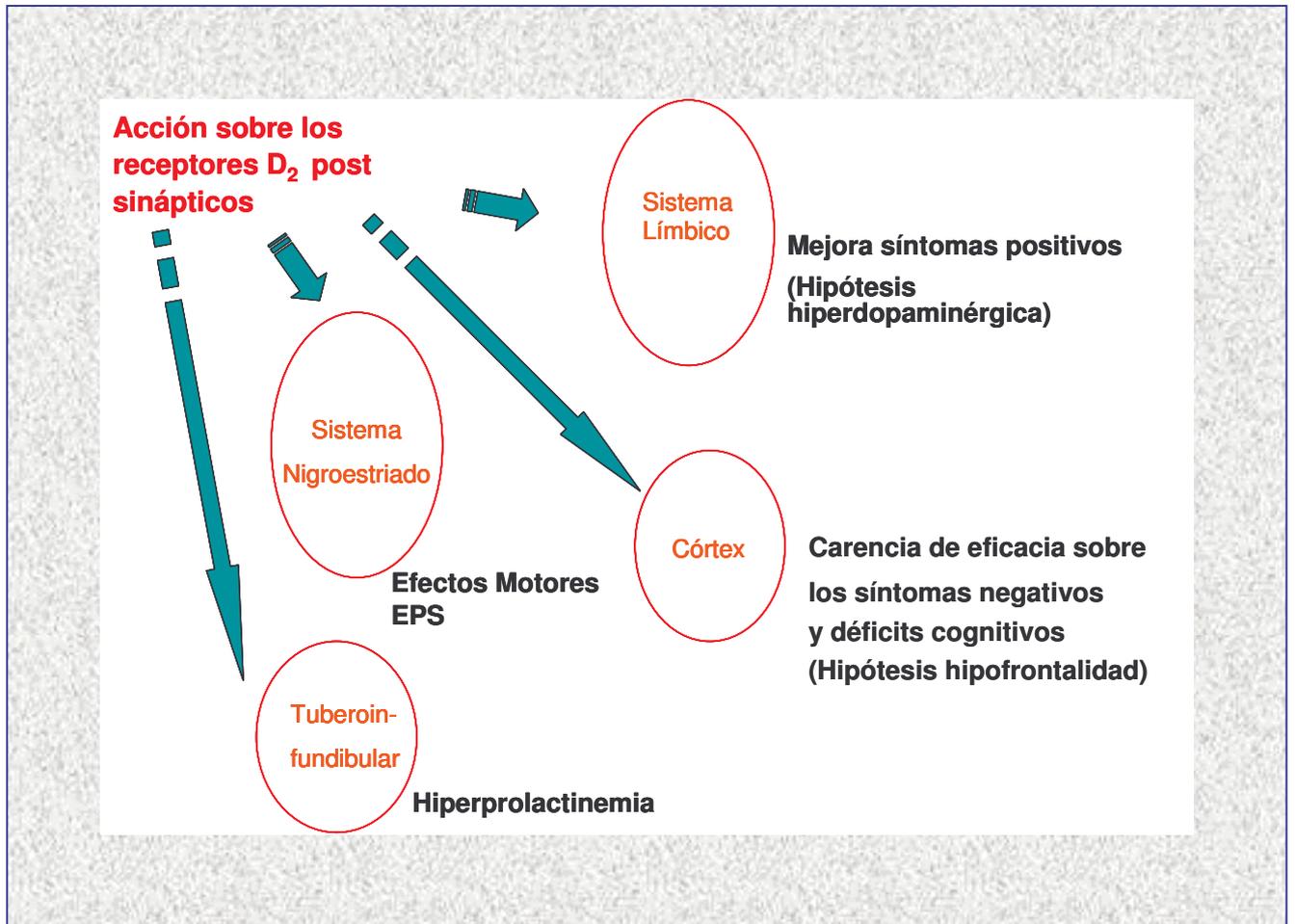


Fig 4. Esquema del efecto que induciría un agente antagonista D₂ sobre los receptores postsinápticos en las cuatro zonas mayoritarias que inervan las vías dopaminérgicas.

Estudios *postmortem* en cerebros de pacientes esquizofrénicos así como estudios *in vivo* de neuroimagen (PET o SPECT), demostraron variaciones en la expresión de receptores dopaminérgicos o en su ocupación por ligandos, así como el incremento de liberación de dopamina por estimulación dopaminérgica (Laurelle et al., 1996). Sin embargo, muchos de estos resultados no fueron replicados o fueron confusos debido a la administración crónica de antipsicóticos de los pacientes utilizados. Todo ello sugería que la hiperdopaminergia no era la causa única de la esquizofrenia.

Posteriormente, el uso de Ritanserina y la introducción de Clozapina modificaron esta apreciación.

Ritanserina, un compuesto selectivo de los receptores serotoninérgicos 5HT_{2A}, administrado a pacientes tratados con Haloperidol disminuía la incidencia de EPS.

Clozapina, fármaco que muestra mayor afinidad por los receptores 5HT_{2A} que D₂, demostraba eficacia en la mejora de los síntomas negativos y una menor aparición de EPS (Bersani et al., 1986). No obstante, Clozapina presenta severos efectos adversos, principalmente agranulocitosis, convulsiones e inclusive miocarditis. Por ello su uso clínico está restringido a pacientes no respondedores a otros agentes (Grohmann et al., 1989; Baldessarini & Frakenburg, 1991; Killian et al., 1999). Pero generó un interés en la investigación y desarrollo de nuevos compuestos puros 5HT_{2A} o con efecto mixto 5HT_{2A} y D₂, surgiendo la clasificación de los antipsicóticos en 'típicos' versus 'atípicos' según el ratio 5HT_{2A}/D₂ que presentaban (Meltzer et al., 1989) (Fig 5).

Risperidona, Olanzapina, Aripiprazole y nuevos compuestos en investigación (Iloperidona, NRA0045) constituyen la respuesta al desafío de encontrar fármacos tan eficaces pero más seguros que Clozapina. En la Tabla 4 se detallan antipsicóticos típicos y atípicos actualmente comercializados.

Tabla 4. Fármacos comercializados para el tratamiento de la esquizofrenia según el mecanismo de acción.

Compuestos comercializados para el tratamiento de la esquizofrenia			
Compuesto	Marca	Compañía	Lanzamiento
Antipsicóticos Típicos			
Lithium carbonate	Lithobid	Solvay	1939 (U.S.)
Chlorpromazine	Thorazine	GlaxoSmithKline	1952
Prochlorperazine maleate	Compazine	GlaxoSmithKline	1956 (U.S.)
Promazine hydrochloride	Sparine	Wyeth	1956 (U.S.)
Levomepromazine	Nozinan	Wyeth	1957
Perphenazine	Trilafon	Schering-Plough	1957
Triflupromazine hydrochloride	Vesprin	Bristol-Myers Squibb	1957 (U.S.)
Thioridazine	Melleril	Novartis	1958
Chlorprothixene	Truxal	Roche	1959
Fluphenazine hydrochloride	Prolixin	Bristol-Myers Squibb	1959 (U.S.)
Haloperidol	Haldol	Janssen	1959
Zuclopenthixol hydrochloride	Clopixol	Lundbeck	1962 (U.K.)
Droperidol	Droleptan	Janssen-Cilag	1963
Periciazine	Neuleptil	Aventis	1964
Tiotixene	Navane	Pfizer	1965
Benperidol	Anquil	Janssen	1966
Flupentixol hydrochloride	Fluxanxol	Lundbeck	1966
Sulpiride	Dolmatil	Fujisawa	1968
Pimozide	Orap	Janssen	1969
Fluspirilene	Imap	Janssen	1970
Cyamemazine	Tercian	Aventis	1972 (France)
Loxapine succinate	Loxapac	Wyeth	1975 (U.S.)
Carpipramine	Prazinil	Pierre Fabre	1977 (France)
Tiapride hydrochloride	Tiapridal	Sanofi-Synthelabo	1980 (France)
Veralipride	Agreal	Sanofi-Synthelabo	1980 (France)
Bromperidol	Impromem	Janssen	1981
Levosulpiride	Levopraid	Abbott	1987 (Italy)
Remoxipride	Roxiam	AstraZeneca	1990 (Denmark)
Mosapramine hydrochloride	Cremin	Mitsubishi Pharma	1991 (Japan)
Nemonapride	Emilace	Yamanouchi	1991 (Japan)
Antipsicóticos Atípicos			
Clozapina	Clozaril	Novartis	1972
Zotepine	Zoleptil	Fujisawa	1982 (Japan)
Amisulpride	Solian	Sanofi-Synthelabo	1986 (France)
Risperidona	Risperdal	Janssen	1993 (Canada)
Olanzapina	Zyprexa	Lilly	1996 (U.S.)
Quetiapine fumarate	Seroquel	AstraZeneca	1997 (U.K.)
Ziprasidone mesilate	Geodon	Pfizer	2000 (Sweden)
Perospirone hydrochloride	Lullan	Sumitomo Pharmaceuticals/ Mitsubishi Pharma	2001 (Japan)
Aripiprazole	Abilify	Otsuka/Bristol-Myers Squibb	2002 (U.S.)

Origen: Prous Science, Integrity database.

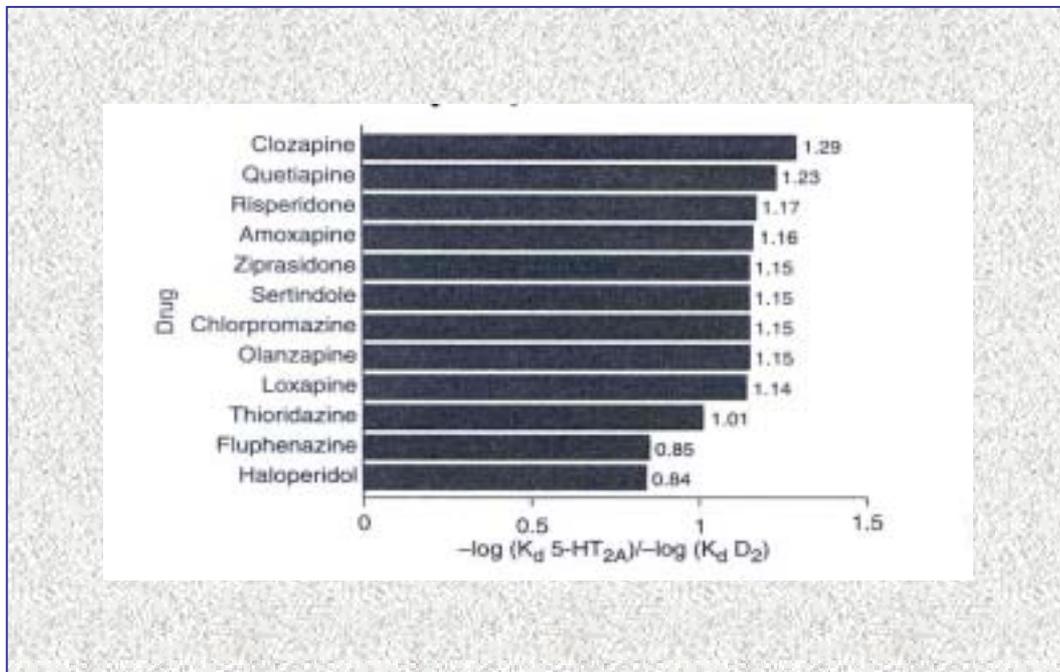


Fig.5. Relación del ratio de atipicidad de algunos de los antipsicóticos típicos y atípicos comercializados, representado como $-\log(K_d \text{ 5-HT}_{2A}) / -\log(kd \text{ D}_2)$, siendo K_d la constante de equilibrio (Richelson, 1999).

Las primeras hipótesis de la relación del sistema serotoninérgico con la esquizofrenia surgieron a principios de los años 50 de la observación que el ácido lisérgico (LSD), compuesto estructuralmente parecido a la serotonina, inducía estados psicóticos alucinógenos.

La evidencia directa de la implicación de los receptores 5HT_{2A} en la esquizofrenia se obtuvo de numerosos estudios *postmortem* y estudios de metabolitos de la serotonina en el fluido cerebroespinal, reforzando la teoría de una disfunción serotoninérgica en estos pacientes. La mayoría de trabajos demostraron un descenso en la transmisión y en el número de receptores de serotonina en el cortex frontal, así como una correlación inversa de la concentración de ácido 5-hidroxi-indol-acético (5HIAA) en fluido cerebroespinal y la prominencia de síntomas negativos (Abi-Dargham et al., 1997).

Una segunda evidencia es anatómica, ya que los núcleos dopaminérgicos A10 y A9, el tálamo, hipotálamo y córtex están ricamente inervados con proyecciones ascendentes serotoninérgicas provenientes de los núcleos Medial y Dorsal de Raphe (B7 y B8 respectivamente) (Fig 6). Además, a nivel neuroquímico, antagonistas 5HT_{2A} previenen actividades inducidas por estimulantes dopaminérgicos (Schmidt et al., 1995).

Sin embargo, no se halló una correlación directa entre la afinidad por los receptores serotoninérgicos y su eficacia clínica per se. Los precursores de serotonina no demostraron eficacia en estudios clínicos en esquizofrenia, mientras que los antagonistas puros, como el MDL100907, a pesar de prometedores resultados preclínicos tampoco demostraron eficacia clínica concluyente siendo retirado en fase III (Gillin et al., 1976; Lipska & Weinberg, 1997; Drugs Fut 1999 24(9) p 1026).

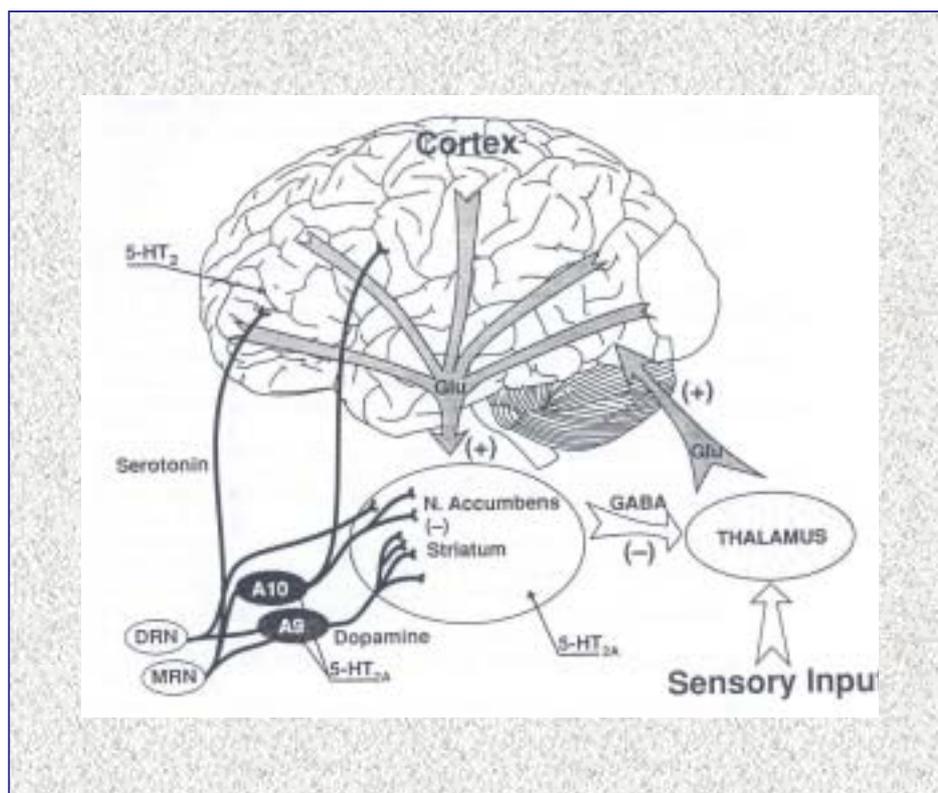


Fig. 6. Representación de las interacciones de los sistemas serotoninérgico y dopaminérgico en el circuito cortico-estriado-talámico. DRN: núcleo dorsal de Raphe; MRN: núcleo medio de Raphe; A9 y A10 núcleos dopaminérgicos (Schmidt et al., 1995).

Actualmente, la teoría que más satisfactoriamente explica el perfil atípico de estos antipsicóticos propone una modulación de la acción de los receptores D₂ al estar ampliamente distribuidos por todo el cerebro. Esta modulación se ejercería mediante un efecto compensador sobre otros sistemas de neurotransmisores no dopaminérgicos, como el serotoninérgico, glutamatoérgico y los receptores α_1 -adrenérgicos, encaminada a bloquear la transmisión dopaminérgica en las áreas límbicas e incrementarla en las corticales, evitando las otras vías (Meltzer et al., 1997; Gioanni et al., 1998; Arnt & Skarsfeldt, 1998; Wadenberg et al., 2001a).

La relevancia de los receptores α_1 -adrenérgicos en la esquizofrenia surgió de la observación de que, pacientes tratados crónicamente con Clozapina, presentaban niveles anormalmente elevados de noradrenalina en el plasma y en el líquido cefalorraquídeo y aumentaban la densidad de receptores α_1 centrales. Por contra, los niveles de noradrenalina elevados no se detectaban en pacientes tratados con antipsicóticos típicos, como Haloperidol o Flufenazina (Cohen & Lipinski, 1986; Pickar et al., 1992; Lieberman et al., 1993).

Estos elevados niveles de noradrenalina en pacientes tratados con Clozapina, fueron correlacionados positivamente con una mejora en la sintomatología positiva y global cuando los pacientes eran evaluados con el método de *Brief Psychiatric Rating Scale* (BPRS). En consecuencia, se postuló que el antagonismo a los receptores α_1 -adrenérgicos podía explicar en parte los beneficios clínicos de Clozapina en el tratamiento de la sintomatología global de la esquizofrenia, a diferencia de los antipsicóticos típicos, con eficacia únicamente en la sintomatología positiva (Baldessarini et al., 1992).

La actividad de los receptores α_1 -adrenérgicos modularía la respuesta de otros sistemas de neurotransmisores. A nivel dopaminérgico, la activación de los receptores α_1 -adrenérgicos inhibe la acción de los receptores D₁ en el córtex prefrontal y modula la acción de los receptores D₂ en el núcleo accumbens (Gioanni et al., 1998; Marcus et al., 2000). También interactúan con el sistema serotoninérgico a nivel de los núcleos dorsales de Raphe y con el sistema glutamatoérgico, ejerciendo una modulación indirecta de los receptores NMDA (Millan et al., 2000). Todas estas interrelaciones podrían estar implicadas en la mejora de la función límbica (disminución de la hiperdopaminergia) y cognitiva de los pacientes esquizofrénicos.

Sin embargo, el antagonismo a los receptores α_1 -adrenérgicos también se ha asociado a importantes efectos secundarios tales como el vértigo, sedación e hipotensión ortostática (Breier et al., 1994; Meltzer et al, 2002).

Con todo, la terapia para la esquizofrenia sigue siendo una asignatura pendiente. Los antipsicóticos típicos únicamente actúan sobre la sintomatología positiva e inducen graves EPS, que deben tratarse con medicación anticolinérgica, que a su vez empeora el aprendizaje y memoria, generando como efecto rebote el empeoramiento de los déficits cognitivos. En cambio los antipsicóticos atípicos inducen mejoras en los déficits negativos y cognitivos, pero sus efectos varían en función de su área preferencial de actuación, condicionada por su distinto perfil multireceptorial (Sharma & Antonova, 2003).

Así, mientras los síntomas positivos pueden controlarse con la mayoría de la medicación existente, los déficits cognitivos y los síntomas negativos, aunque más controlados con la terapéutica actual, siguen respondiendo peor que los positivos. Por otro lado, esta segunda generación de antipsicóticos no carece de efectos adversos tales como sedación, ganancia de peso, diabetes mellitus, hiperprolactinemia, prolongación del QTc o inducción del síndrome neuroléptico maligno (Thaker & Carpenter, 2001; Sawa & Snyder, 2002; Farver, 2003).

1.6.- Compuestos 7-[3-[1-piperidinil]propoxi]cromenonas como antipsicóticos atípicos potenciales. Antecedentes.

Como parte de un programa de investigación focalizado en la búsqueda de estructuras con posible actividad antipsicótica, se partió de la estructura base mostrada en la figura 7.

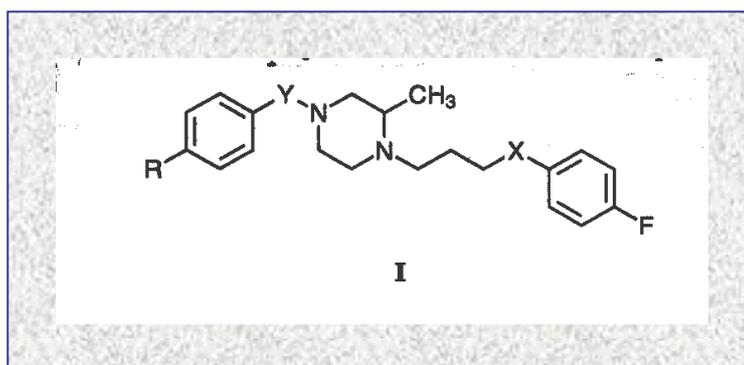


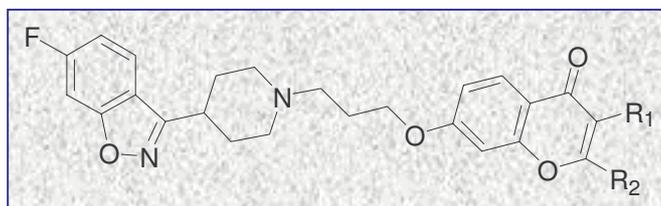
Fig. 7. Representación esquemática de la estructura inicial de las series de compuestos desarrollados como potenciales antipsicóticos. Sustituyentes: X:C=O; Y:CH₂; R: H.

Este compuesto mostró moderada actividad en test predictivos de eficacia y efectos EPS por vía intraperitoneal pero no por vía oral, por lo que se decidió explorar distintas variantes estructurales.

La optimización estructural fue llevada a cabo sobre la base de los perfiles farmacológicos obtenidos en modelos animales con el objetivo de seleccionar compuestos con elevada actividad por vía oral. Este proceso, tal como se describe en Bolós et al (1996), llevó a escoger la familia estructural tipo 7-[3-(1-piperidinil)propoxi]cromenonas como punto de partida para una segunda fase de optimización y selección de candidato.

En la segunda fase, una serie de compuestos de la familia 7-[3-(1-piperidinil)propoxi]cromenonas fueron evaluados mediante ensayos *in vitro* de radioligando frente a distintos receptores centrales e *in vivo*, en paralelo (Tabla 5), permitiendo obtener datos vitales sobre su potencia oral tanto en modelos de eficacia (inhibición del comportamiento de escalada o climbing) como predictivos de EPS (inducción de catalepsia) (Bolós et al., 1998).

Tabla 5. Actividad *in vitro* e *in vivo* (vía oral) de los compuestos de la serie 7-[3-(1-piperidinil)propoxi]cromenonas y compuestos de referencia.



Comp.	Sustituyentes		Afinidad CI ₅₀ (nM)		Modelos conductuales (DE ₅₀ mg/kg)	
	R ₁	R ₂	D ₂	5HT _{2A}	Inhib climbing	Induccion catalepsia
21	H	H	21.8	8.6	1.08 (0.56-1.92)	12.58 (9.40-16.83)
22	CH ₃	H	16.6	11.3	0.40 (0.27-1.92)	2.85 (2.19-3.71)
23	CH ₂ OH	H	17.2	6.2	0.24 (0.22-0.26)	8.48 (7.05-10.18)
24	COOH	H	12.8	0.6	> 10.0	> 50.0
25	H	CH ₂ OH	31.0	7.2	5.88 (2.19-15.81)	> 100.0
26	CHO	H	13.1	2.1	3.32 (2.57-4.29)	15.93 (9.40-26.99)
27	CH ₂ OCH ₃	H	48.1	1.4	0.27 (0.10-0.65)	6.88 (3.72-12.72)
3			211.0	25.3	3.01 (1.31-6.42)	38.21 (32.02-45.69)
4			190.0	32.9	2.02 (0.60-6.80)	13.03 (12.01-14.09)
HAL			13.7	104.0	0.31 (0.14-0.69)	2.00 (1.30-2.61)
CLZ			130.0	13.0	15.40 (10.13-23.36)	> 100.0
RIS			27.4	1.4	0.29 (0.24-0.36)	5.00 (4.10-6.25)

HAL: Haloperidol; CLZ: Clozapina; RIS: Risperidona. (Bolós et al., 1998).

Todos ellos mostraban una elevada afinidad por el receptor 5HT_{2A}, superior a la del receptor D₂, sin embargo diferían en el ratio 5HT_{2A}/D₂ y en su actividad oral. Se detectó un incremento importante en la potencia oral de los compuestos con la sustitución del grupo benzoil por un benzisoxazol, a pesar de que se ha descrito que son grupos bioisómeros (Strupczewski et al., 1982; Reitz et al, 1998).

En segundo lugar, se observó que los derivados C₂ del anillo de las cromenonas (compuesto 25) conferían una menor potencia oral comparado con la sustitución en la posición C₃ del anillo. Los esfuerzos se dirigieron a compuestos C₃-sustituidos, en los que la introducción de metilos (compuesto 22) o grupos metil (compuestos 23 y 27) originaron compuestos potentes, mientras que la oxidación a aldehidos (compuesto 26) o a grupos ácidos (compuesto 24) originaba compuestos poco activos *in vivo*. Debido a que estos últimos sí eran activos *in vitro*, la pérdida de actividad *in vivo* podría atribuirse a una pobre absorción o capacidad de penetración de la barrera hematoencefálica, por lo que estos sustituyentes fueron descartados.

El compuesto 23 (FI-8602, Abaperidona) fue el que presentó una actividad oral más potente en el test del predictivo de eficacia, así como una menor actividad en el test predictivo de EPS, por lo que se decidió escoger como candidato para investigar su potencial como antipsicótico atípico.

II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

Sobre la base de nuestros trabajos previos y a la literatura publicada sobre la etiopatogenia y sintomatología de la esquizofrenia, se decidió seleccionar una nueva entidad química con un perfil de antipsicótico atípico (5HT_{2A}/D₂ > 1) con el valor añadido de un potente antagonismo al receptor α_1 -adrenérgico. Por ello, el desarrollo experimental presentado en este trabajo se planteó de manera que integrase distintos niveles de conocimiento del compuesto:

1. **Evaluar el perfil de afinidad del compuesto por distintos receptores centrales relacionados con la acción antipsicótica.** Se determinará la afinidad por los receptores D₂, 5HT_{2A} y α_1 -adrenérgico, principal objeto de este trabajo, así como de otros receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos, adrenérgicos y glutamatoérgicos. Se definirá el grado de atipicidad del compuesto en comparación a otros compuestos pertenecientes al mismo grupo terapéutico.
2. Igualmente, **se determinará la afinidad del compuesto por otros receptores centrales**, como los muscarínicos, adrenérgicos o histaminérgicos relacionados con posibles efectos secundarios relacionados con el mecanismo de acción.
3. **Determinar el efecto del tratamiento con este compuesto sobre la regulación de los receptores D₂ y 5HT_{2A} en distintas áreas cerebrales del animal de experimentación.** Se estudiará este efecto en áreas cerebrales consideradas clave en la patogenia de la esquizofrenia (córtez y núcleo Accumbens) y relacionadas con la acción antipsicótica de los compuestos, así como en otras áreas relacionadas con la aparición de efectos motores indeseables (estriado) tras tratamiento prolongado.
4. **Determinar el tipo de acción, agonista o antagonista, que ejerce el compuesto sobre distintos receptores, mediante ensayos funcionales.** Se evaluarán actividades *in vivo* de los receptores 5HT_{2A} y α_1 -adrenérgico, relacionados con la actividad antipsicótica, e *in vitro* el tipo de acción que ejerce

el compuesto sobre receptores relacionados con posibles efectos secundarios propios del mecanismo de acción.

5. Confirmar la potencial eficacia del compuesto mediante modelos conductuales en animales de experimentación.

Uno de los criterios a tener en cuenta para la elección de la batería de los modelos animales a utilizar es en relación con el perfil receptorial seleccionado para el compuesto. Por lo tanto se evaluará la actividad *in vivo* del compuesto a nivel de distintos receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos y adrenérgicos.

Un segundo criterio utilizado para definir la elección de estos modelos conductuales, es la capacidad de predicción de la actividad antipsicótica en las distintas disfunciones, hiperdopaminergia e hipoglutamatergia principalmente, que presentan los pacientes esquizofrénicos.

6. Evaluar la posible inducción de efectos secundarios relacionados con el mecanismo de acción del compuesto.

De manera equivalente a lo expuesto en el punto anterior, se utilizarán modelos animales relacionados con el perfil receptorial que se ha asociado a efectos secundarios en este grupo terapéutico, así como modelos animales considerados predictivos de efectos extrapiramidales y motores, neuroendocrinos y cardiovasculares en pacientes esquizofrénicos.

En consecuencia, el objetivo de este trabajo es investigar, desde los distintos niveles de aproximación científica planteados, el potencial de eficacia y efectos secundarios de un nuevo agente farmacológico para el tratamiento de la esquizofrenia, Abaperidona (FI-8602, 7-[3-[4-(6-Fluoro-1,2-benzisoxazol-3-il)piperidin-1-il]propoxi]-3-(hidroximetil)-4*H*-cromen-4-ona HCl) (Fig. 8).

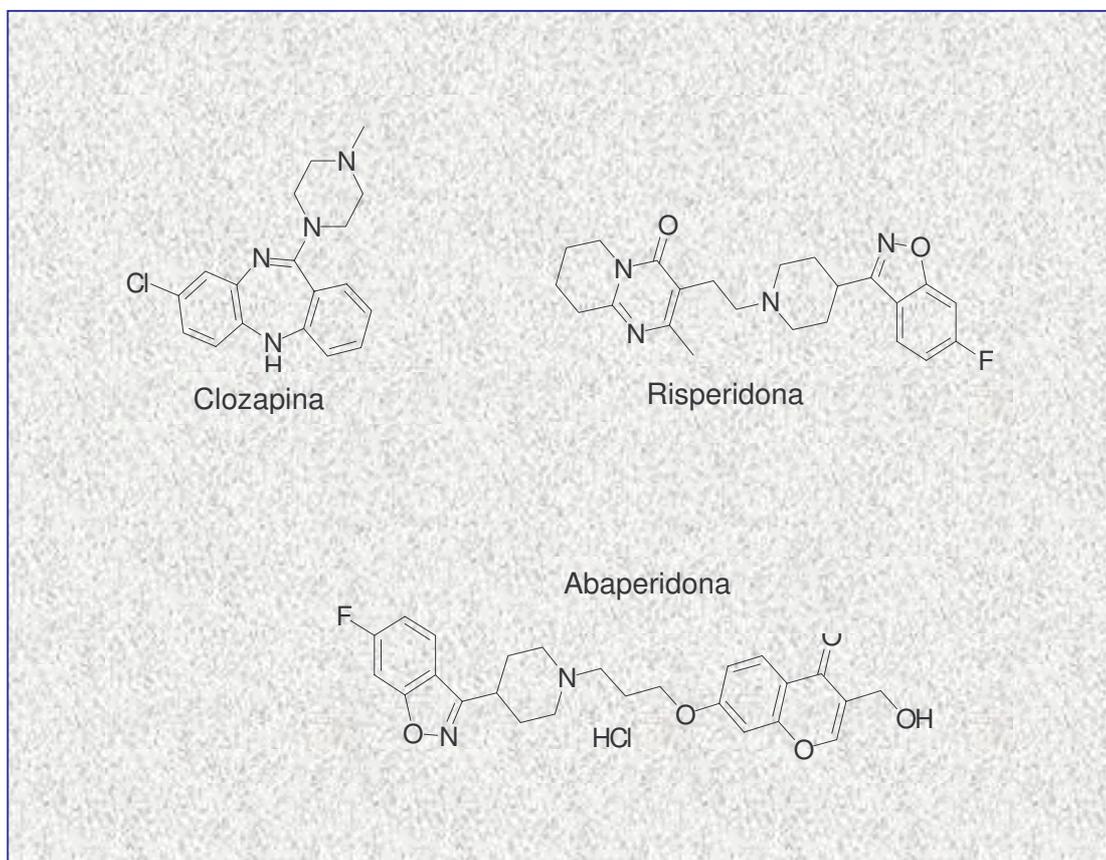


Fig. 8. Representación de la fórmula química de Abaperidona y otros antipsicóticos atípicos.

Finalmente, discutir la información obtenida de los ensayos *in vitro*, funcionales y principalmente de los modelos conductuales *in vivo* utilizados, para construir una hipótesis coherente del posible mecanismo de acción de Abaperidona, contrastándola con otros agentes farmacológicos del mismo grupo terapéutico, incidiendo en su posible relevancia clínica frente a la sintomatología positiva, negativa y cognitiva de la esquizofrenia.

III.- Materiales y Métodos

III.- Materiales y métodos

III.1- Animales.

Las especies y cepa de los animales de experimentación utilizados para esta investigación se detallan a continuación:

- Ratas macho Sprague-Dawley OFA de 200-300 g de peso en el momento del experimento.
- Cobayos macho Dunkin Hartley de 350-400 g de peso en el momento del experimento.
- Ratones macho Swiss OF1 de 22-26 g de peso en el momento del experimento.

La procedencia de todos ellos fue Charles-River (Francia), calidad SPF (specific pathogen free). En los casos en que se utilizó una cepa distinta a las mencionadas, se indica al describir el ensayo correspondiente.

Desde su llegada hasta el momento de su utilización, los animales se estabularon en ambiente convencional con temperatura y humedad controlada (20-22°C y 40-60% respectivamente), ciclo de luz/oscuridad de 12 h (7:00 am-7:00 pm), y acceso a comida (pienso estándar UAR A-04) y agua 'ad libitum'. Se agruparon en cubetas de Macrolon® de 1000-cc en cantidad de 4-5 las ratas, 10-15 los ratones y 2-3 los cobayos. El periodo de cuarentena fue mínimo de 5 días para todas las especies.

Antes de los ensayos, los animales se colocaron en jaulas individuales y se trasladaron al lugar de experimentación, dejando como mínimo 1 hora de aclimatación al nuevo ambiente.

Todos los procedimientos utilizados están admitidos por la directriz OECD (Organization for Economic Co-operation and Development)-Council Directive, Anexo II 86/609/EEC, de la Comunidad Europea y aceptados por el 'Departament de Agricultura, Ramaderia i Pesca' (DARP) de la Generalitat de Catalunya.

III.2- Compuestos y soluciones.

Se detallan estratificados por tipos de ensayo: *in vitro*, funcionales y modelos conductuales.

Ensayos *in vitro* de radioligando:

Compuestos: Abaperidona·HCl (Dpto Química Médica – Grupo Ferrer), Risperidona (Janssen Research Foundation), Clozapina (RBI) y Haloperidol (Sigma Aldrich). Los radioligandos utilizados, detallados en las tablas 7 y 8, se obtuvieron indistintamente de Amersham Pharmacia o American Radiolabeled Chemicals.

Soluciones: los compuestos se diluyeron en una solución de ácido acético (1:100, v/v) hasta alcanzar una concentración final de 0.4 mM. Esta solución se usó para preparar las siguientes concentraciones por dilución con solución tamponada, hasta alcanzar distintas concentraciones finales entre 10^{-5} a 10^{-11} M.

Ensayos funcionales *in vitro*:

Compuestos: Abaperidona·HCl (Dpto Química Médica – Grupo Ferrer), Risperidona (Dpto Química Médica – Grupo Ferrer), Clozapina (RBI) y Haloperidol (Sigma Aldrich). Histamina HCl (Merk), mepiramina maleato (RBI), clonidina HCl (RBI) y yohimbina (Sigma-Aldrich).

Soluciones: para el estudio del antagonismo al receptor histaminérgico H₁, los compuestos se prepararon en soluciones acuosas concentradas de 1.25×10^{-3} M de la que se realizaron las diluciones del estudio de concentraciones entre 10^{-10} hasta 10^{-7} M. Para el estudio del antagonismo al receptor α_2 -adrenérgico, los compuestos se prepararon en soluciones acuosas de entre 10^{-5} a 10^{-8} M. La clonidina se preparó en concentraciones de 1 nM a 10 μ M.

Ensayos funcionales *in vivo*:

Compuestos: Abaperidona·HCl (Dpto Química Médica – Grupo Ferrer), Risperidona (Dpto Química Médica – Grupo Ferrer), Clozapina (RBI) y Haloperidol (Sigma Aldrich), Prazosina (Sigma-Aldrich), Metoxamina (RBI), α -Metil-5-Hidroxitriptamina maleato (α -ME 5HT) (RBI) y Ketanserina tartrato (RBI).

Soluciones: Los compuestos se diluyeron en solución acuosa. Se usaron rangos de dosis farmacológicamente equipotentes. El volumen de administración fue de 0.1 mL/100 mg de peso corporal del animal.

Modelos conductuales

Compuestos: Abaperidona·HCl (Dpto Química Médica – Grupo Ferrer), Risperidona (Dpto Química Médica – Grupo Ferrer), Clozapina (Leponex®-Sandoz), Olanzapina (Impex Química) y Haloperidol (gotas Almirall-Prodesfarma). El DOI [1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano] y la dizocilpina maleato (MK801) se obtuvieron de RBI. El mCPP [1-(3-clorofenil)piperazina], apomorfina HCl, p-cloro-anfetamina HCl, d-anfetamina sulfato, (±)-SKF 38393 HCl, (-)-fisostigmina sulfato, noradrenalina HCl y prazosina se obtuvieron de Sigma Aldrich.

Soluciones: Los compuestos se prepararon en una suspensión acuosa en agar al 0.25% o soluciones en suero fisiológico al 0.9% dependiendo de su solubilidad. Se usaron rangos de dosis farmacológicamente equipotentes. El volumen de administración fue de 1 mL/100 g de peso corporal del animal en todos ellos.

III.3.- Ensayos *in vitro*.

III.3.1.- Ensayos de radioligando

Receptores animales. Todos los receptores fueron obtenidos de cerebros de animales de experimentación, con la excepción de los 5-HT₆ que fueron receptores recombinantes expresados en células HEK-293 obtenidos de PACKARD/RBI.

Los animales fueron sacrificados por decapitación, diseccionándose el cerebro rápidamente y congelándose en nitrógeno líquido a -80° C. La preparación de la membranas de los distintos tejidos se realizó siguiendo las condiciones experimentales descritas en la tabla 6.

Receptores humanos. Las líneas celulares expresando receptores humanos clonados se adquirieron en PACKARD/RBI. Las membranas se recibieron en viales congelados que contenían cantidades definidas del receptor especificado. El día del experimento, los viales fueron descongelados y usados una única vez.

Ensayos. Para definir la concentración de radioligando a usar en los ensayos de competición, previamente se realizaron experimentos de saturación. Se incubaron concentraciones crecientes de radioligando con las membranas a fin de calcular la afinidad del radioligando, K_D , y la concentración máxima de receptores en el tejido, B_{max} . En el caso de los receptores humanos, la concentración de radioligando a usar fue indicada por el proveedor de los mismos, así como los valores de K_D y B_{max} correspondientes.

Los ensayos de competición se realizaron a distintas concentraciones (8-12) de compuesto, por duplicado y a una concentración fija de radioligando. Las condiciones experimentales para los ensayos con receptores animales se definen en la tabla 7 y con receptores humanos en la tabla 8 respectivamente.

Las incubaciones se realizaron en un baño de agua con agitación longitudinal y las reacciones se pararon por filtración rápida utilizando filtros de fibra de vidrio (previamente tratados con detergente a fin de reducir la unión inespecífica al filtro) mediante un 'harvester' Brandel (modelo M-48R). Después del primer filtrado, los filtros fueron aclarados tres veces con tampón frío para asegurar que únicamente quedaba retenido el radioligando unido a membrana.

Los filtros se colocaron en viales de centelleo y se dejaron secar durante la noche. Al día siguiente se añadió líquido de centelleo (Biogreen 3, Scharlau). La radioactividad de los filtros se contabilizó (dpm), mediante un contador de centelleo líquido para ligandos tritiados (PACKARD Tricarb 1900TR).

El porcentaje de unión específica para cada concentración de compuesto se calculó restando a cada valor individual (media del duplicado) el valor de la unión inespecífica y se expresó como porcentaje total de unión específica (100%).

Se generaron las gráficas semilogarítmicas de porcentaje de unión específica a las distintas concentraciones de compuesto y se calcularon las CI₅₀ (concentración del compuesto que causa un 50% de inhibición de la unión específica del radioligando) mediante una regresión lineal, considerando la porción lineal de la curva.

Se derivaron las K_i correspondientes mediante la ecuación de Cheng y Prusoff (Cheng & Prusoff, 1973) para cada experimento. Los experimentos fueron realizados de 1 a 4 veces, por lo que se calcularon la media y el error estándar de los valores K_i obtenidos.

Tabla 6. Obtención de tejidos para estudios de afinidad a radioligando

	RATA		COBAYO		
	CORTEX/ESTRIADO	CEREBRO	HIPOCAMPO	CORTEX	CEREBELO
Homogenización tejidos	700 rpm/10 veces/4°C Sucrose 0.32 M (1/10) (w/v)	600 rpm/10 veces/4°C Sucrose-Tris HCl, pH 8.5 (1/10) (w/v)	700 rpm/10 veces/4°C Hepes-Tris 50mM, pH 7.4 (1/15) (w/v)	600 rpm/10 veces/4°C Sucrose 0.32 M (1/10) (w/v)	700 rpm/10 veces/4°C Hepes-Tris 20mM, pH 7.25 (1/20) (w/v)
1ª Centrifugación	1000 g, 10 minutos, 4°C recoger SN	1000 g, 10 minutos, 4°C recoger SN	48000 g, 10 minutos, 4°C retirar SN	1000 g, 10 minutos, 4°C recoger SN	1000 g, 10 minutos, 4°C recoger SN
2ª Centrifugación	40000 g, 20 minutos, 4°C retirar SN	40000 g, 20 minutos, 4°C retirar SN	—	40000 g, 20 minutos, 4°C retirar SN	50000 g, 20 minutos, 4°C retirar SN
Resuspension Pellet	Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 (1:50) (w/v)	Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 (1:50) (w/v)	Hepes-Tris 50mM, pH 7.4 Final concentración 50mg/ml	Tris-EDTA, pH 7.4 (1:50) (w/v)	Hepes-Tris 20mM, pH 7.25 (1:20) (w/v)
3ª Centrifugación	40000 g, 20 minutos, 4°C retirar SN	40000 g, 20 minutos, 4°C retirar SN	—	40000 g, 20 minutos, 4°C retirar SN	40000 g, 20 minutos, 4°C retirar SN
Resuspension Pellet Final	Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 (1:10) (w/v)	Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 (1:10) (w/v)	—	Tris-EDTA, pH 7.4 (1:10) (w/v)	Hepes-Tris 20mM, pH 7.25 (1:10) (w/v)

SN:s sobrenadante

Tris-EDTA, pH 7.4 : (Tris 50mM, Na₂EDTA 0.5mM, MgSO₄ 10mM, CaCl₂ 2mM, Vit. C 0.1%) + Pargilina 0.01mM (1/1000, v / v)
 Sucrose-Tris HCl, pH 8.5 : Sucrose 0.32M, Tris-HCl 50mM pH 8.5 (1/8, v / v)

Tabla 7. Condiciones del ensayo de competición en receptores procedentes de animales de experimentación

	D ₁	D ₂	5HT _{1A}	5HT _{2c} (1)	5HT _{2A}	5HT ₃	5HT ₄	5HT ₆	5HT ₇ (2)
Ligando marcado (³H) concentración (nM), (K_d, nM)	SCH-23390 0.3, (0.26)	Metilpiperon e 0.2, (0.51)	8-OH-DPAT 1, (3)	Mesulergina 1, (7.96)	Ketanserina 0.5, (1.32)	BRL-43694 0.5, (0.46)	GR113808 0.1, (0.23)	LSD 5, (4.5)	5-CT 0.5, (2.27)
Ligando inespecífico (µM)	Apomorfin 10	Haloperidol 6	Buspirona 200	Mianserina 200	Mianserina 5	MDL-72222 10	5-HT 30	5-HT 100	5-HT 1
Estandar (0.4mM)	Haloperidol	Haloperidol	8-OH-DPAT	Mianserina	Mianserina	MDL-72222	SDZ-205-557	Methiothepin	5-CT
Tejido/ Línea celular	Estriado Rata	Estriado Rata	Córtex Rata	Córtex Rata	Córtex Rata	Córtex Rata	Hipocampo Cobayo	(HEK-293) Rata Recomb.	Córtex Cobayo
Volumen (µl)	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Temperatura Incubación (°C)	35	35	35	35	35	25	37	37	21-23
Tiempo incubación (min.)	30	30	30	30	30	30	30	60	120
PH Tampón HEPES 50 mM						7,5	7,4		
pH Tampón Tris-HCl 50 mM	7,4	7,4	7,4	7,2	7,4			7,4	7,4
Soluciones Sales	A	B	C					D	E
Detergente	GF/B PEI	GF/B Brij-35	GF/B Brij-35	GF/B Brij-35	GF/B Brij-35	GF/B PEI	GF/B PEI	GF/C PEI	GF/B PEI
Referencias	(Billard W et al., 1984)	(De Vries DU et al., 1985)	(Hoyer D et al., 1985)	(Hoyer D et al., 1985) (Peroutka S.J., 1986)	(Leysen JE et al., 1982)	(Pratt GD et al., 1989)	(Grossman CJ et al., 1993)	(Ruat M et al., 1993)	(To ZP et al., 1995)

Solucion A: NaCl 120mM, KCl 5mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM.
 Solucion B: (NaCl 120mM, KCl 5mM, KCl 5mM, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 1mM, Vitc C 0,1%)+ Pargyline 0,01mM.
 Solucion C: (CaCl₂ 4mM, Vitc C 0,1%)+ Pargyline 0,01mM.
 Solucion D: MgCl₂ 10mM, EDTA 0,5mM.
 Solucion E: (MgSO₄ 10 mM, CaCl₂ 2mM, EDTA 0,5mM, Vitc C 0,1%)+ Pargyline 0,01mM.
 (1) Isoprenalina se uso para bloquear los β-receptores y el 8-OH-DPAT los receptores 5-HT_{1A}.
 (2) PAPP se uso para bloquear los receptores 5-HT_{7D} y Pindolol los receptores 5-HT_{1A}.
 PEI: Polyethylenimine

Tabla 7. Continuación

	SIGMA	BETA	α_1	α_2	MUSCARINICO	H ₁
Ligando marcado (³ H) concentración (nM), (K _d , nM)	3-PPP 2, (7.83)	DHA 1, (0.85)	Prazosina 2, (1.18)	Clonidina 6, (6.51)	QNB 0.3, (0.09)	Pyrilamina 1, (0.69)
Ligando inespecífico (μ M)	3-PPP 300	Isoprenalina 200	WB-4101 600	NA-Bitartrate 800	Atropina 1	Tripolidina 1
Estandar (0.4mM)	Haloperidol	Isoprenalina	WB-4101	Clonidina	Atropina	Tripolidina
Tejido/ línea celular	Cerebro Cobayo	Córtex Rata	Córtex Rata	Córtex Rata	Córtex Rata	Cerebelo Cobayo
Volumen (μ l)	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Temperatura Incubacion (°C)	25	35	35	35	25	25
Tiempo incubacion (min.)	90	30	30	30	60	60
PH Tampón HEPES 50 mM						7,25
pH Tampón Tris-HCl 50 mM	8,5	7,8	7,4	7,4	7,7	
Detergente	GF/B PEI	GF/B PEI	GF/B Brij-35	GF/B PEI	GF/B PEI	GF/B PEI
Referencias	(Largent BL et al., 1986)	(De Paermemter F et al., 1989)	(Timmermans PB et al., 1981)	(Greenberg DA et al., 1976)	(Yamamura HI et al., 1976) (Luthin GR et al., 1984)	(Traiffort E et al., 1994) (Mizuguchi H et al., 1978) (Dini S et al., 1991)

Tabla 8. Condiciones de ensayos de competición en receptores clonados humanos

	D ₁	D ₂ (short)	D ₃	D _{4.2}	5HT _{1A}	5HT ₇	M ₁	M ₂
Ligando marcado (³ H) concentración (nM), (K _d , nM)	SCH-23390 1.6, (1.3)	Spiperone 0.2, (0.32)	Spiperone 1, (*)	Spiperone 0.5, (0.36)	8-OH-DPAT 1.5, (1.5)	LSD 5.5, (5.5)	N-Methyl Scopolamina 1, (0.17)	N-Methyl Scopolamina 0.3, (0.21)
Ligando inespecífico (μM)	(+)Butaclamol 1	Haloperidol 10	S(-)-Eticlopride 10	Haloperidol 1	Metergolina 10	Methiothepin 10	Atropina 1	Atropina 1
Estandar (0.4mM)	Haloperidol	Haloperidol	S(-)-Eticlopride	Haloperidol	Methiothepin	Methiothepin	4-DAMP methiodide	4-DAMP ethiodide
Tejido/ línea celular	Sf9	Sf9	CCL1.3	CHO	Sf9	CHO	CHO	CHO
Volumen (μl)	540	540	1000	1000	540	540	1000	1000
Temperatura Incubación (°C)	27	27	20	25	4	27	25	25
Tiempo incubación (min.)	90	60	60	60	60	120	60	60
PH Tampón HEPES 50 mM	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,4	7,2	7,4
pH Tampón Tris-HCl 50 mM								
Soluciones Sales	A	B	C	D	E	F	G	H
Detergente	GF/C PEI	GF/C PEI	GF/B PEI	GF/B PEI	GF/C PEI	GF/C PEI	GF/B PEI	934-AH PEI
Referencias	(MacKenzie RG et al., 1993)	(Lahti RA et al., 1993)	(Sokoloff P et al., 1992)	(Lahti RA et al., 1993) (Seeman P et al., 1993) (Van Tol HH et al., 1991)	(Escandon NA et al., 1994) (Charast A et al., 1993)	(Shen Y et al., 1993) (Bard JA et al., 1993)	(Buckley NJ et al., 1989)	(Gurevich VV et al., 1993)

Solucion A : MgCl₂ 5mM, EDTA 5mM, KCl 5mM, CaCl₂ 1.5mM.

Solucion C : NaCl 120mM, KCl 5mM, MgCl₂ 5mM, CaCl₂ 1.5mM, EDTA 5mM.

Solucion E : MgSO₄ 10mM, EDTA 0.5mM, Ascorbic Acid 0.1%.

Solucion G and H: (CHO cells) NaCl 0.15M, KH₂PO₄ 1.5mM, Na₂HPO₄ 2.7mM .

PEI: Polyethylenimina

(*) Kd no disponible

Solucion B : MgCl₂ 10mM, EDTA 1mM.

Solucion D : NaCl 120mM, KCl 5mM, MgCl₂ 5mM, EDTA 1mM.

Solucion F : MgSO₄ 10mM, EDTA 0.5mM.

III.3.2.- Ensayos *ex vivo*

Los animales (n= 10 por grupo de tratamiento) se administraron por vía subcutánea diariamente durante 7 días a la dosis de 6 μ mol/2ml/kg con Abaperidona·HCl, Risperidona, Haloperidol o vehículo (agua destilada con ácido acético, pH=4 ajustado usando hidróxido sódico 2N antes de alcanzar el volumen final con el agua destilada). Esta dosis se escogió en base a trabajos publicados con compuestos pertenecientes al mismo grupo terapéutico (Rupniak et al, 1984; Wilmot & Szczepanik, 1989).

Los animales fueron sacrificados 7 días después de finalizar el tratamiento, a fin de permitir el aclaramiento del compuesto. Los cerebros fueron rápidamente extraídos y colocados en hielo. Se diseccionaron el estriado y el cortex y se colocaron en tampón Tris-HCl 50mM (pH 7.6) en baño de hielo.

Se determinó la unión específica a ³H-Spiperona y ³H-Ketanserina por duplicado, usando distintas concentraciones de ligando y en presencia o ausencia de Haloperidol (6 μ M) y Mianserina (5 μ M) respectivamente para calcular la unión inespecífica.

Se obtuvieron las curvas de saturación y se calcularon el número de sitios de unión (B_{max} ; pmoles/g tejido) y la constante de disociación (K_D ; nM) mediante un análisis de Scatchard. Las diferencias estadísticas entre los grupos tratados y el grupo control se analizaron mediante una t-Student. Se consideró estadísticamente significativo una $p < 0.05$.

III.4. Ensayos funcionales

III.4.1.- Ensayos funcionales *in vitro*. Determinación del antagonismo al receptor H₁ en íleo aislado de cobayo y del antagonismo al receptor α_2 -adrenérgico en vaso deferente de rata estimulado eléctricamente.

Los animales (n= 6-12 por grupo de tratamiento) fueron sacrificados y se diseccionaron el segmento terminal del íleo y el vaso deferente desde el epidídimo hasta la próstata respectivamente. Estos tejidos se colocaron en el baño de órganos (Letica Instr, España) termostatzado a 37°C y en solución fisiológica Tyrode en estudio H₁ y de Krebs en estudio α_2 (Doxey & Roach, 1980).

Las preparaciones se dejaron estabilizar durante aproximadamente 45 minutos. La estimulación eléctrica del vaso deferente se indujo mediante un estimulador Harvard (3 ms, 20V y 0.1Hz de frecuencia y 10 ms de latencia entre estimulaciones).

Se ensayaron los correspondientes agonistas, Histamina en dosis única (0.6 μ M) y Clonidina en concentraciones acumuladas (1 nM a 10 μ M) de volumen fijo de 0.2 ml cada 3 minutos. A continuación se determinó el efecto de distintas concentraciones de los compuestos a ensayar sobre las contracciones inducidas por los agonistas. Las respuestas, en milímetros de contracción, se obtuvieron mediante un transductor isométrico acoplado a un polígrafo LE 4000 (Letica Instr., España). Como controles positivos se utilizaron antagonistas específicos como Mepiramina y Yohimbina respectivamente.

Se calcularon los porcentajes de inhibición de la respuesta del agonista inducida por el antagonista. Por regresión lineal se hallaron las CI₅₀ (concentración de compuesto que inhibe la respuesta contráctil del agonista un 50%) y en el caso de la respuesta al receptor α_2 -adrenérgico el valor de pA₂ (logaritmo negativo de la concentración molar del antagonista competitivo que reduce el efecto de una doble dosis del agonista al de una).

III.4.2.- Ensayos funcionales *in vivo*. Determinación del antagonismo a los receptores 5-HT_{2A} y α_1 en la rata anestesiada y desmedulada

Las ratas (n= 6-12 por grupo de tratamiento) fueron anestesiadas por inyección intraperitoneal de Pentobarbital sódico (60 mg/kg). A continuación se canuló la tráquea (respiración asistida con el Rodent Ventilator, mod. 683, Harvard), la arteria carótida izquierda (monitorización de la presión sanguínea, transductores Statham, SensoNor ref 840 Lectromed) y la vena femoral derecha (administración de los compuestos). La cánula y transductores de presión arterial se cebaron con solución salina heparinizada (100 UI/ml). El animal también se heparinizó a través de la vena femoral con la misma solución de heparina sódica. Se desmeduló a los animales mediante el método de Gillespie et al (1970).

En el estudio del antagonismo a α_1 , además se realizó una vagotomía bilateral y se bloquearon los receptores β -adrenérgicos mediante administración endovenosa de propanolol (1 mg/kg).

Se dejaron estabilizar los registros de los animales aproximadamente 30 min. A continuación se administraron por vía endovenosa los agonistas 5-HT_{2A} y α_1 , α -ME 5-HT (25 μ g/kg) y methoxamine (50 μ g/kg) respectivamente, determinándose su respuesta presora en mmHg. Los registros de presión sanguínea se realizaron con un polígrafo MT8P-Lectromed (Letica Instr.). A los 15 minutos se administraron los compuestos a evaluar por vía endovenosa y 5 min después se repitieron las dosis de agonista.

Se evaluaron cuatro dosis por compuesto de entre 0.003 a 0.03 mg/Kg en el estudio del antagonismo a 5-HT_{2A} y de 0.001 a 0.6 mg/kg en el estudio del antagonismo a α_1 . Como controles positivos se utilizaron antagonistas específicos de estos receptores, Ketanserina (0.003 a 0.06 mg/kg) y Prazosina (0.003 a 0.06 mg/kg) respectivamente.

Se cuantificó el efecto inhibitorio de los compuestos sobre el incremento de presión arterial media (PAM) inducida por los agonistas. Se calcularon las DI₅₀ por regresión lineal.

III.5. Modelos Conductuales

En todos estos modelos, los compuestos a ensayar se administraron a dosis farmacológicamente equipotentes y por vía oral mediante sondaje intragástrico, excepto que se indique otra vía.

III.5.1 Modelos Conductuales Predictivos de Actividad Antipsicótica

III.5.1.1.-Inhibición del comportamiento de escalada ('climbing behaviour') inducido por Apomorfina en ratón.

La compulsión de escalar inducida por Apomorfina (agonista dopaminérgico mixto D₂/D₁, que a dosis elevadas actúa preferentemente a nivel del receptor D₂ post-sináptico), debe ser inhibida por compuestos con actividad antagonista sobre el receptor D₂.

Se realizaron cuatro estudios complementarios en distintos tiempos y vías de administración. En todos estos ensayos se añadieron grupos controles, tratados únicamente con vehículo. El tamaño muestral utilizado fue de n=10-20 ratones por grupo de tratamiento.

En todos, la Apomorfina se administró a 1 mg/kg sc, dosis que se considera elevada, a fin de bloquear receptores D₂ post-sinápticos, y que en estudios preliminares inducía la puntuación máxima de escalada en el 90% de los animales tratados con vehículo.

La evaluación se realizó 10, 20 y 30 min después de la administración de Apomorfina siguiendo el método de P. Protais et al (1976). Se colocaron los ratones en la base de una caja rectangular (11x7.5x4.5 cm) de metacrilato, con una de las caras de malla metálica de 3 mm. Cada animal se observó durante 2 min. por evaluación y se puntuó de acuerdo al número de patas con las que se agarraba a la malla, según la siguiente escala: 4 puntos cuatro patas en la malla, 3 puntos tres patas, 2 puntos dos patas, 1 punto una pata y 0 puntos patas en la base (Fig. 9).



Fig.9. Prueba del comportamiento de escalada. A: animal tratado con vehículo + Apomorfina. B: animal tratado con compuesto antagonista D₂ + Apomorfina

Los tres ensayos realizados se detallan a continuación:

- Estudio vía oral. Abaperidona·HCl 0.0625, 0.125, 0.25 y 0.5 mg/kg; Risperidona 0.078, 0.156, 0.312, 0.625 y 1.25 mg/kg; Clozapina 5, 10, 15 y 20 mg/kg; Haloperidol 0.25, 0.50, 0.75 y 1 mg/kg y Olanzapina 1.25, 2.5 y 5 mg/kg. La inyección de Apomorfina se realizó a los 30 tras la administración de los compuestos.
- Estudio vía intraperitoneal. Abaperidona·HCl y Risperidona a las dosis de 0.1, 0.25 y 0.5 mg/kg. La inyección de Apomorfina se realizó a los 30 tras la administración de los compuestos
- Estudio a lo largo del tiempo vía oral. Se probaron en paralelo Abaperidona·HCl y Risperidona, dosis de 0.5 mg/kg, más grupo control. Los animales de este grupo control se repartieron al azar entre los distintos

tiempos de valoración. La inyección de Apomorfina se realizó a las 2, 4, 6 y 8 h tras la administración de los compuestos.

Se obtuvieron las sumas de puntuación por animal y se determinaron las medias de puntuación por grupo de tratamiento. Se calcularon los porcentajes de inhibición de los grupos tratados respecto al grupo control, que se consideró el 100% y se hallaron las DI₅₀, con los correspondientes intervalos de confianza del 95%, mediante un análisis de regresión lineal.

III.5.1.2- Inhibición de la hiperactividad inducida por Apomorfina, p-cloro-Anfetamina (PCA) o Dizocilpina (MK801) en ratón.

La Apomorfina y el PCA (agonistas dopaminérgicos que a dosis elevadas actúan mayoritariamente a nivel de los receptores D₂ post-sinápticos y pre-sináptico respectivamente) y el MK801 (bloqueante del canal iónico del receptor NMDA) inducen un aumento de la actividad motora en el animal de experimentación. Esta hiperactividad es revertida si el compuesto en estudio bloquea de manera general los receptores D₂ o activa los receptores NMDA respectivamente.

Para medir la actividad motora se utilizó un Actímetro DAS 16 (Panlab sl). Se trata de un sistema para la adquisición automática de datos procedentes de cuatro unidades sensoras (Fig 10). Estas unidades detectan los desplazamientos de los animales por variación de la frecuencia de la red inductancia/conductancia. La sensibilidad de las sensoras se gradúa a fin de evitar el conteo de pequeños movimientos de aseo y olisqueo. El ordenador transforma las señales recibidas de las sensoras en un valor arbitrario, sin unidades, que se denomina número de contajes.

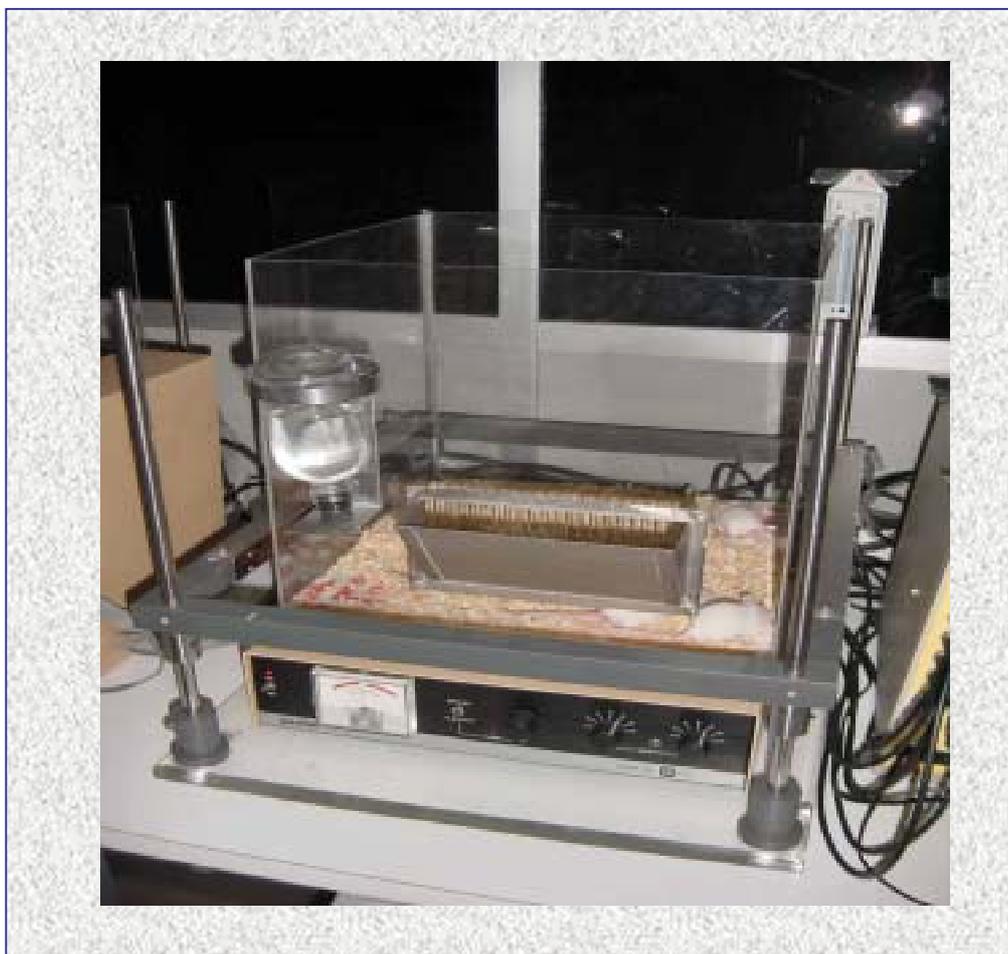


Fig. 10. Detalle de una sensora del Actímetro DAS 16 (Panlab sl). Consta en la parte superior de la arena de experimentación, en la parte inferior la unidad de contajes y un perímetro cuadrangular con células de rayos infrarrojos que permite el contaje del nº de rearings.

Los compuestos y dosis utilizados en los tres ensayos se detallan a continuación:

- Estudio hiperactividad inducida por Apomorfina. Abaperidona·HCl y Risperidona 0.0625, 0.125, 0.25 y 0.5 mg/kg; Olanzapina 0.625, 1.25, 2.5 y 5 mg/kg; Clozapina 2.5, 5.0, 7.5 y 10 mg/kg y Haloperidol 0.10, 0.25, 0.5 y 1 mg/kg
- Estudio hiperactividad inducida por PCA. Abaperidona·HCl, Risperidona y Haloperidol 0,065, 0,125, 0,25 y 0,5 mg/Kg y Clozapina 2, 4, 8, y 16 mg/Kg.

- Estudio hiperactividad inducida por MK801. Abaperidona·HCl, Risperidona y Haloperidol 0,1, 0,25, 0,5 y 1.0 mg/kg; Olanzapina 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0 mg/kg; Clozapina 2.5, 5.0, 10.0 y 20.0 mg/kg.

En el tiempo 0 los animales se administraron con los compuestos a ensayar y se colocaron en la arena de experimentación. La Apomorfina (1 mg/kg) y el PCA (5 mg/kg) se administraron subcutáneamente 60 min y el MK-801(0.5 mg/kg) 30 min después, respectivamente, de la administración de los compuestos. Estas dosis se escogieron sobre la base de estudios preliminares como las primeras dosis que indujeron aumento significativo de la actividad motora respecto a animales tratados con vehículo.

El tamaño muestral fue de $n = 6-10$ grupos de 3 animales que se valoraron simultáneamente en la misma jaula / por grupo de tratamiento. La valoración de la actividad motora se realizó durante 60 min.

En cada estudio se obtuvieron los porcentajes de inhibición de los grupos tratados respecto al grupo control y se calcularon las correspondientes DI_{50} con intervalos de confianza del 95% mediante un análisis de regresión lineal.

III.5.1.3- Inhibición de los déficits sensorimotores (Prepulse inhibition, PPI) inducidos por Apomorfina o Fenciclidina (PCP) en rata.

El PPI es una medida de la habilidad de un sujeto para procesar la información. Cuando un estímulo que 'asusta', llamado pulso, es precedido por un estímulo débil que 'previene', denominado prepulso, la respuesta al susto es menor. La disminución del procesamiento sensorimotor se detecta tanto en humanos (esquizofrénicos) como en ratas (inducido por psicomiméticos). Este fenómeno puede cuantificarse. Se utilizó un Animal Acoustic Startle System (Coulburn Instr.) (Fig. 11 y 12).

Este aparato permite programar secuencias distintos estímulos acústicos o sonidos (ensayos) que se utilizan como pulsos y prepulsos. Los sonidos, tonos y ruidos, se calibraron regularmente mediante un sonómetro Rion NL-05 en escala dB(A). Durante todo el estudio se mantuvo un ruido de fondo (background noise) de 61dB(A).



Fig. 11. *Animal Acoustic Startle System. Cámara de insonorización en el que sea hallan las sensoras y los altavoces. En la poyata, de izquierda a derecha: los amplificadores, la torreta de control del tipo de ondas emitidas-recibidas, ordenador en el que se programan los trial y digitaliza la señal de respuesta.*

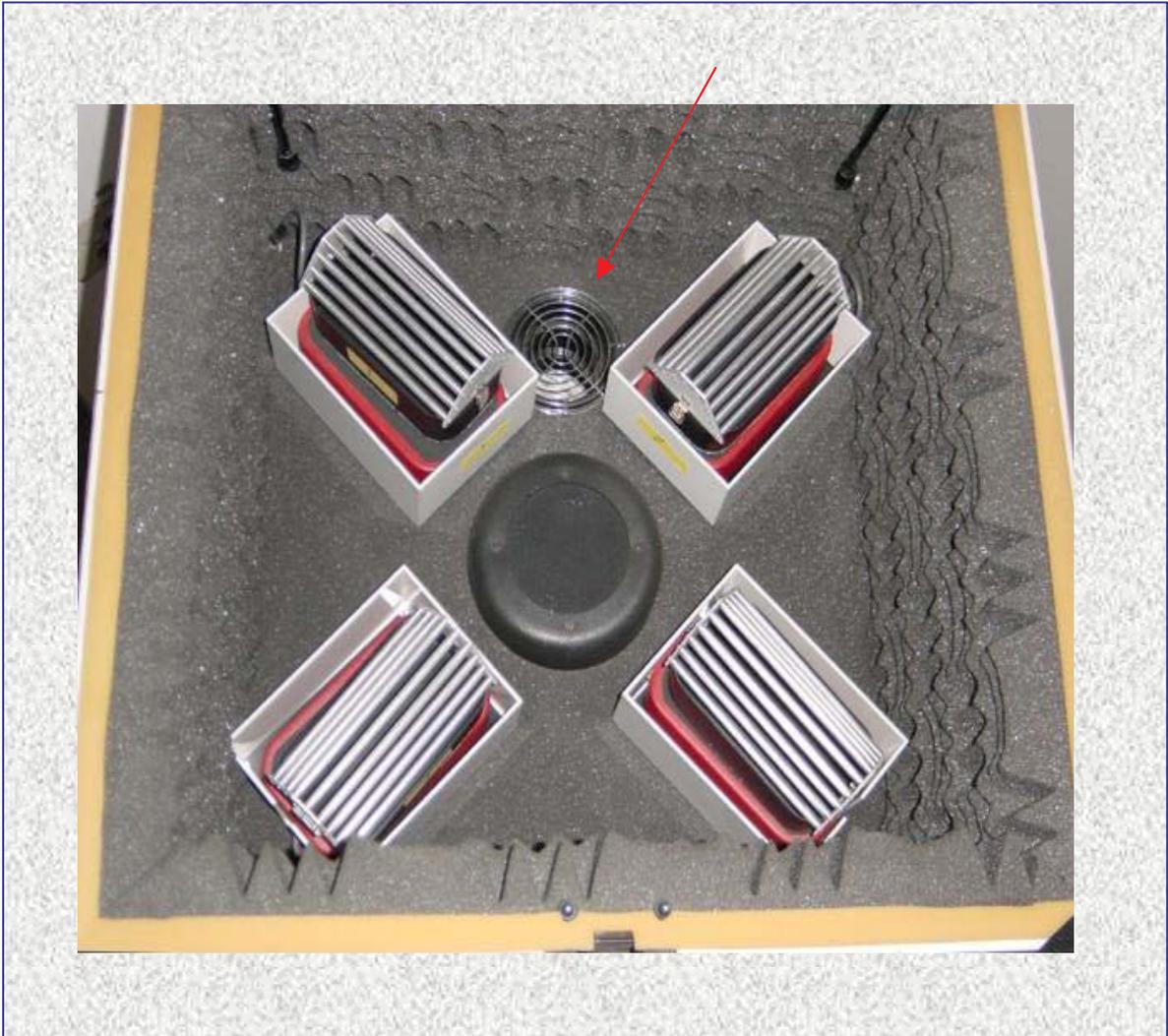


Fig. 12. *Animal Acoustic Startle System. Detalle del interior de una caja de insonorización. Se observa centrado el altavoz que emite ruidos (el de tonos se halla en la tapa superior no visible en la foto), está rodeado de 4 plataformas-sensores- con jaulas para ratas. En la zona superior de la imagen se observa la rejilla del ventilador que emite un ruido de fondo continuo y regular (background noise) durante todo el experimento.*

La prueba consistió en medir, durante un intervalo de 200 ms, los cambios de presión ejercidos por el animal sobre la plataforma, al asustarse ante los distintos estímulos acústicos, según la metodología modificada de Rigdon & Viik (1991). Consta de cuatro tipos de ensayos repartidos aleatoriamente 10 veces cada uno, tal como se detalla en la tabla 9.

Tabla 9. Descripción de los tipos de ensayos realizados en la prueba del PPI

Tipo de ensayo	tipo 1 ^{er} estím.	Frec.1 ^{er} estím.	dB 1 ^e estím.	duración (ms)	ISI (ms)	tipo 2 ^o estím.	Frec.2 ^o estím.	dB 2 ^o estím.	duración (ms)	ITI (s)
T1 (PULSO)						Ruido blanco		123.0	40	15
T2 (PP+P)	tono	1kHz	92.0	50	100	Ruido blanco		123.0	40	15
T3 (PREPULSO)	tono	1kHz	92.0	50	100	Ruido blanco		0	1	15
T4 (NULO)						Ruido blanco		0	1	15

PP: prepulso // ISI: intervalo inter-estímulo // ITI: intervalo inter-ensayo // ruido blanco: presenta todas las frecuencias

Estos cambios de presión o 'picos' se digitalizan dando lugar a la variable amplitud de respuesta (ASR, amplitude startle response) que se mide en gramos. Esta variable se transforma en el porcentaje de prepulse inhibition-PPI (%PPI): $100 - (\text{ASR de T2} \cdot 100 / \text{ASR de T1})$.

El test se realizó en tres días, de los cuales los dos primeros fueron de selección de animales. Los animales fueron seleccionados de acuerdo con el siguiente criterio:

- El % de PPI fuera igual o mayor del 60%
- La diferencia de ASR en T1 y en T2 fuera estadísticamente significativa ($p < 0.05$) al compararse mediante el test de Wilcoxon de datos pareados.
- Los coeficientes de variación ($CV = [DE/mediana] \cdot 100$) de T1 y T2 no fueran mayores de 90 ya que podía inducir una excesiva dispersión de los resultados el día de la prueba.

Al tercer día los animales seleccionados se asignaron aleatoriamente a los grupos de estudio:

- Inhibición del PPI inducido por Apomorfina: vehículo (agar 0.25%), Abaperidona-HCl (0.5 y 1 mg/kg), Risperidona (0.5 y 1 mg/kg) o Clozapina (20 y 30 mg/kg). A los 20 min, los animales recibieron Apomorfina (0.5 mg/kg sc) o vehículo (sc)
- Inhibición del PPI inducido por PCP: vehículo (agar 0.25%), Abaperidona-HCl (0.5 y 1 mg/kg), Risperidona (0.5 y 1 mg/kg), Olanzapina (3.5 y 7.5 mg/kg), Clozapina (10 y 30 mg/kg), Prazosina (0.5

y 1 mg/kg). A los 20 min, los animales recibieron PCP (3 mg/kg sc) o vehículo. Al haber un número superior de grupos experimentales que en el ensayo anterior, primero se realizó la prueba con las dosis bajas y sus grupos control (agar Y PCP) y después las dosis superiores con sus correspondientes grupo control (agar Y PCP).

El tamaño muestral utilizado fue de n=12 a 16 ratas por grupo de tratamiento.

Tras la administración de Apomorfina o PCP, los animales fueron colocados en la cámara de insonorización, y se programaron 10 min de habituación antes de empezar la prueba.

En el estudio con Apomorfina se utilizaron ratas Wistar mientras que en el estudio con PCP se utilizaron ratas Sprague-Dawley. Está descrito la influencia de la elección de cepa, tanto en rata como ratón, en los resultados de esta prueba y las dos cepas de rata elegidas muestran distinta respuesta al PPI según el tipo de ensayo a realizar (Rigdon GC, 1990; Swerdlow et al., 1998; Dulawa & Geyer, 2000).

Se calcularon las medias de %PPI por grupo de tratamiento. Para comparar los grupos de tratamiento se realizó un análisis de la variancia, ANOVA, seguido de un test de Dunnett. Se analizó la posible existencia de sesgo experimental por el hecho de repetir la prueba en días sucesivos. Se comparó mediante un t-Student Test de datos pareados las variables %PPI del primer día respecto la del tercer día de los grupos vehículo-vehículo. La validez del modelo experimental se comprobó mediante una t de Student comparando los grupos vehículo-vehículo respecto a los vehículo-apomorfina/PCP. En el caso del estudio con PCP, además se comprobó la homogeneidad de los grupos control (control-0.5-control respecto control-1-control y control-0.5-PCP respecto control-1-PCP) mediante un t-Student Test. En todos los casos, se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

III.5.1.4- Inhibición de las sacudidas de cabeza ('Head-twitches') inducidas por DOI [1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano] en ratón NMRI.

El grado de inhibición de las sacudidas de cabeza inducidas por DOI, potente agonista selectivo de los receptores 5HT₂, se ha correlacionado directamente con la actividad antagonista de los compuestos sobre los receptores 5HT_{2A} principalmente.

Se realizaron dos estudios complementarios por distintas vías de administración. En todos estos ensayos se añadieron grupos controles, tratados únicamente con vehículo. El tamaño muestral utilizado fue de n=9-12 ratones/grupo de tratamiento. Las dosis y vías utilizados se detallan a continuación:

- Estudio por vía oral. Abaperidona·HCl 0.0312, 0.0625, 0.125 y 0.25 mg/kg, Risperidona 0.0075, 0.0156, 0.0312 y 0.078 mg/kg, Haloperidol y Clozapina de 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/kg y Olanzapina de 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/kg.
- Estudio por vía intraperitoneal. Abaperidona·HCl 0.025, 0.05 y 0.1 mg/kg y Risperidona 0.005, 0.01 y 0.02 mg/kg.

Los animales fueron administrados con DOI (3 mg/kg, ip) 60 min después de la administración de los compuestos a ensayar. La dosis de DOI se escogió en estudios preliminares como la dosis que inducía una aparición de un número igual o superior a 9 sacudidas de cabeza en el 80% de los animales control.

Se contabilizaron el número de sacudidas de cabeza realizadas por animal durante 5 min, de los 65 a los 70 min tras la administración del compuesto.

Se calculó la media del número de sacudidas por grupo de tratamiento y se halló el porcentaje de inhibición respecto al grupo control, el cual se consideró el 100%. Se calcularon las correspondientes DI₅₀ con intervalos de confianza del 95% mediante un análisis de regresión lineal.

III.5.1.5.- Reversion de la hipolocomoción inducida por mCPP [1-(3-clorofenil)piperazina] en ratas.

La inhibición de la hipolocomoción inducida por mCPP, agonista parcial 5HT_{2C}, se ha correlacionado directamente con la actividad antagonista de los compuestos sobre estos receptores en las áreas límbicas y estriado.

Los animales se administraron con mCPP (2 mg/kg ip) o suero fisiológico al 0.9% (control negativo) 45 minutos después de la administración de los compuestos e inmediatamente fueron colocados en la arena de experimentación. Veinte min después se realizó la valoración de la actividad motora mediante un Videomex-X System (Columbus Instr.). Este aparato consta de una cámara de vídeo que sigue el

desplazamiento del animal por la arena, y está conectada a un programa que convierte la señal en distancia en cm y guardando el trazado del desplazamiento (Fig. 13).

Se utilizó este aparato, en lugar del actímetro empleado en las otras pruebas de actividad motora, consideradas más de cribado, para poder evaluar el tipo de recorrido en la arena y determinar diferencias entre grupos de tratamiento, posibles indicadoras de ansiedad u otros trastornos. No se observaron patrones distintos de comportamiento, por lo que no se ha considerado este parámetro en los resultados. Además, al ser una arena de mayor tamaño permite utilizar ratas, por lo que se obtienen datos de dos especies en actividades motoras.

El desplazamiento (en cm) efectuado por los animales se registró durante 10 min en intervalos de 2.5 min. El intervalo final de 7.5–10 min se desestimó en los cálculos debido a la pérdida del efecto del mCPP, lo que daba lugar a una convergencia de resultados entre los distintos grupos de tratamiento.

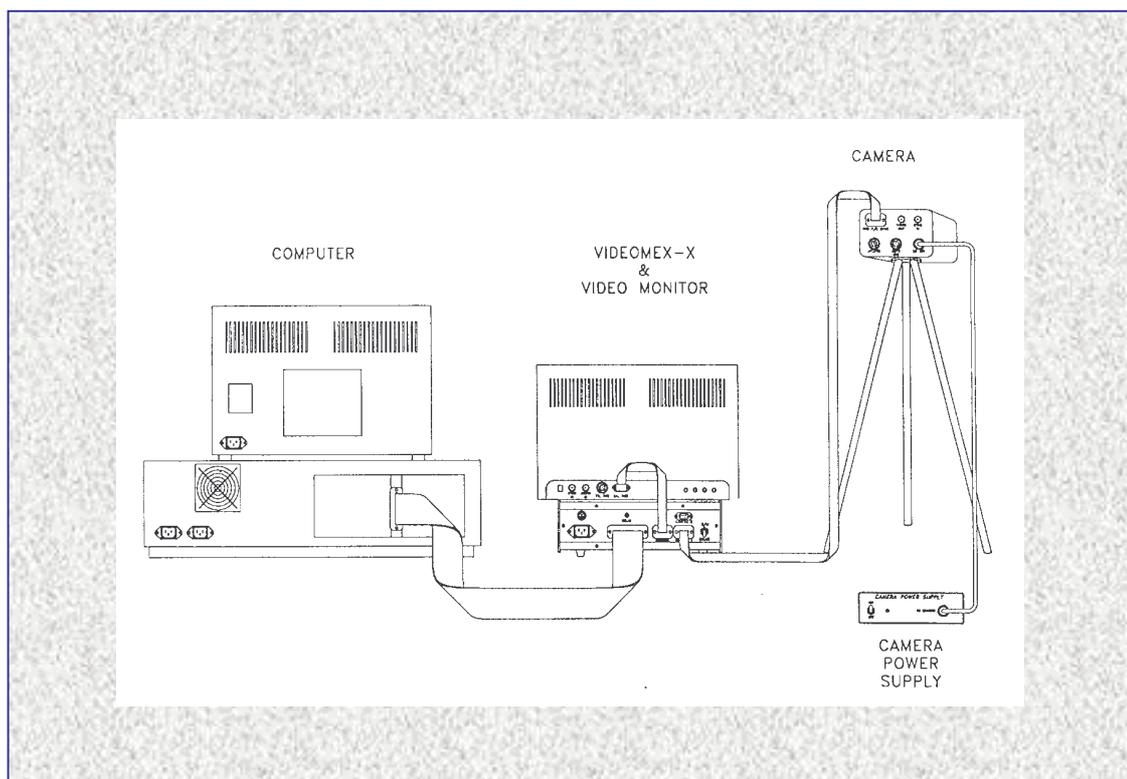


Fig. 13. Esquema del Videomex-X System, visto por detrás. Se muestran las conexiones entre la cámara de vídeo, el convertidor de señal (Videomex-X) y el ordenador.

Se obtuvo la distancia total recorrida por animal en 7.5 min. Las distribuciones de datos mostraron elevada variabilidad, muchas no se ajustaron a la Normal ($p < 0.05$), por lo que al intentar comparar los grupos de tratamiento respecto al control-mCPP no se cumplían los requisitos iniciales de Normalidad ($p = 0.0162$). Por este motivo, se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas. Se validó el método comparando la distancia recorrida por el grupo control negativo respecto al grupo vehículo-mCPP mediante a un test U-Mann-Whitney. Para comparar los efectos de los compuestos, se realizó una Kruskal-Wallis, seguida de un test de Dunn. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

III.5.1.6- Protección a la letalidad inducida por Noradrenalina en ratón.

Los animales se administraron con noradrenalina (1.25 mg/kg, ev)-agonista adrenérgico- 30 min después de la administración de los compuestos. Esta dosis se escogió como la dosis mínima que inducía una mortalidad del 90 al 100 % en animales tratados con vehículo.

Los compuestos y las dosis ensayadas fueron: Abaperidona-HCl y Risperidona 4 dosis dentro del rango de 0.03 a 0.1 mg/kg, Haloperidol de 0.05 a 3.2 mg/kg, Clozapina de 0.1 a 6.4 mg/kg, Olanzapina dosis de 1, 2, 4 y 8 mg/kg y Prazosina dosis de 0.1, 0.4 y 0.8 mg/kg. Se incluyó Prazosina -antagonista α_1 -adrenérgico- como control positivo.

El tamaño muestral utilizado fue de $n = 10-15$ por cada grupo de tratamiento.

Se contabilizó el número de animales que sobrevivió a los 15 min de la Noradrenalina. El porcentaje de protección por grupo de tratamiento se calculó como $[(n^\circ \text{ animales supervivientes}/n^\circ \text{ animales administrados}) * 100]$. Se calcularon las correspondientes DE_{50} con intervalos de confianza del 95% mediante un análisis de regresión lineal.

III.5.2 Modelos Conductuales Predictivos de Efectos Adversos Relacionados con el Mecanismo de Acción

III.5.2.1-Inducción de catalepsia en ratas tras tratamiento agudo y subagudo.

La inducción de catalepsia es una característica de los antipsicóticos considerados típicos y esta prueba se considera predictiva de los efectos EPS. Se realizaron tres estudios por distintas vías y duración:

- Estudio agudo vía oral. Se administraron las siguientes dosis de cada producto: Abaperidona·HCl 5, 7.5, 10, 12.5 y 15 mg/kg; Risperidona 2.5, 3.75, 5, 7.5 y 10 mg/kg; Haloperidol 0.625, 1.25, 2.5 y 5 mg/kg; Clozapina 10, 25, 50 y 75 mg/kg y Olanzapina 10, 20 y 40 mg/kg. El tamaño muestral utilizado fue de n = 10-20.
- Estudio agudo vía intraperitoneal. Abaperidona·HCl 7.5, 10, 12.5, 15 y 17.5 mg/kg y Risperidona 6.25, 7.5, 10, 12.5 y 15 mg/kg. El tamaño muestral utilizado fue de n = 10-15 .
- Estudio subagudo (17 días) vía oral. Abaperidona·HCl, Risperidona y Haloperidol a una dosis de 5 mg/kg y con un grupo control común, además de otro grupo de Risperidona a la dosis de 3.125 mg/kg con su correspondiente control ya que se realizó con posterioridad. El tamaño muestral fue de n =5.

En los tratamiento agudos los animales se evaluaron a los 30, 60, 90, 120, 180 y 300 min tras la administración de los compuestos a ensayar. El tratamiento subagudo, con una duración de 17 días, los animales se administraron y evaluaron diariamente, aunque se suprimió la valoración de los 30 min a fin de minimizar manipulaciones.

La valoración se realizó basada en el método de C. Morpurgo (1965). Se utilizó un taco de madera de (9x3x3 cm). Las patas delanteras de cada animal se colocaron con cuidado en distintas posiciones sobre este taco. El grado de catalepsia se puntuó de acuerdo con la siguiente escala: ½ punto por cada pata que permaneció 10 s en la cara de 3 cm del taco, 1 punto por cada pata que permaneció 10 s en la cara de 9 cm

del taco y 1 punto adicional si el animal mantuvo 10 s un cruzamiento homolateral (Fig. 14).

Se obtuvo la suma de puntos por animal en cada evaluación. El porcentaje de catalepsia se calculó respecto a la puntuación máxima posible (4 puntos = 100% de catalepsia). Se calcularon las correspondientes DE₅₀ con intervalos de confianza del 95% mediante un análisis de regresión lineal, utilizando siempre los porcentajes en los que la inducción fue máxima por cada grupo de tratamiento.

Para el estudio subagudo se comprobó si existían diferencias en el incremento de peso semanal de los animales tratados respecto a los animales control mediante una ANOVA y una t-Student para el grupo de Risperidona de 3.125 mg/kg respecto a su control. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

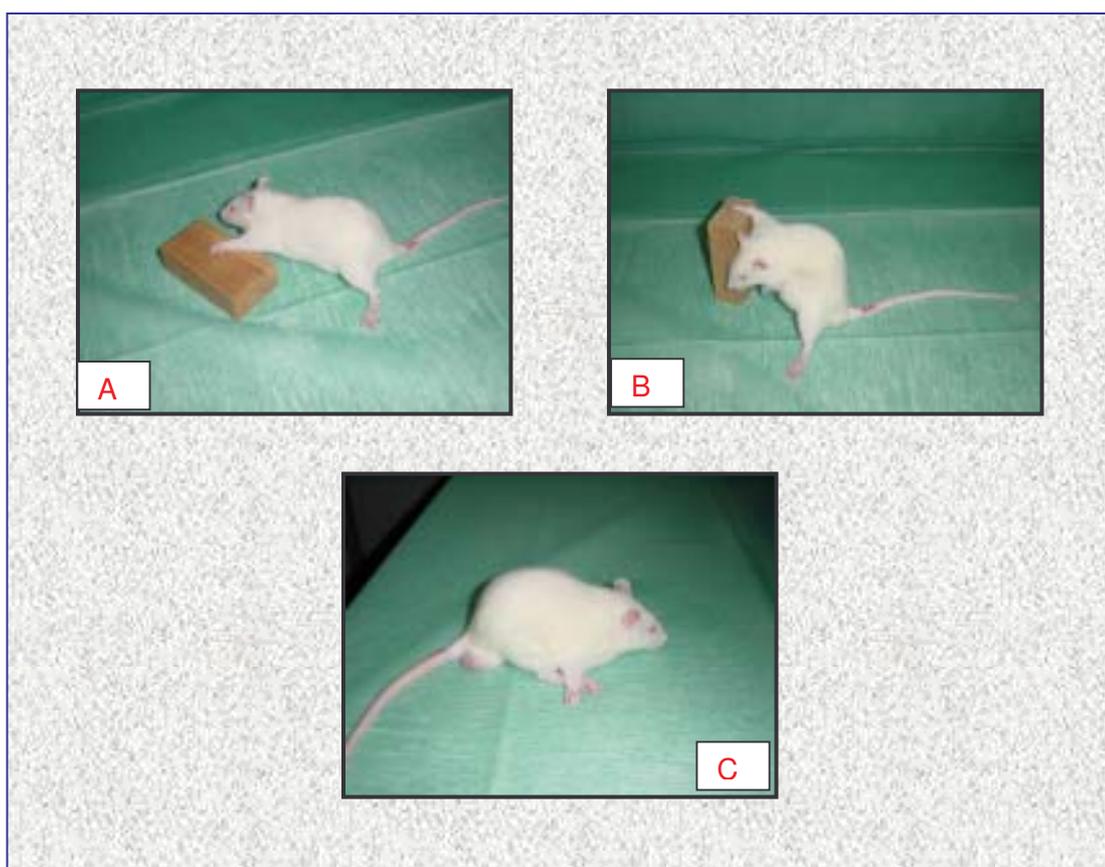


Fig. 14. Catalepsia. Demostración de las posiciones utilizadas para la valoración, A: posición de 3 cm; B: posición de 9 cm; C: cruzamiento homolateral.

III.5.2.2-Inhibición de la estereotipia inducida por Apomorfina o d-Anfetamina en ratas.

Se ha correlacionado positivamente un elevado bloqueo de los receptores D₂ en el sistema nigroestriado con la inducción de catalepsia y estereotipia en los animales de experimentación, pruebas con un elevado grado de predicción de la posterior aparición de EPS en humanos. Se evaluó el efecto de Abaperidona:HCl en esta prueba.

- Estudio con Apomorfina. Abaperidona·HCl 5, 10, 20 y 40 mg/kg, Risperidona 5, 7.5, 10, 12.5 mg/kg, Haloperidol 0.5, 1, 2 y 4 mg/kg, Olanzapina 5, 10 y 20 mg/kg y Clozapina 50 y 100 mg/kg. El tamaño muestral utilizado fue de n = 15-20
- Estudio con d-Anfetamina. Abaperidona·HCl 2.5, 5, y 10 mg/kg; Risperidona 1.25, 2.5 y 5 mg/kg; Haloperidol 0.32, 0.65 y 1.25 mg/kg, Clozapina 50, 100 y 150 mg/kg y Olanzapina 5, 10 y 20 mg/kg. El tamaño muestral utilizado fue de n = 10-15.

La estereotipia se evaluó mediante una escala de puntuaciones arbitraria: (0) el animal no realiza ningún movimiento anormal; (1) presencia de ligeros movimientos de cabeza y olisqueo intermitente; (2) movimientos intensos con la cabeza, ligeros lametones a la jaula y olisqueo continuado y (3) intensos lametones, olisqueo continuado, movimientos de cabeza muy exagerados y boca llena de viruta. A veces se otorgó una puntuación intermedia (2-3) cuando además de los movimientos típicos de (2) el animal mordisqueaba la viruta.

Los agonistas dopaminérgicos se inyectaron a los 30 min (d-Anfetamina, 3 mg/kg sc) y 2 h (Apomorfina, 1.5 mg/kg s.c), respectivamente, tras la administración de los compuestos. Esta dosis se escogieron como las dosis que inducían una estereotipia con puntuación superior a 2 en el 100% de los animales tratados con vehículo. Además, al ser dosis elevadas, se considera que inducen una acción preferente sobre los receptores D₂. Las valoraciones de los signos de estereotipia se realizaron a los 10, 20, 30, 60 y 90 minutos tras la administración de los agonistas.

Se calculó la media de puntuación por grupo de tratamiento y se halló el porcentaje de inhibición respecto al grupo control. Se calcularon las correspondientes DI₅₀ con intervalos de confianza del 95% mediante un análisis de regresión lineal.

III.5.2.3-Inhibición del comportamiento de aseo ('grooming') inducido por SKF-38393 en ratón.

El SKF-38393 es agonista selectivo del receptor D₁. Esta prueba se utiliza para determinar la actividad antagonista de los productos sobre el receptor D₁ in vivo.

Los animales se distribuyeron entre los siguientes grupos de tratamiento: Abaperidona·HCl y Risperidona 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg/kg; Haloperidol y Clozapina 0.125, 0.25, 0.5 y 1.25 mg/kg; Olanzapina 0.25, 0.5 y 1 mg/kg.

El tamaño muestral utilizado fue de n = 10-15 ratones/grupo de tratamiento.

El SKF-38393 (2.5 mg/kg ip) se administró a los 60 min tras la administración de los compuestos. A los 15 minutos se inicia la valoración. Se determinó el tiempo (s) que los ratones emplean en aseo durante un periodo de 15 min que dura la observación.

Se calculó la media del tiempo de aseo (s) por grupo de tratamiento y se halló el porcentaje de inhibición respecto al grupo control. Se calcularon las correspondientes DI₅₀ con intervalos de confianza del 95% mediante un análisis de regresión lineal.

III.5.2.4-Actividad Motora Espontánea en rata.

Los antipsicóticos inducen hipolocomoción/sedación. Para evaluar este posible efecto en Abaperidona·HCl se utilizó un Videomex-X System (Columbus Instr.) que como se ha comentado anteriormente, permitía seguir y grabar la trayectoria del animal, así como cuantificar la distancia recorrida en cm.

Los compuestos y dosis estudiados se detallan a continuación: Abaperidona·HCl 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 mg/kg; Risperidona 0.1, 0.25, 0.5, 1 y 2 mg/kg; Haloperidol 0.1, 0.25, 0.5 y 1 mg/kg; Clozapina 2.5, 5, 10 y 20 mg/kg.

El tamaño muestral utilizado fue de n=10-12 ratas por grupo de tratamiento.

Los animales se administraron con los compuestos a ensayar 30 min antes de valorar su actividad motora. Los animales se probaron siempre en parejas, un tratado y un control (vehículo). La actividad motora se midió durante 60 min. Se calculó la media de la distancia recorrida por grupo de tratamiento y se halló el porcentaje de inhibición respecto al grupo control. Se calcularon las correspondientes DI_{50} con intervalos de confianza del 95% mediante un análisis de regresión lineal.

Al obtenerse distribuciones de datos con elevada variabilidad no se ajustaron a la Normal en algunos casos, por lo que se aplicó tests estadísticos no paramétricos. La homogeneidad de los grupos control se comprobó mediante un test de Kruskal-Wallis. Además se halló la primera dosis que disminuía significativamente la actividad motora de los animales tratados respecto a los controles mediante un test U-Mann-Whitney. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

III.5.2.5- Protección a la letalidad inducida por Fisostigmina en ratón.

Los animales se administraron con fisostigmina (1.3 mg/kg, ip)-inhibidor de la Acetilcolina esterasa- 30 min después de la administración de los compuestos. Esta dosis se escogió como la dosis mínima que inducía una mortalidad del 90 al 100 % en animales tratados con vehículo.

Los compuestos y las dosis ensayadas fueron Abaperidona·HCl, Risperidona y Haloperidol 4 y 8 mg/kg; Clozapina 1.56, 3.125, 6.25, 12.5 y 25 mg/kg y Olanzapina 0.25, 0.5, 1, 2.5 y 5 mg/kg.

El tamaño muestral utilizado fue de $n = 10-15$ por cada grupo de tratamiento.

Se contabilizó el número de animales que sobrevivió a los 60 min. El porcentaje de protección por grupo de tratamiento se calculó como $[(n^{\circ} \text{ animales supervivientes}/n^{\circ} \text{ animales administrados}) * 100]$. Se calcularon las correspondientes DE_{50} con intervalos de confianza del 95% mediante un análisis de regresión lineal.

III.6. Determinación de Efectos Neuroendocrinos y Cardiovasculares relacionados con el mecanismo de acción.

III.6.1. Determinación de los niveles de prolactina en suero de rata.

Los animales fueron administrados con los compuestos a ensayar (5 mg/Kg/día) o vehículo (agar 0.25%). Se repartieron en dos grupos que fueron administrados 1 y 3 días consecutivos respectivamente. El tamaño muestral fue de n= 5 ratas/grupo. Tres horas después de la última administración, los animales fueron decapitados y se obtuvieron muestras de 2 mL de sangre. Los niveles de prolactina se determinaron mediante un kit comercial de RIA (Amersham Pharmacia).

Las diferencias en los niveles de prolactina inducidos por los distintos tratamientos y días, se analizaron mediante una ANOVA seguida de un test de Bonferroni para las comparaciones dos a dos. Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

III.6.2. Determinación de la presión arterial y frecuencia cardiaca en rata consciente.

Se realizaron dos estudios, uno en administración oral y otro en administración endovenosa.

En cada rata se implantó un catéter en la arteria femoral izquierda, que se pasó por debajo de la piel de la región dorsal hasta extraerlo por la nuca, dejando una porción externa de 3 a 4 cm. Este catéter se relleno con una cantidad predeterminada de salino y heparina concentrada y se selló con un capuchón metálico. La parte externa del catéter dorsal se acopló a una extensión conectada a un 'swivel' (Harvard Instruments) elevado 35 cm por encima de cada arena. Cada 'swivel' se conectó a través de una llave de 3 válvulas a un transductor de presión (Statham, Lectromed) colocado a nivel del corazón de cada animal. Este sistema permitió que las ratas se moviesen con libertad en las arenas durante todo el experimento. En el estudio endovenoso se implantó un segundo catéter en la vena femoral izquierda, tal como se ha descrito previamente, para permitir la administración de los compuestos.

Se dejó que los animales se recobrasen durante 17-18 h y se les analizó el hematocrito, que debía mostrar los valores normales, para comprobar que la

intervención no había producido hemorragia como consecuencia de la heparina utilizada, antes de administrar los compuestos.

Una hora antes de la administración, los valores basales de la presión arterial (media=PAM; sistólica=PAS; diastólica=PAD) y la frecuencia cardiaca (FC) se registraron con el polígrafo (Graphtec). En el tiempo t=0 se administró el compuesto o vehículo por vía oral mediante sondaje intragástrico y se registraron los parámetros descritos entre 6 y 22 h.

El tamaño muestral utilizado fue n= 5 ratas por grupo de tratamiento en ambos estudios.

Se hallaron la media y desviación estándar de las presiones arteriales PAS, PAD y PAM [$PAM=PAD+(PAS-PAD)/3$], en mmHg, y la frecuencia cardiaca, en latidos por minuto (bpm, beats per min), por grupo de tratamiento. El efecto del producto se refirió respecto a los valores basales y se obtuvieron el incremento (Δ) de PAM y FC por grupo de tratamiento.

Las comparaciones de las variables (Δ PAM y Δ FC) por grupo de tratamiento y tiempo por cada compuesto respecto a los controles se realizaron mediante una ANOVA seguida de un test de Dunnett.

En el estudio endovenoso los animales recibieron el vehículo y una hora después se administró el compuesto. En este caso, los valores absolutos de PAM y FC fueron registrados durante 5 h. El análisis de los datos se realizó mediante una ANOVA de medidas repetidas, comparando el efecto del tratamiento respecto al valor basal por grupo.

IV.- RESULTADOS

IV.- RESULTADOS

IV.1- Resultados de ensayos *in vitro* y *ex-vivo*.

IV.1.1.-Ensayos de radioligando.

Previamente a los ensayos de radioligando aquí descritos, se realizó una batería de cribado primario en un número elevado de receptores centrales y periféricos a un único punto de 1 μ M, calculándose el porcentaje de unión específica. Aquellos cuya afinidad fue menos potente del 10% se descartaron. Los receptores en los que el compuesto obtuvo un rango de potencia superior al 10% fueron seleccionados para realizar el cribado secundario, definiéndose la curva dosis respuesta completa y calculando las K_i correspondientes. Los resultados se resumen en la tabla 10.

Abaperidona se unió con afinidad de rango nM a varios receptores del sistema nervioso central. Los resultados indican que Abaperidona presentó la afinidad más potente por los receptores H₁, α_1 , 5-HT_{2A} y D₃. También se observó elevada afinidad por los receptores D₂ (animal y humano) y 5-HT_{2C}, y una afinidad moderada por el receptor 5-HT_{1A} humano y en menor medida el receptor 5-HT_{1A} animal y el D₁ humano. Abaperidona se unió con baja afinidad a todos los otros receptores estudiados (>100 nM).

La afinidad *in vitro* de Abaperidona por el receptor D₂ fue prácticamente equivalente a la de Risperidona o Haloperidol y claramente superior a la de Clozapina, mientras que su afinidad por el receptor 5HT_{2A} de rata fue ligeramente menor que la mostrada por Risperidona pero 30 veces superior a la de Haloperidol. La afinidad de Abaperidona por el receptor H₁ fue tan potente como la de Clozapina. Sin embargo, Abaperidona se diferenció de los antipsicóticos de referencia (Risperidona, Haloperidol y Clozapina) en su afinidad por los receptores α -adrenérgicos. Abaperidona demostró una afinidad de 7 a 40 veces superior por el receptor α_1 -adrenérgico que Risperidona y Clozapina respectivamente. Por el contrario, la afinidad por el receptor α_2 adrenérgico de Abaperidona fue mínima comparada con la de Risperidona.

Tabla 10. Perfil de unión a radioligando de Abaperidona y los antipsicóticos de referencia (K_i nM).

Receptor	Sp	ABA	HAL	RIS	CLZ
D ₁	Rata	239	145	251	235
D ₁	Humano	44	17	27	29
D ₂	Rata	12	10	19	399
D _{2short}	Humano	13	11	19	—
D ₃ (*)	Humano	7.6	4.0	—	812
D _{4.2}	Humano	141	5.4	6.2	36
5-HT _{1A}	Rata	94	2888	491	—
5-HT _{1A}	Humano	20	368	156	286
5-HT _{2A}	Rata	2.6	75	0.94	—
5-HT _{2C}	Rata	12	—	3.5	47
5-HT ₃	Rata	> 2500 (*)	—	—	—
5-HT ₄	Cobayo	1547	> 2500 (*)	> 2500 (*)	> 2500 (*)
5-HT ₆	Rata	138	—	1033	24
5-HT ₇	Cobayo	629	—	—	452
β	Rata	2986	—	21916	25730
α_1	Rata	2.2	—	16	86
α_2	Rata	236	—	43	466
Muscarinic	Rata	1126	—	424	—
M ₁	Humano	895	3018	4385	—
M ₂	Humano	1099	—	—	—
Sigma (σ)	Cobayo	491	1.5	4333	8524
H ₁	Cobayo	1.3	—	5.7	2.4

ABA, Abaperidona; RIS, Risperidona; HAL, Haloperidol; CLZ, Clozapina. (*): Valores de Cl_{50} ; —: No determinado

IV.1.2.-Ensayos de unión *ex-vivo*.

Los resultados de este ensayo se resumen en la tabla 11 y Figura 15. Abaperidona, Risperidona y Haloperidol demostraron un incremento de la B_{max} estadísticamente significativo comparado con la B_{max} del grupo control, tanto para el receptor D₂ (córtex frontal y estriado) como el receptor 5HT_{2A} (córtex).

Sin embargo, la regulación ascendente inducida por Abaperidona en los receptores D₂ fue distinta según el área cerebral implicada. En el estriado fue menor que la inducida por Risperidona o Haloperidol, mientras que el efecto de Abaperidona sobre los receptores D₂ en córtex frontal fue superior que el de Risperidona. Por el contrario, Haloperidol indujo una regulación ascendente de los receptores D₂ equivalente en ambas áreas. Así mismo, Abaperidona y Risperidona se unieron a un número superior de receptores 5HT₂ del córtex que Haloperidol.

Tabla 11. Ensayos de unión *ex-vivo* de Abaperidona y los antipsicóticos de referencia.

Compuesto	Recept D ₂ estriado			D ₂ córtex frontal			Recept 5HT ₂ córtex		
	B _{max}	K _D	Correl. Coef.	B _{max}	K _D	Correl. Coef.	B _{max}	K _D	Correl. Coef.
Control	4.61 ±0.14	0.21 ±0.019	0.984	4.01 ±0.20	0.91 ±0.06	0.962	3.30 ±0.08	0.90 ±0.04	0.979
ABA	6.39 * ±0.14	0.17 ±0.017	0.955	5.64 ** ±0.38	1.39 ** ±0.12	0.937	6.23 * ±0.25	1.02 ±0.08	0.948
RIS	7.15 * ±0.29	0.20 ±0.025	0.971	5.28 * ±0.23	1.58 * ±0.10	0.968	6.50 * ±0.21	1.04 ±0.06	0.970
HAL	9.94 * ±0.17	0.24 ±0.015	0.984	6.02 * ±0.39	1.09 * ±0.10	0.936	5.03 * ±0.13	0.91 ±0.05	0.978

Los valores representan la media del número de sitios de unión (B_{max}; pmoles/g tejido) y de la constante de disociación (K_D; nM) ± esm de n=7-11 concentraciones de ligando, por duplicado. Correl. Coef: Coeficiente de correlación. * p<0.001 y ** p< 0.002 vs el grupo control (t-Student test). ABA, Abaperidona; RIS, Risperidona; HAL, Haloperidol.

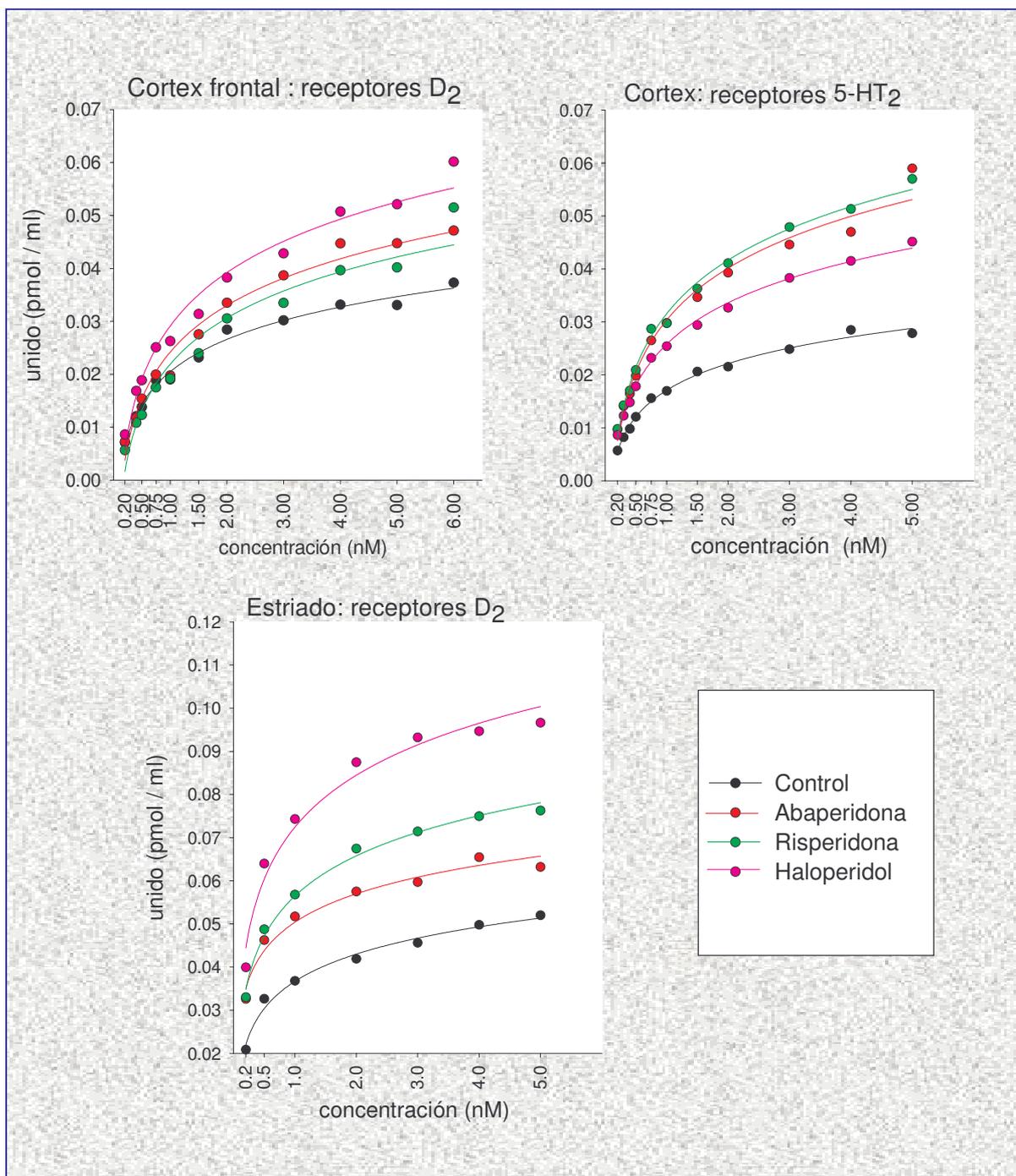


Fig. 15. Unión ex-vivo de Abaperidona, Risperidona y Haloperidol, 6 μ mol/2mL/kg sc durante 7 días, a receptores D₂ en córtex frontal y estriado y receptores 5-HT_{2A} en córtex. Control: grupo administrado con vehículo. n=10 animales por grupo de tratamiento.

IV.2- Resultados de ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*.

Para determinar de manera directa el tipo de efecto, agonista o antagonista, que ejercía Abaperidona sobre los receptores en los que presentaba mayor afinidad (H_1 , α_1 y 5HT_{2A}), se realizaron ensayos funcionales. Además se incluyó el receptor α_2 -adrenérgico por el perfil de afinidad diferencial de Abaperidona respecto a Risperidona. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 12.

Tabla 12. Resultados de los ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*.

Receptor	Modelo	Antagonista específico	ABA	HAL	RIS	CLZ	
α_2	<i>In vitro</i>	Rata vas deferens ^a	Yohimbina 7.24	7.52	--	7.91	5.88
H_1		Íleo Cobayo ^b	Mepiramina 2.700	1.50	6.50	9.40	0.55
α_1	<i>In vivo</i>	Rata desmedulada ^c	Prazosina 0.010	0.002	0.150	0.011	0.100
5HT _{2A}			Ketanserina 0.029	0.003	0.512	0.001	0.023

^{a)} Resultados expresados como valores de pA₂; ^{b)} Resultados expresados como CI₅₀ nM; ^{c)} Resultados expresados como DI₅₀ mg/kg; --No determinado. ABA, Abaperidona; RIS, Risperidona; HAL, Haloperidol; CLZ, Clozapina.

IV.2.1.-*In vitro*.

Abaperidona demostró un potente antagonismo competitivo sobre el receptor H_1 , similar al de Clozapina y en el mismo rango que el antagonista específico Mepiramina.

Sin embargo, Abaperidona presentó una actividad sobre el receptor α_2 -adrenérgico en el rango de 10⁻⁷ nM, desplazando de forma paralela y hacia la derecha la curva de Clonidina (Fig. 16) demostrando un perfil de antagonismo competitivo, aunque mucho menos potente que el ejercido sobre los otros receptores mencionados.

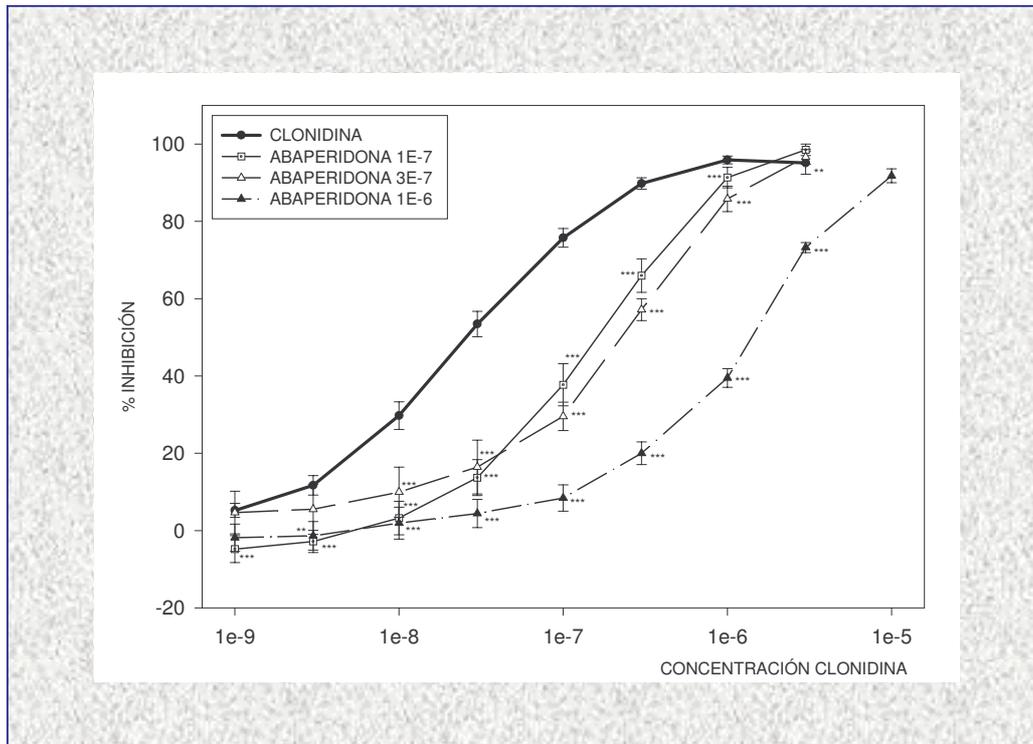


Fig 16. Efecto de distintas concentraciones de Abaperidona sobre la inhibición ejercida por clonidina de las contracciones inducidas eléctricamente en vaso deferente de rata. ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ Abaperidona+clonidina vs clonidina (Student t-Test)

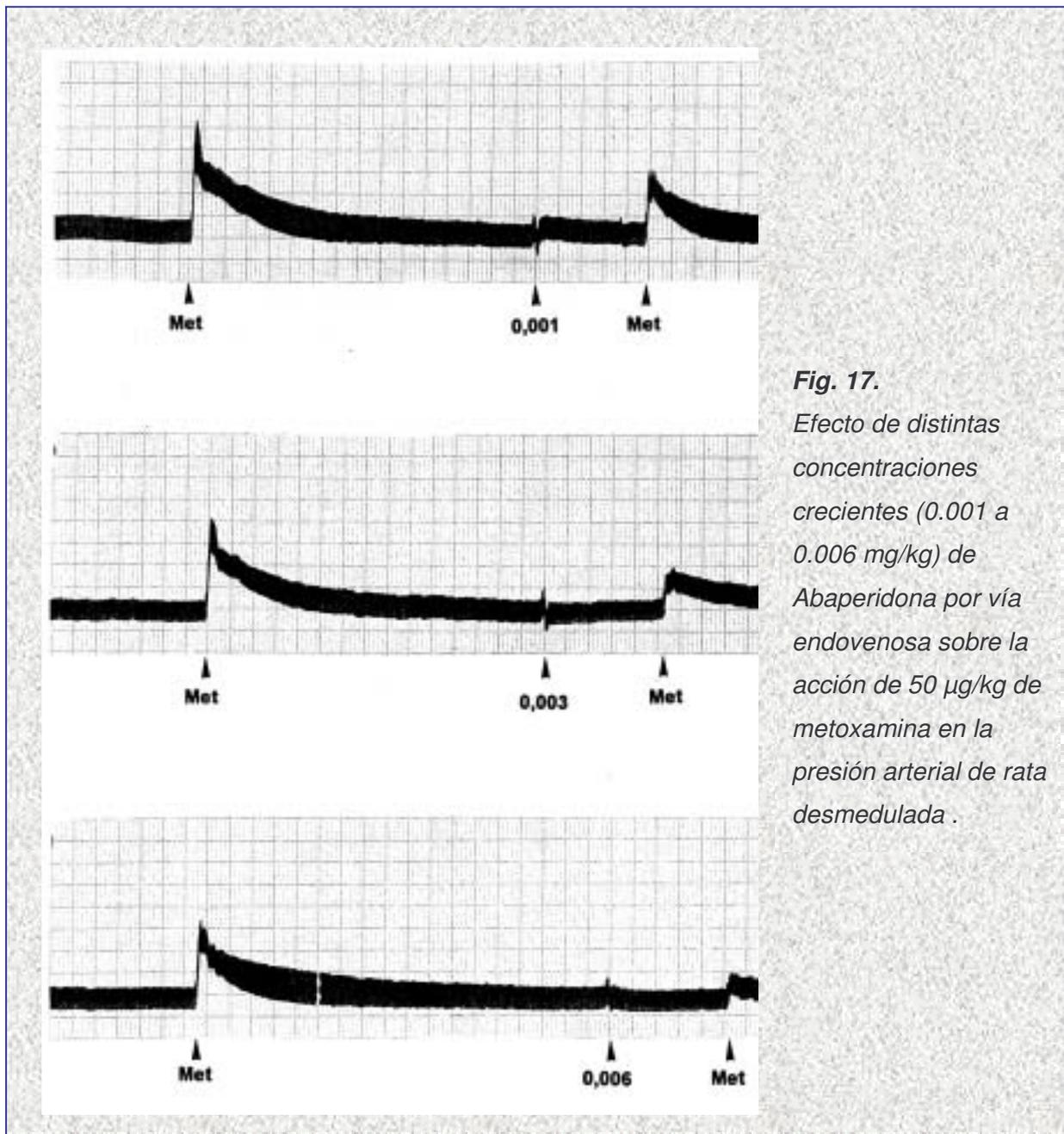
IV.2.2.-In vivo.

La presión arterial media (PAM) basal, obtenida en las distintas experiencias tras la desmedulación fue de 52.29 ± 2.18 a 56.25 ± 1.30 mmHg.

La obtenida tras la administración de 25 mg/kg de α -Me 5-HT en el estudio del efecto de los compuestos sobre los receptores 5-HT_{2A} fue de entre 120 a 125 ± 6 mmHg, suponiendo un incremento de unos 70 mmHg equivalente a un aumento de cerca del 140%. Tras la administración de Metoxamina (50 μ g/kg), la presión fue de entre 105 a 110 ± 3.7 mmHg, siendo un incremento de unos 53 mmHg, lo que supone una 102% de aumento de la PAM. Este potente aumento de la presión arterial en ambos estudios permitió estudiar dosis crecientes de los compuestos para hallar una curva dosis-efecto completa.

Abaperidona ejerció un antagonismo sobre los receptores 5-HT_{2A} equivalente al de los otros antipsicóticos atípicos, Risperidona y Clozapina, y unas 170 veces más potente que el ejercido por Haloperidol, antipsicótico típico.

Abaperidona también demostró un potente antagonismo sobre el receptor α_1 -adrenérgico (Fig. 17), superior al de Risperidona, Clozapina y el antagonista Prazosina.



IV.3.- Resultados de modelos conductuales *in vivo*.

IV.3.1.-Resultados de los modelos predictivos de actividad antipsicótica.

Se realizaron modelos, considerados predictivos de actividad y relacionados con los distintos sistemas de neurotransmisores implicados en la esquizofrenia: D₂ dopaminérgicos, 5HT_{2A/2C} serotoninérgicos, α_1 -adrenérgicos y glutamatoérgicos (receptor NMDA). Los resultados se resumen en la Tabla 13 y la Fig. 18.

Tabla 13. Resultados de modelos conductuales predictivos de actividad antipsicótica. *DI*₅₀ mg/kg.

Sistema	Modelo, v.o.	ABA	RIS	HAL	CLZ	OLZ
D ₂ -dopamina receptor	Escalada inducida por Apomorfina en ratón	0.24 (0.22,0.26)	0.29 (0.24,0.36)	0.31 (0.14,0.69)	15.40 (10.1,23.4)	2.61 (1.25,5.45)
	Hiperactiv. inducida por Apomorfina en ratón	0.17 (0.13,0.21)	0.25 (0.18,0.36)	0.34 (0.28,0.42)	5.20 (3.64,7.43)	1.57 (1.30,1.92)
	Hiperactiv. inducida por PCA en ratón	0.16 (0.14,0.19)	0.20 (0.15,0.29)	0.29 (0.21,0.42)	6.41 (5.51,7.47)	--
	PPI inducido por Apomorfina en ratas *	1.0 (p<0.05)	1.0 (p>0.05)	--	30.0 (p>0.05)	--
5-HT _{2A} serotonina	Sacudidas cabeza inducidas por DOI en ratón	0.08 (0.08,0.10)	0.03 (0.03,0.04)	0.56 (0.45,0.71)	0.85 (0.56,1.31)	0.13 (0.10,0.16)
α_1 adrenérgico	Letalidad inducida por Noradrenalina en ratón	0.05 (0.04,0.05)	0.12 (0.10,0.15)	3.04 (1.27,7.26)	1.34 (0.97,1.86)	5.27 (3.79,7.32)
NMDA-glutamato	Hiperactiv. inducida por MK801 en ratón	0.23 (0.22,0.25)	0.25 (0.21,0.29)	0.45 (0.31,0.67)	4.80 (3.48,6.65)	2.05 (1.77,2.38)
	Modelo, i.p.	ABA	RIS	HAL	CLZ	OLZ
D ₂ -dopamina receptor	Escalada inducida por Apomorfina en ratón	0.16 (0.04,0.82)	0.13 (0.09,0.20)	--	--	--
5-HT _{2A} serotonina	Sacudidas cabeza inducidas por DOI en ratón	0.03 (0.03,0.05)	0.01 (0.009 0.013)	--	--	--

Resultados expresados como *DI*₅₀ mg/kg (95%CI); * Resultados expresados como dosis estadísticamente significativas (p<0.05 Dunett's test vs vehículo+Apomorfina). – No determinado. ABA, Abaperidona; RIS, Risperidona; HAL, Haloperidol; CLZ, Clozapina; OLZ, Olanzapina.

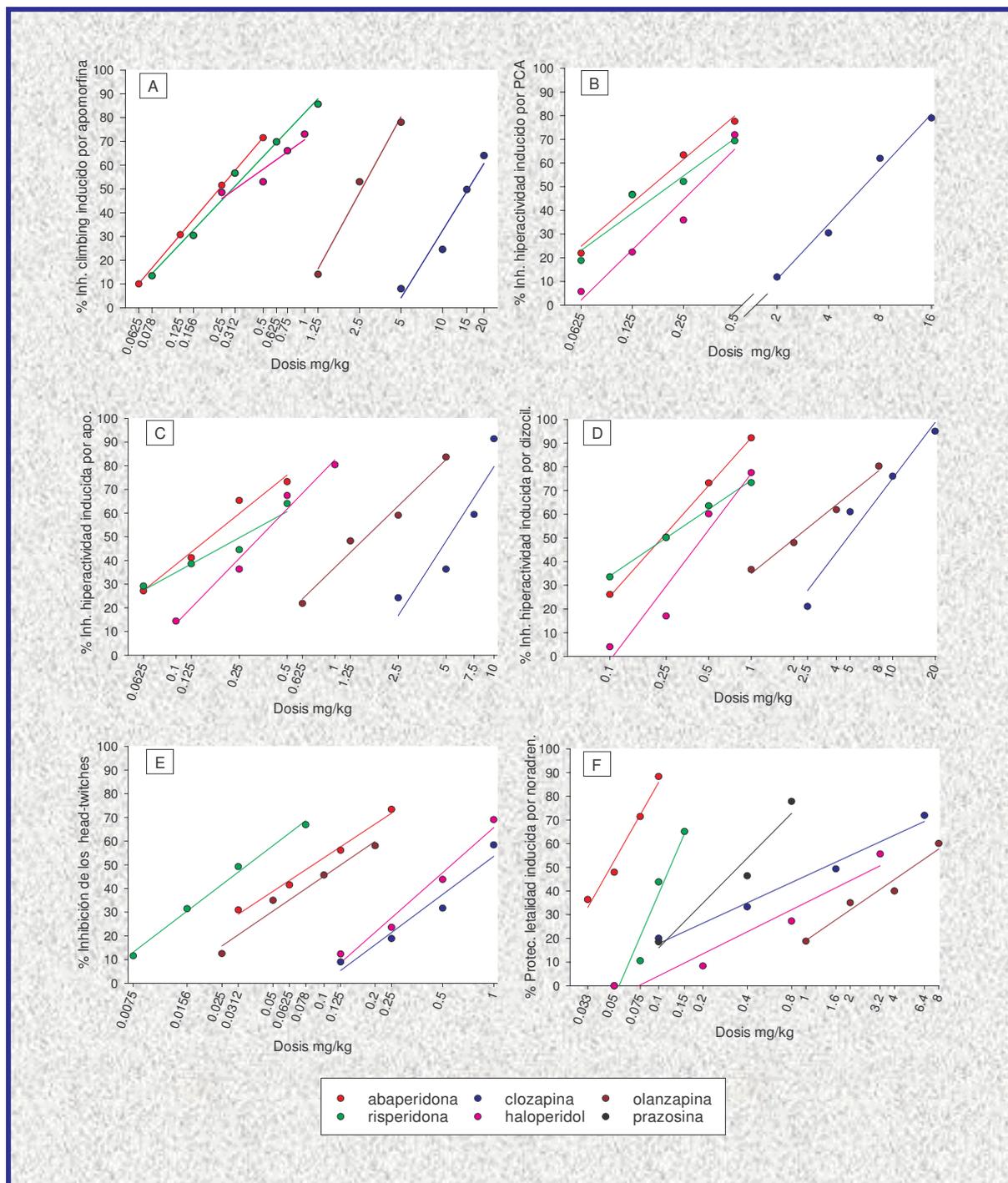


Fig. 18. Regresiones lineales del efecto de Abaperidona y los antipsicóticos de referencia, dosis única vía oral, en modelos conductuales predictivos de eficacia. A: inhibición de la escalada inducida por Apomorfina (1 mg/kg sc) en ratón. B: inhibición de la hiperactividad inducida por PCA (5 mg/kg sc) en ratón C: inhibición de la hiperactividad inducida por of Apomorfina (1 mg/kg sc) en ratón. D: inhibición de la hiperactividad inducida por MK801 (0.5 mg/kg sc) en ratón. E. inhibición de las sacudidas de cabeza inducidas por DOI (3 mg/kg ip) en ratón. F: Protección a la letalidad inducida por noradrenalina (1.25 mg/kg ev) en ratón. Los datos son porcentajes de inhibición versus el grupo control. n= 10-15 por grupo de tratamiento.

IV.3.1.1.-Mecanismos Dopaminérgicos.

Abaperidona demostró una potente actividad D₂ *in vivo*, tal como se infiere de los resultados de las cuatro pruebas realizadas: escalada, hiperactividades (Apomorfina y PCA) y déficits sensorimotores.

En primer lugar, Abaperidona inhibió potentemente el comportamiento de escalada inducida por el agonista dopaminérgico Apomorfina en todas las vías de administración estudiadas (Tabla 13, Fig. 18). Además, Abaperidona presentó un porcentaje de inhibición del comportamiento de escalada de un 90% a las 2h por vía oral, manteniéndose hasta las 4 horas posteriores a la administración de los compuestos y siendo un 20% superior al de Risperidona de forma persistente (Fig. 19).

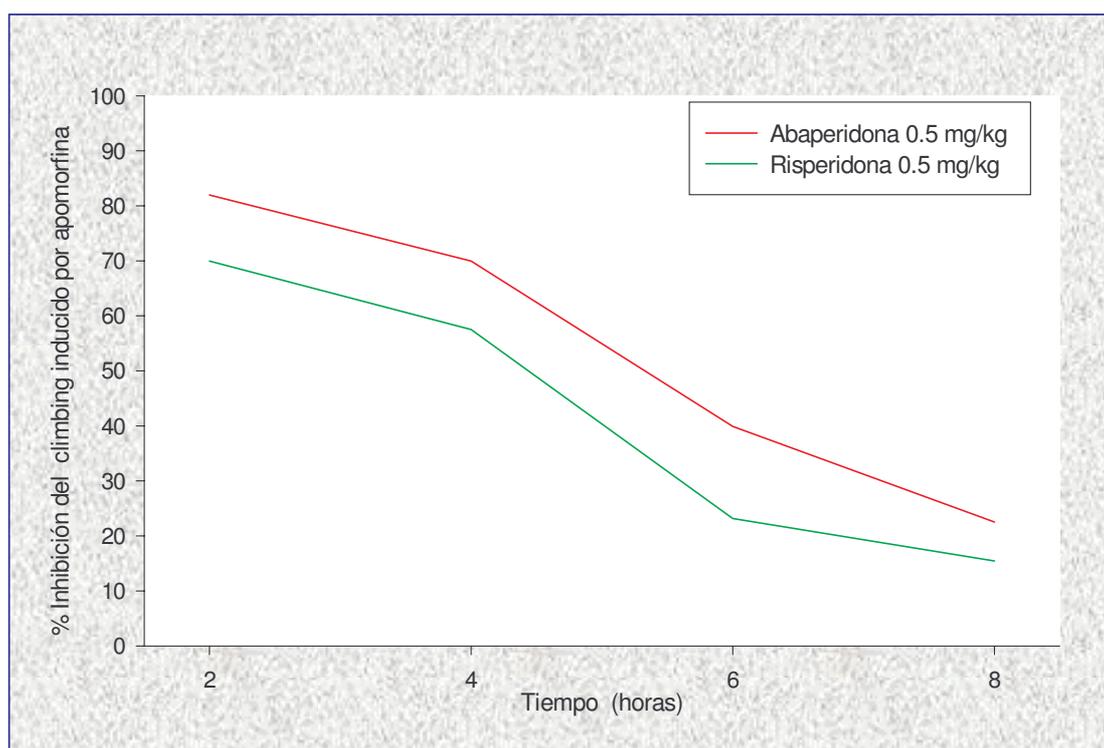


Fig. 19. Representación del efecto de Abaperidona y Risperidona, a la dosis de 0.5 mg/kg vo, sobre el comportamiento de escalada inducido por apomorfina (1 mg/Kg sc) en ratón a las 2, 4, 6 y 8 h de la administración del producto. Medias de los porcentajes de inhibición respecto al control por tiempo de valoración.

En segundo lugar, Abaperidona también inhibió potentemente la hiperactividad inducida por Apomorfina y la actividad locomotora inducida por el psicoestimulante y liberador de catecolamina, Anfetamina (Tabla 13, Fig. 18).

Los valores DI₅₀ obtenidos por Abaperidona en estos tres modelos fueron equivalentes a los obtenidos por Haloperidol y Risperidona y, al menos, de 30 a 10 veces más potentes que los obtenidos por Clozapina y Olanzapina respectivamente, ambos débiles antagonistas D₂.

Finalmente, en la prueba de los déficits sensorimotres (Tabla 13, Fig. 20 y 21), una vez comprobada la validez de la prueba ($t=7.81$, $gl=109$, $p<0.000$) y descartado el sesgo experimental ($t=0.58$, $gl=60$, $p=0.564$) por repetir el ensayo tres días seguidos, se demostró que existían diferencias entre los distintos grupos de tratamiento ($F=2.34$, $gl=6$, $p=0.039$).

Se comprobó que Abaperidona, a la dosis de 1 mg/Kg, inhibió de manera estadísticamente significativa el PPI inducido por Apomorfina ($p<0.05$ t de Dunnett), pero no Risperidona ni Clozapina ($p>0.05$). Por otro lado, ninguno de los compuestos tuvo efecto per se sobre el PPI ($F=0.66$, $gl=6$, $p=0.681$).

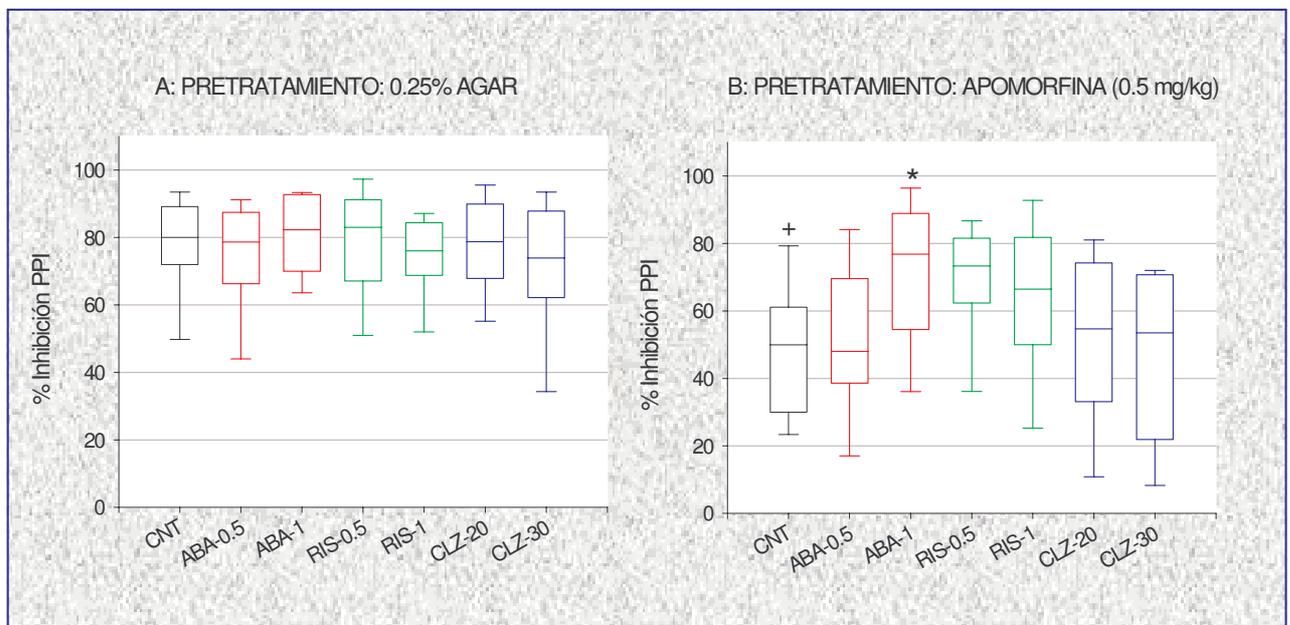


Fig. 20. Efecto de Abaperidona, Risperidona y Clozapina *vo*, sobre los déficits sensorimotres inducidos por Apomorfina (0.5 mg/Kg *sc*) en rata Wistar ($n=12$). $+p<0.05$ grupos vehículo-vehículo vs vehículo-apomorfina (*t*-Student); $*p<0.05$ grupos compuesto-apomorfina vs vehículo apomorfina (ANOVA, *t* de Dunnett).

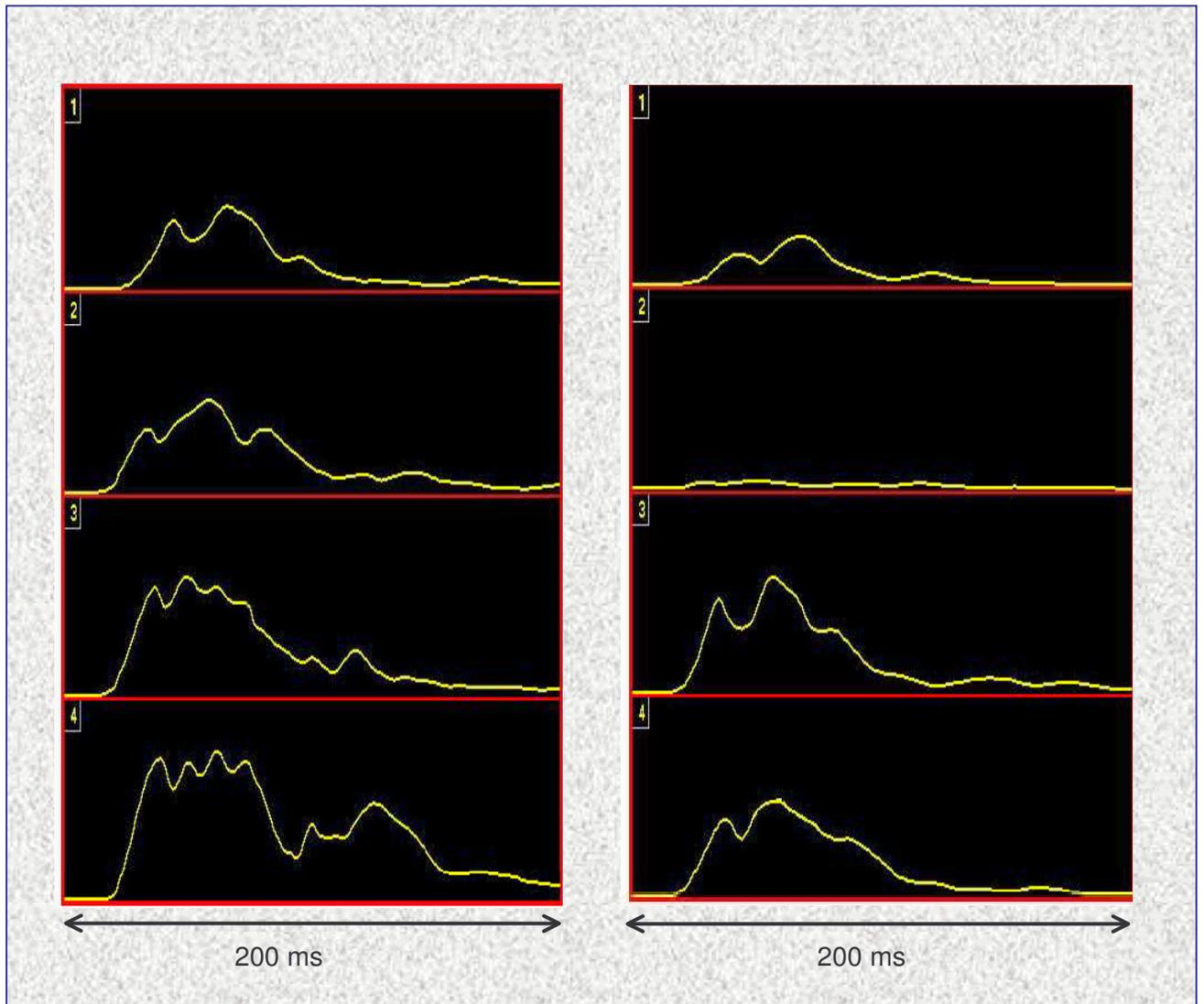


Fig. 21. Curvas representativas de la ASR de ratas Wistar administradas con distinto tratamiento: 1) Abaperidona-Apomorfina, 2) Abaperidona-vehículo, 3) vehículo-apomorfina y 4) vehículo-vehículo. Izquierda: Curvas de en un ensayo de tipo T1 (pulso). Derecha: Curvas de un ensayo de tipo T2 (prepulso+pulso).

IV.3.1.2.-Mecanismos Serotoninérgicos

Se estudió el efecto *in vivo* de Abaperidona sobre dos tipos de receptores serotoninérgicos centrales, 5-HT_{2A} y 5HT_{2C}.

La potencia con que un compuesto antagoniza las sacudidas de cabeza inducidas por DOI se correlaciona específicamente con su afinidad *in vivo* por el receptor 5-HT_{2A} (Arnt & Skarsfeldt, 1998; Barnes & Sharp, 1999). Abaperidona y Risperidona inhibieron potentemente las sacudidas de cabeza en el ratón, tanto por vía oral como por vía intraperitoneal y, en un rango de potencia 7 veces superior al de Haloperidol, aproximadamente 2 veces al de la Olanzapina y unas 10 veces al de Clozapina (Tabla 13, Fig 18). Sin embargo, este teóricamente débil bloqueo *in vivo* de Clozapina y Olanzapina volverá a tratarse en el apartado V.-Discusión.

En el modelo de la reversión a la hipolocomoción inducida por m-CPP (Fig. 22), predictivo del antagonismo *in vivo* sobre los receptores 5HT_{2C}, mayoritariamente de las áreas límbicas y estriado, se confirmó que la administración de mCPP induce una hipolocomoción estadísticamente significativa respecto a la locomoción del grupo administrado únicamente con vehículo (t=260.0, gl=25, p=0.0071). Sin embargo, el rango intercuartil de ambos grupos resultó bastante amplio.

Al comparar los grupos tratados respecto al grupo vehículo-mCPP, los resultados indicaron diferencias estadísticamente significativas en la distancia recorrida (H=22.3, gl=12, p=0.034), pero al aplicar el test a posteriori de Dunn no se pudo concretar qué grupos de tratamiento eran los causantes de estas diferencias.

Sin embargo, Abaperidona y Clozapina demostraron una buena relación dosis efecto y una tendencia clara a revertir la hipolocomoción. Los valores de distancia recorrida obtenidos por los animales tratados con la dosis de 0.0625 mg/kg de Abaperidona fueron bastante bajos, pero pudo deberse a factores externos incontrolables ya que coincidieron con días en que los valores de distancia recorrida de los animales control también fueron menores de lo habitual.

Por contra, Risperidona y en menor medida Olanzapina, demostraron una relación dosis efecto invertida, que podría explicarse por los efectos hipolocomotores que los antipsicóticos inducen per se.

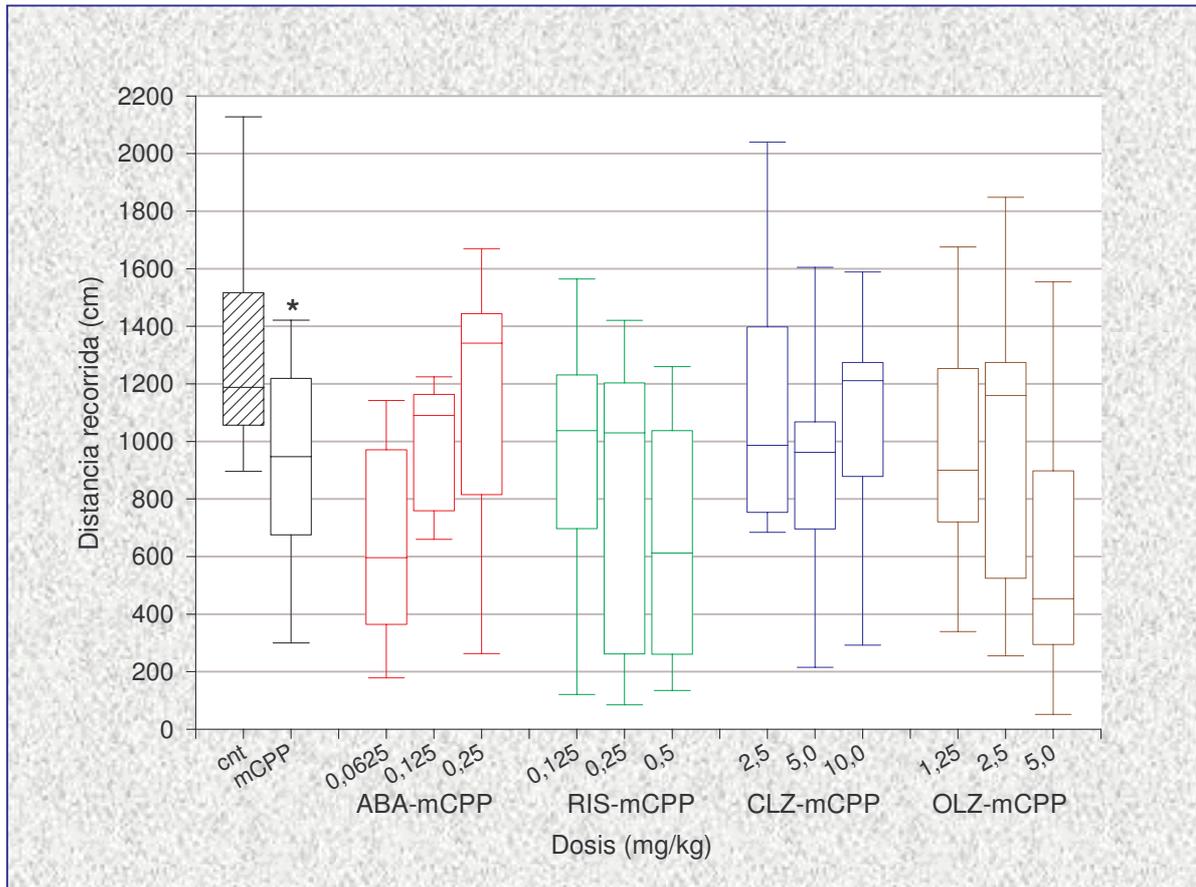


Fig. 22. Diagramas de caja del efecto de Abaperidona y los antipsicóticos atípicos de referencia (Risperidona, Clozapina y Olanzapina) sobre la distancia recorrida en la reversión a la hipocomoción inducida por m-CPP (2 mg/kg ip) en la rata. Los valores representan la mediana y percentiles 25 y 75 de la distancia recorrida (cm). Kruskal-Wallis: $H=22.3$, $gl=12$, $p=0.034$; * $p<0.05$ vs control (test de Mann-Whitney). $n=10-11$ por grupo de tratamiento.

IV.3.1.3.- Mecanismos Adrenérgicos.

El agonista α_1 noradrenalina induce letalidad en los ratones que puede ser evitada por la administración previa de un compuesto con propiedades antagonistas sobre este receptor.

Los resultados (Tabla 13 y Fig. 18) demuestran que Abaperidona ejerció un potentísimo antagonismo α_1 -adrenérgico *in vivo*, superior al ejercido sobre otros receptores centrales evaluados en este trabajo, con una DI₅₀ un rango de magnitud menor que la DI₅₀ necesaria para antagonizar los receptores D₂.

El antagonismo α_1 -adrenérgico de Abaperidona es claramente superior al de los otros compuestos evaluados, tanto antipsicóticos típicos como atípicos, e inclusive que el del antagonista α_1 -selectivo Prazosina (DI₅₀ = 0.35 mg/kg vo).

IV.3.1.4.-Mecanismos Glutamatoérgicos (receptor NMDA).

La Dizocilpina es un bloqueante del canal del receptor NMDA que induce un pronunciado incremento de la actividad locomotora. Este efecto puede inhibirse con compuestos que ejerzan una acción agonista sobre este receptor.

Abaperidona inhibió potentemente la hiperactividad inducida por Dizocilpina, demostrando su actividad agonista *in vivo* sobre el receptor NMDA (Tabla 13 y Fig 18). Esta inhibición fue de similar magnitud a la ejercida por Haloperidol y Risperidona, pero de 10 a 20 veces menos potente que la ejercida por Olanzapina y Clozapina respectivamente.

Sin embargo, Abaperidona demostró una clara tendencia a la reversión de los déficits sensorimotores inducidos por PCP en ratas Sprague-Dawley, otro agente bloqueante del canal del receptor NMDA con potente acción psicomimética (Fig. 23).

Una vez comprobada la homogeneidad de los controles (pretratamiento agar 0.25%: t=0.276, gl=28, p=0.784; pretratamiento PCP-3mg/kg: t=-0.549, gl=29, p=0.587), descartado el sesgo experimental (dosis-0.5: t=0.60, gl=11, p=0.954; dosis-1: t=-1.22, gl=17, p=0.240), y validado el método experimental (dosis-0.5: t=6.42, gl=22, p<0.000; dosis-1: t=9.54, gl=35, p<0.000), se observó que Abaperidona

demostraba una tendencia dosis-dependiente a la reversión del PPI, que a la dosis de 1 mg/kg suponía una media del 42% de reversión del PPI frente a una media del 27% de PPI inducido por el grupo vehículo-PCP. Esta tendencia a la reversión fue tan potente como la inducida por prazosina (media del PPI= 42%), antagonista α_1 -adrenérgico, y superior a la de los otros antipsicóticos atípicos evaluados a dosis farmacológicamente equipotentes (Risperidona-1: 32%; Olanzapina-7.5: 27%; Clozapina-30: 27% de PPI).

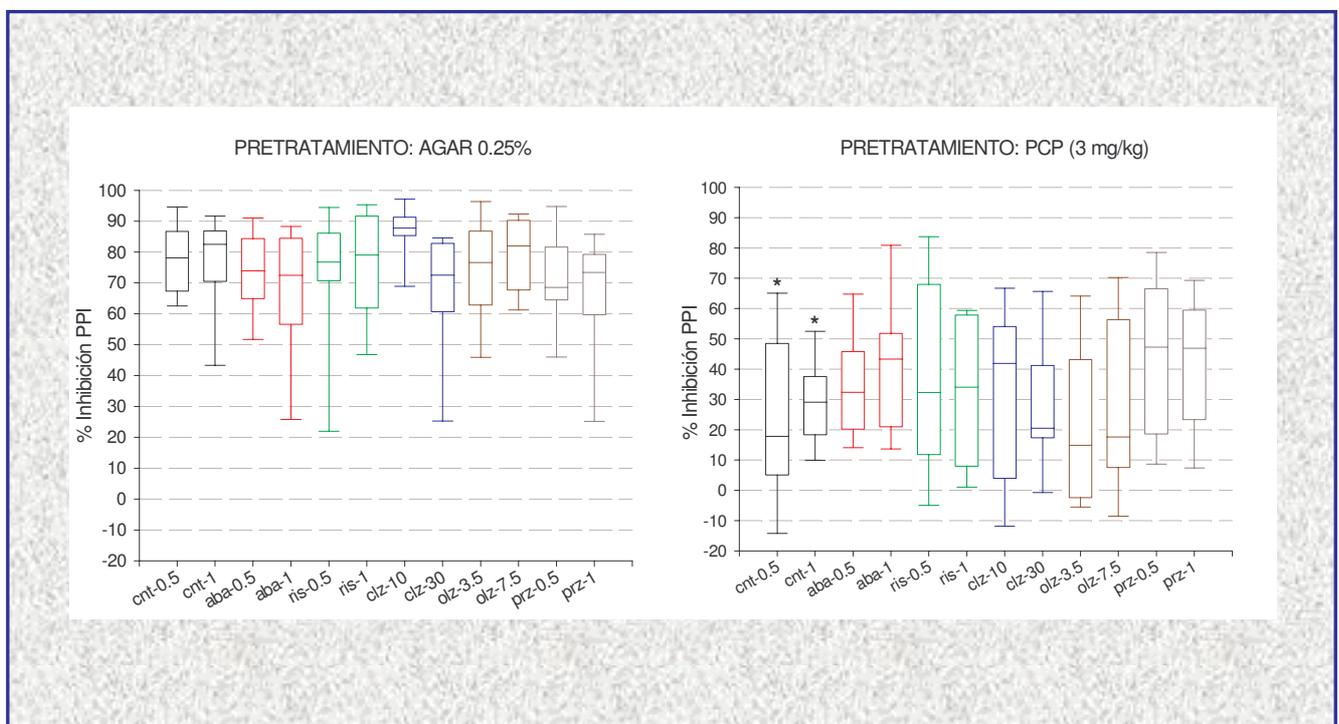


Fig. 23 .Efecto de Abaperidona (ABA), Risperidona (RIS), Clozapina (CLZ), Olanzapina (OLZ) y Prazosina (PRZ), dosis única por vía oral, sobre los déficits sensorimotrices inducidos por Fenciclidina (PCP) (3 mg/Kg sc) en rata Sprague-Dawley (n=12-16). * $p < 0.05$ grupo vehículo-vehículo vs vehículo-PCP (t-Student).

IV.3.2.- Resultados de modelos predictivos de efectos secundarios relacionados con el mecanismo de acción.

Se realizaron modelos considerados predictivos de los efectos secundarios más frecuentes, propios del uso clínico de estos compuestos -efectos extrapiramidales (EPS) y motores debidos a la activación de determinadas vías dopaminérgicas, efectos neuroendocrinos, sedación y efectos anticolinérgicos- destinados a evaluar el margen terapéutico de Abaperidona.HCl comparativamente a los compuestos de referencia.

Los principales resultados se resumen en la tabla 14 y la figura 24.

Tabla 14. Modelos conductuales predictivos de efectos secundarios relacionados con el mecanismo de acción.

Sistema	Modelo	ABA	RIS	HAL	CLZ	OLZ
Sistema Nigroestriado	Inducción Catalepsia en ratas	8.48 (7.05,10.2)	5.06 (4.10,6.25)	1.95 (1.30,2.91)	>120.0 (--)	20.13 (6.90,58.6)
Vías Motoras	Actividad Motora Espontánea en ratas	2.99 (2.07,4.31)	0.77 (0.46,1.28)	0.84 (0.38,1.80)	19.30 (11.3,32.7)	--
D ₂ dopamina	Estereotipia inducida Apomorfina en ratas	18.40 (15.5,22.0)	9.70 (8.96,10.6)	1.47 (1.14,1.89)	>100.0 (--)	11.37 (10.9,11.9)
	Estereotipia inducida d-Anfetamina en ratas	5.10 (1.76,14.8)	2.21 (1.95,2.51)	0.43 (0.12,1.55)	136.6 (2.83,>600)	8.63 (2.25,33.2)
D ₁ dopamina	Aseo inducido por SKF 38393 en ratón	0.31 (0.25,0.39)	0.41 (0.36,0.47)	0.28 (0.20,0.39)	0.33 (0.28,0.39)	0.44 (0.43,0.45)
Muscarínico	Letalidad inducida Fisosostigmina en ratón	>8.0 (--)	>8.0 (--)	>8.0 (--)	5.59 (2.80,11.0)	1.72 (0.73,4.06)

Los resultados se expresan como DI_{50} mg/kg v.o. (95%CI); – No determinado. ABA, Abaperidona; RIS, Risperidona; HAL, Haloperidol; CLZ, Clozapina; OLZ, Olanzapina.

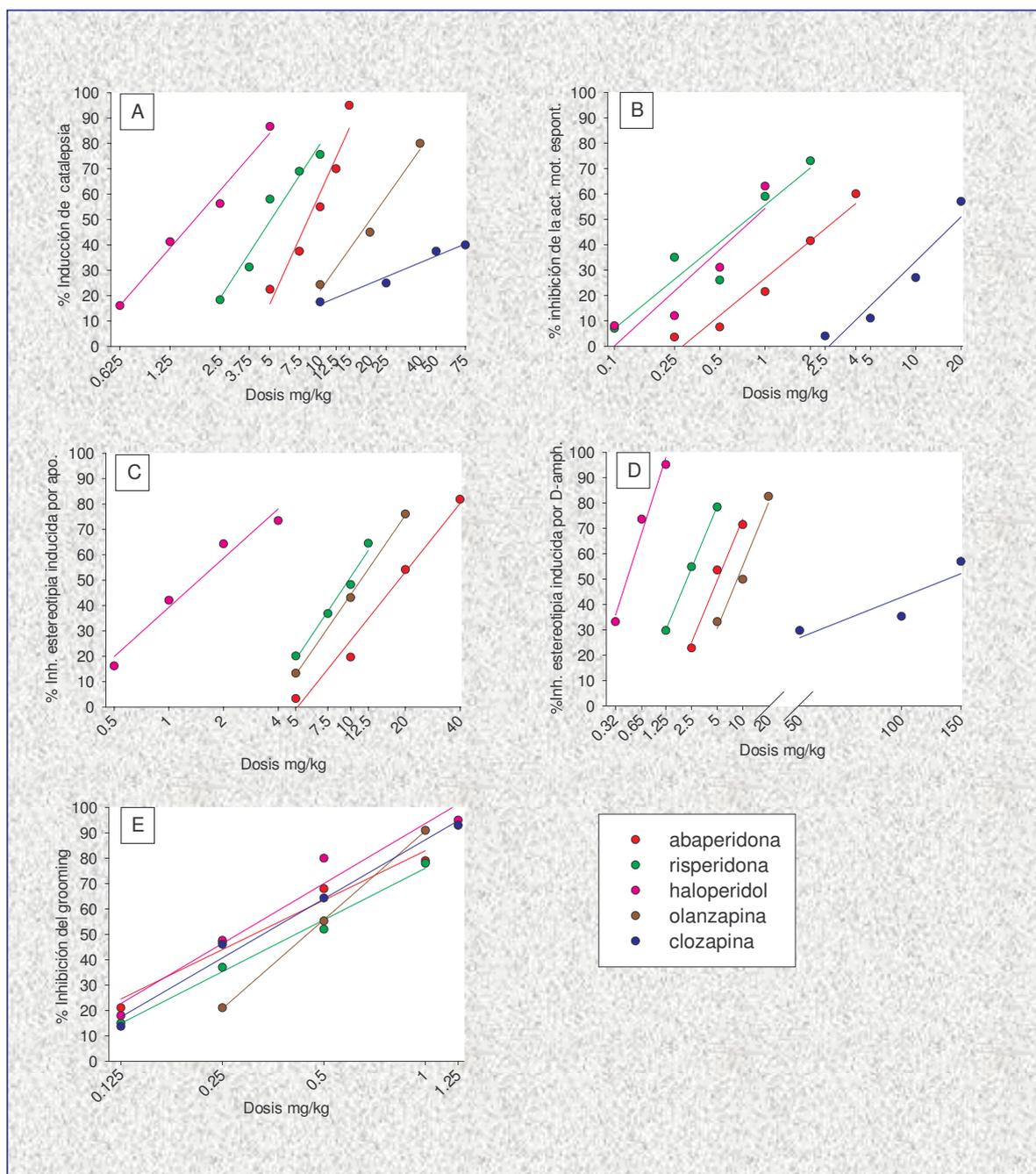


Fig. 24. Regresión lineal de los efectos de Abaperidona y los antipsicóticos de referencia, dosis única vía oral, en modelos predictivos de efectos secundarios relacionados con el mecanismo de acción. A: Inducción de catalepsia en ratas. B: inhibición de la actividad motora espontánea en ratas. C: inhibición de la estereotipia inducida por Apomorfina (1.5 mg/kg sc) en ratas. Clozapina no está representada porque la inhibición a la dosis de 100 mg/kg era inferior al 50%. D: inhibición de la estereotipia inducida por d-Anfetamina (3 mg/kg sc) en ratas. E: inhibición del aseo inducido por SKF 38393 (2.5 mg/kg ip) en ratón. Los datos son porcentajes de inhibición versus el grupo control. n= 10-15 por grupo de tratamiento.

IV.3.2.1-Modelos de EPS y otros efectos motores

Existen distintos modelos predictivos de la incidencia de EPS: la catalepsia - debida al bloqueo de los receptores dopaminérgicos postsinápticos en la vía nigroestriada, particularmente la región ventro-rostral y sustancia negra- y las estereotipias inducidas por distintos agonistas dopaminérgicos -indicativas del bloqueo específico de los receptores D₂ en la misma área.

Abaperidona demostró una débil inducción de catalepsia en las ratas, en cualquiera de las vías de administración estudiadas (Tabla 14, fig. 24 y fig. 25), siendo en la vía oral entre 2 y 4 veces menos potente que la inducción ejercida por Risperidona y Haloperidol respectivamente.

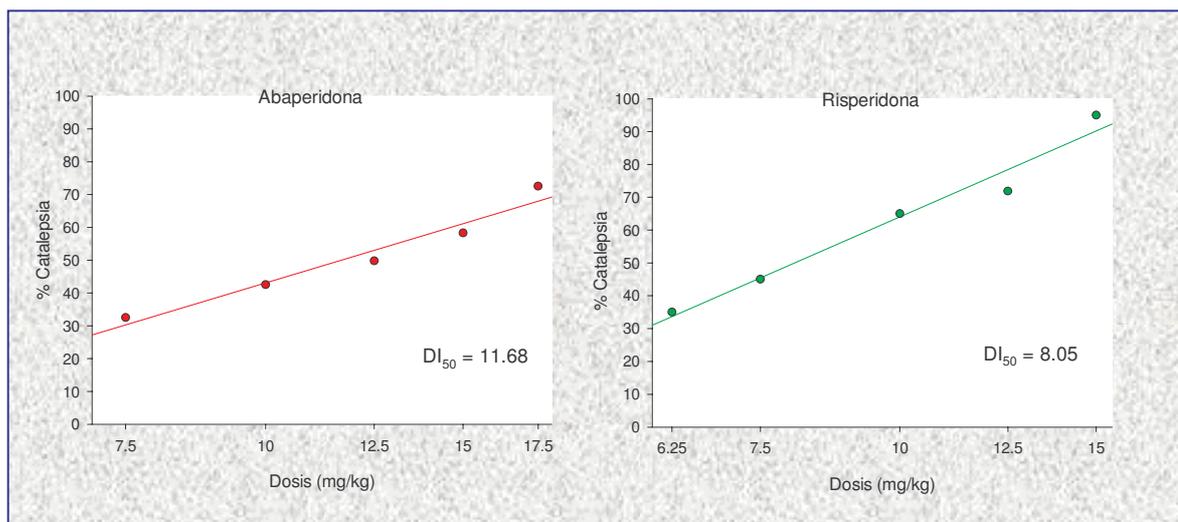


Fig. 25. Regresión lineal de la inducción de catalepsia en rata de Abaperidona y Risperidona por vía intraperitoneal. Los números representan porcentaje de catalepsia respecto a la máxima puntuación posible. n=10-15 ratas.

Así mismo, durante todo el estudio subagudo (Fig. 26), Abaperidona mantuvo una actividad similar a los animales control, con una inducción de catalepsia claramente inferior que las dos dosis de Risperidona y sobre todo Haloperidol. Por otro lado, el porcentaje de catalepsia de Abaperidona a partir de la segunda semana, fue ligeramente inferior (<10% en todos los días) que el porcentaje obtenido en los primeros días (10-20%).

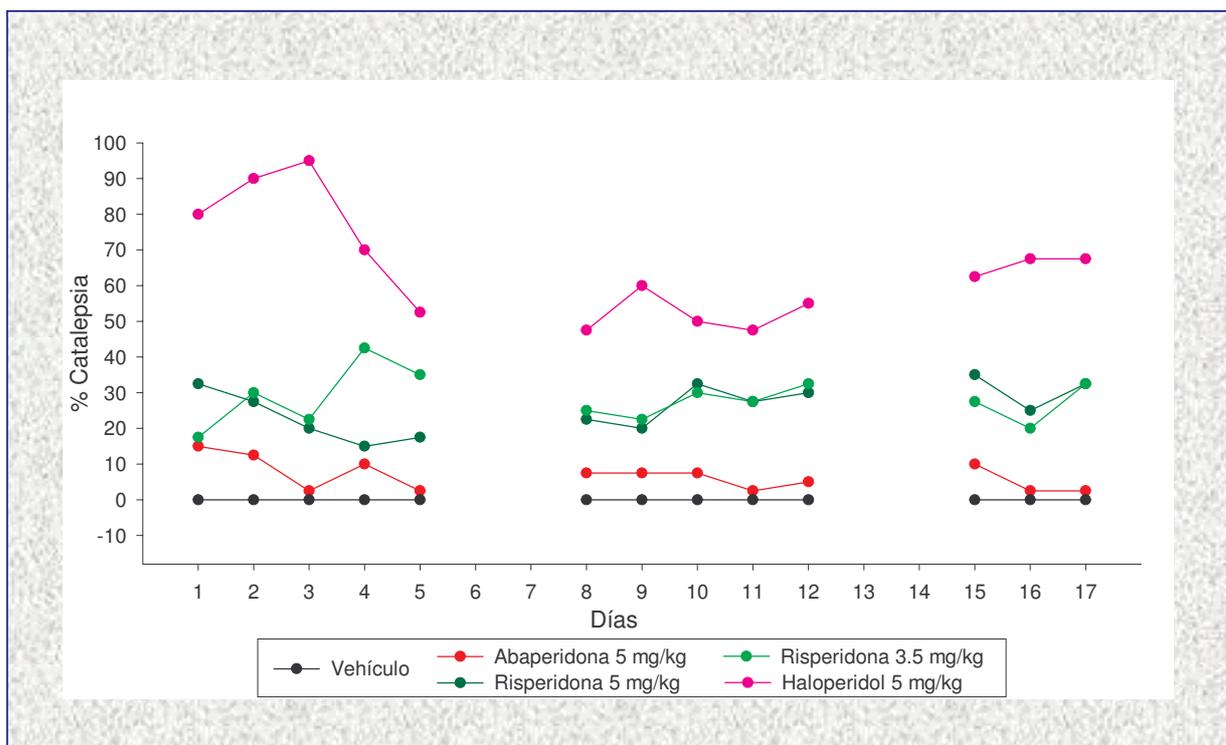


Fig. 26 Efecto de Abaperidona y los antipsicóticos de referencia en la inducción de la catalepsia en rata, vía oral, en dosis repetida durante 17 días. Porcentaje de catalepsia por grupo de tratamiento y día. La representación del grupo control es la media de los dos grupos controles.

Este proceso no se observó en ninguna de las dos dosis de Risperidona estudiadas. Se obtuvieron porcentajes de catalepsia entre el 20-40% a lo largo de los 17 días y picos ocasionales del 50%. El grupo de Risperidona dosis de 3.125 mg/kg, con su correspondiente control, se estudió con posterioridad. El motivo fue ajustar la dosis de Risperidona del estudio subagudo a 1.6 veces inferior que la DE₅₀ obtenida

en el estudio agudo de esta prueba, y que por lo tanto fuera equivalente a la dosis de 5 mg/kg estudiada para Abaperidona, la cual mantenía esta proporción con su respectiva DE₅₀ del estudio agudo. No se consideró necesario repetir otra dosis de Haloperidol ya que es un antipsicótico típico y el interés principal radicaba en el efecto de Abaperidona como antipsicótico atípico.

Además, se utilizaron animales control, administrados con vehículo, como patrón negativo, primero para descartar un posible proceso de habituación en los animales durante la prueba y segundo para permitir un control de peso comparativo con los animales tratados (debido a que la catalepsia es una prueba que se basa en la inmovilidad, servía para descartar si el tratamiento subagudo afectaba a funciones normales del animal). Se comprobó que no existía una aparición de catalepsia debida a la habituación y, realizados los cálculos, se obtuvo que el tratamiento no afectaba al incremento de peso de estos animales ($F = 0.0813$, 3 gl, $p = 0.969$ para el primer estudio y $t = 1.83$, 7 gl, $p = 0.110$ para el grupo de Risperidona 3.125 mg/kg).

Esta prometedora escasa inducción de EPS de Abaperidona sugerida por la catalepsia, se corroboró con los estudios de la estereotipia inducida por Apomorfina o Anfentamina en rata y con los estudios de inhibición del autoaseo inducido por SKF-38393 en ratón (Tabla 14 y fig 24).

En el primer caso, Abaperidona demostró una débil inhibición de la estereotipia inducida, 2 veces menor que Risperidona, 12 veces menor que Haloperidol y sorprendentemente, 1.6 veces menor que la inhibición ejercida por Olanzapina en la estereotipia inducida por Apomorfina.

En el segundo caso, Abaperidona demostró un antagonismo *in vivo* sobre el receptor D₁, al inhibir el autoaseo (grooming) inducido por SKF-38393 en el ratón, en el mismo rango de potencia que los demás antipsicóticos evaluados.

Finalmente, Abaperidona demostró inducir una menor sedación o hipolocomoción que los antipsicóticos de referencia (Tabla 14 y Fig. 27).

Tras constatar que los resultados de los grupos control fueron homogéneos ($H = 16.6$, gl=17, $p = 0.483$), se comprobó que las primeras dosis que presentaron una disminución significativa de la actividad motora fueron Haloperidol a 0.5 mg/Kg ($U = 139.0$, $p = 0.011$) y Risperidona a 1 mg/Kg ($U = 138.0$, $p = 0.014$), mientras que en

Abaperidona fue a los 2 mg/kg (U=143.0, p=0.005) y Clozapina a los 10 mg/Kg (U=140.0, p=0.009).

Además, al calcularse la DI₅₀ de estos compuestos sobre la actividad motora espontánea, las diferencias entre ellos se acentúan, distanciándose Abaperidona de Risperidona y Haloperidol.

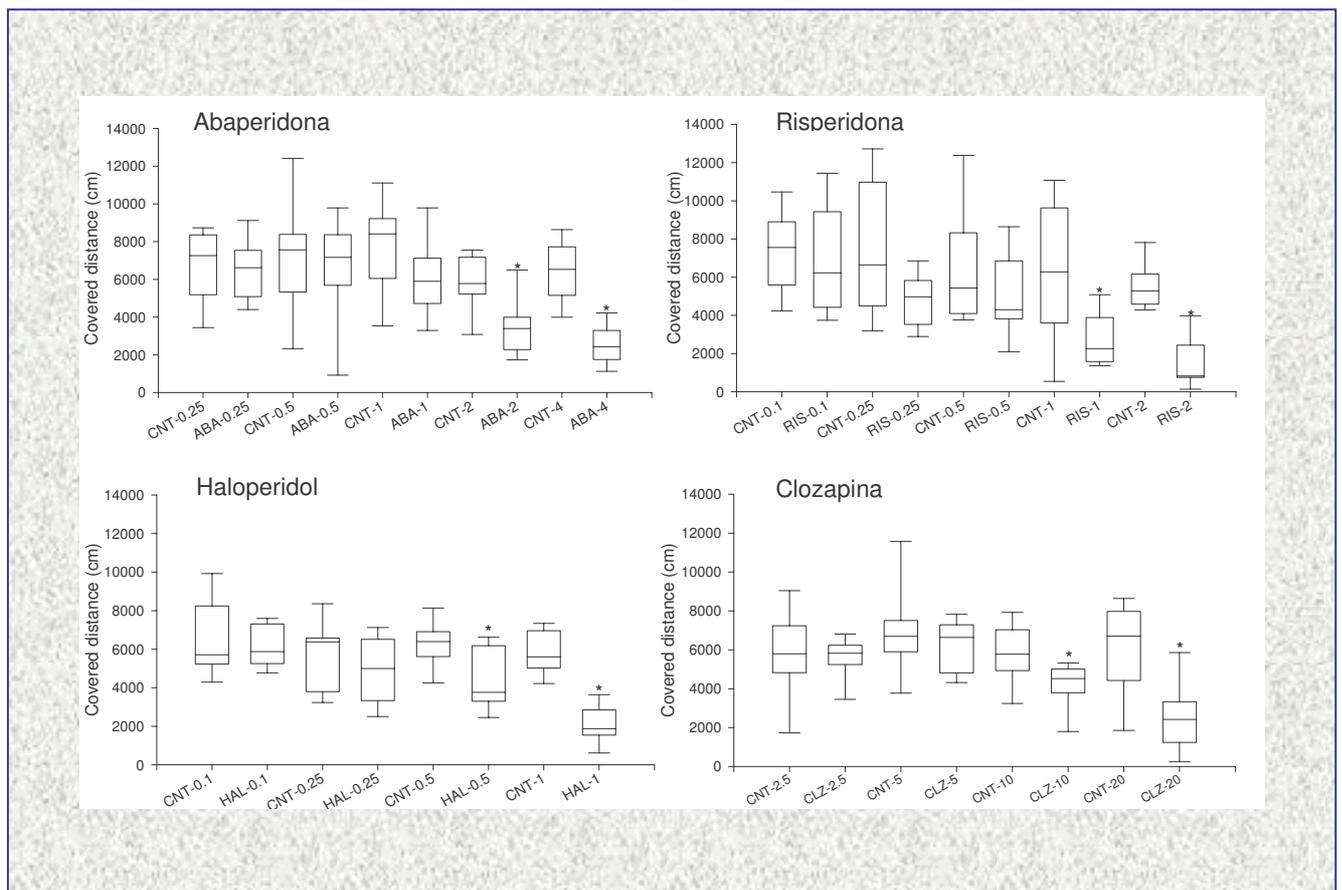


Fig. 27. Diagramas de caja del efecto de Abaperidona y los antipsicóticos de referencia, dosis única, vía oral, sobre la actividad motora espontánea. Los valores representan distancia recorrida (cm). * $p < 0.05$ vs vehículo correspondiente (U de Mann-Whitney). $n = 10-12$ ratas por grupo. CNT, vehículo; ABA, Abaperidona; RIS, Risperidona; HAL, Haloperidol; CLZ, Clozapina.

IV.3.2.2.- Modelos predictivos de efectos anticolinérgicos

Está descrito que el bloqueo de los receptores muscarínicos contribuye a la aparición de efectos secundarios autonómicos y cardiovasculares, por lo que se evaluó el efecto de Abaperidona en el test de la letalidad inducida por Fisostigmina (inhibidor de la acetil colina esterasa) en ratón.

No se detectaron efectos anticolinérgicos *in vivo* aparentes tras la administración de Abaperidona ni Risperidona, en ninguna de las dos dosis probadas de 4 y 8 mg/kg (Tabla 14 y Fig 24). Considerando la dosis necesaria para inducir efectos antipsicóticos, estas dos dosis representan un margen de seguridad suficiente, por lo que no se continuó evaluando a dosis superiores.

Por el contrario, Clozapina y Olanzapina mostraron un potente antagonismo a los receptores muscarínicos.

IV.4.- Resultados de efectos neuroendocrinos y cardiovasculares relacionados con el mecanismo de acción.

IV.4.1.- Efectos neuroendocrinos

Se evaluó el incremento de niveles de prolactina en suero de rata, inducido por los compuestos Abaperidona, Risperidona y Haloperidol, dosis de 5 mg/Kg por vía oral, a las 3 h tras administración única o de tres días acumulados (Fig. 28).

En ambos casos, todos los compuestos indujeron un incremento de prolactina estadísticamente significativo respecto a los animales control (dosis única: $F= 33.6$, $gl=3$, $p<0.0001$; tres días: $F= 76.4$, $gl=3$, $p<0.0001$).

Sin embargo, el incremento de prolactina inducido por Abaperidona fue significativamente menor que el producido por los antipsicóticos de referencia Haloperidol y Risperidona, tanto en dosis única (Bonferroni: diferencia medias vs Haloperidol=18.0, $t=3.42$, $p<0.05$; diferencia medias vs Risperidona=20.0, $t=3.80$, $p<0.05$) como en dosis acumulada de tres días (Bonferroni: diferencia medias vs Haloperidol=39.0, $t=7.72$, $p<0.05$; diferencia de medias vs Risperidona=21.5, $t=4.26$, $p<0.05$).

Por el contrario, Risperidona únicamente se diferencia de Haloperidol en el tratamiento de tres días (Bonferroni: dosis única: diferencia medias vs Haloperidol=-2.0, $t=-0.38$, $p>0.05$; tres días: diferencia de medias vs Haloperidol=17.5, $t=3.47$, $p<0.05$).

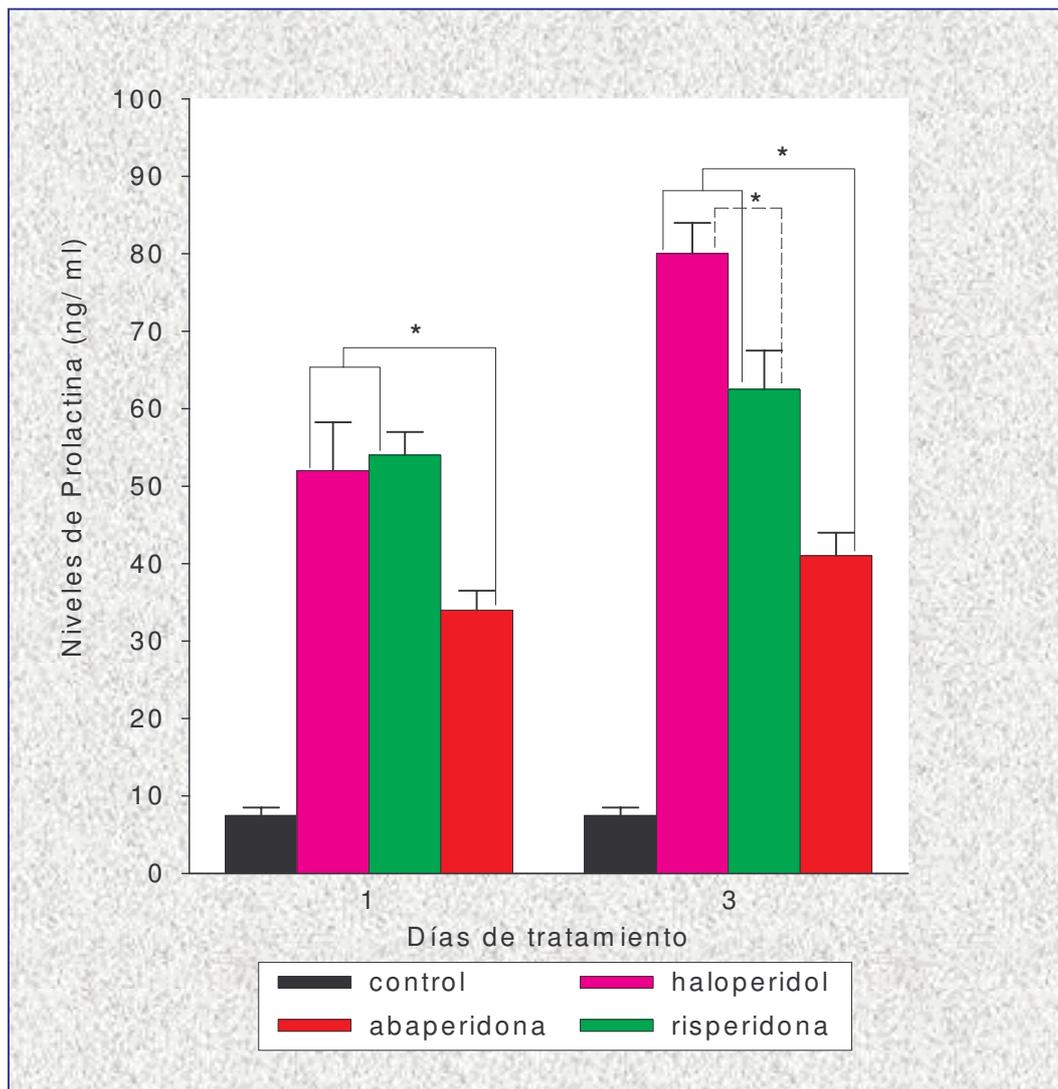


Fig. 28. Niveles de prolactina en suero (mg/ml) 3 h después de la administración oral de Abaperidona, Risperidona o Haloperidol (5 mg/kg/día), 1 o 3 días consecutivos en rata. Los valores representan la media \pm error estandar ($n= 5$ animals). $p<0.05$ todos los tratamientos vs control en ambas administraciones (no señalado), * $p<0.05$ diferencias entre tratamientos (Bonferroni's post-hoc test).

IV.4.2.- Efectos sobre los parámetros cardiovasculares *in vivo*.

En el estudio vía oral se encontraron diferencias de PAM y FC estadísticamente significativas ($p < 0.01$) de los grupos tratados respecto al grupo control (Fig. 29). Sin embargo, Abaperidona no afectó a la presión arterial en ninguna dosis y sólo se observó una suave taquicardia a la dosis de 1 mg/Kg, que únicamente fue estadísticamente significativa a la dosis de 3 mg/Kg (15 min y 2 h tras la administración).

Por el contrario, Risperidona y Clozapina indujeron un decremento significativo, monofásico y dosis dependiente, de la presión sanguínea desde las dosis de 1 y 30 mg/Kg respectivamente. Este decremento fue acompañado de taquicardia severa reactiva, que en el caso de Clozapina duró unos 30 min a los 30mg/Kg ($p < 0.05$) y unas 2 horas a los 100 mg/Kg ($p < 0.05$). Además, Clozapina, a la dosis de 100 mg/Kg provocó una segunda fase de hipotensión a las 2 h de la administración ($p < 0.01$), aunque sin taquicardia.

Es más, cuando Abaperidona fue administrada por vía endovenosa (Fig. 30), únicamente se observó una taquicardia transitoria ($p < 0.05$ a 0.3 mg/kg durante 45 min), y no se observó hipotensión ni a la dosis de 0.1 ni 0.3 mg/kg. La presión sólo descendió significativamente ($p < 0.05$) en la dosis de 1 mg/kg a los 30 min. Contrariamente, los animales tratados con Prazosin presentaron un descenso claro y prolongado de la presión ($p < 0.05$ a 0.3 mg/kg durante 5 h) y un incremento de la frecuencia cardíaca significativo ($p < 0.05$ a 0.1 mg/kg durante 30 min y $p < 0.05$ a 0.3 mg/kg durante 4 h).

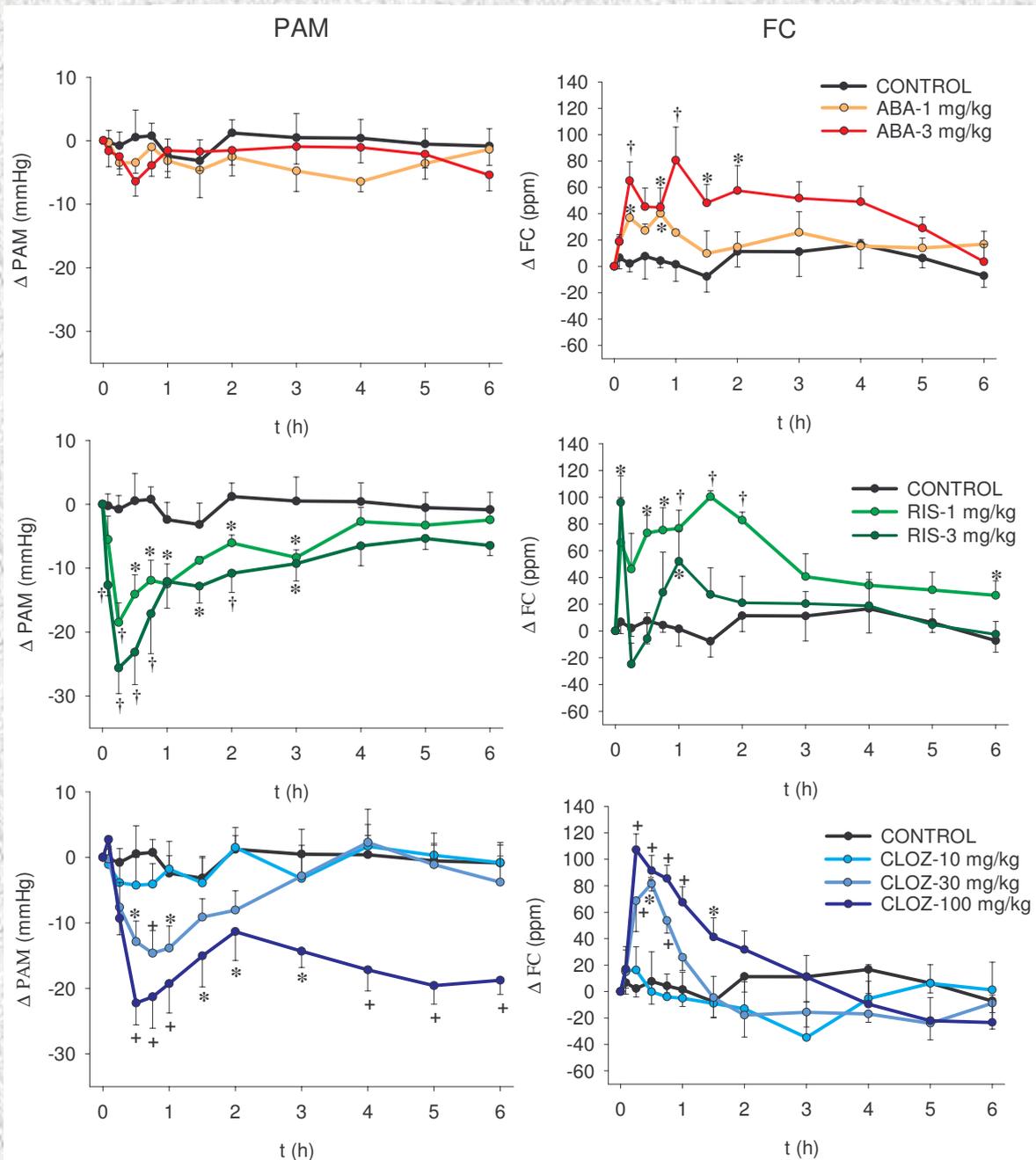


Fig. 29. Cambios en la presión arterial media y frecuencia cardiaca (PAM y FC) tras administración única, por vía oral, de Abaperidon-HCl (ABA), Risperidona (RIS) y Clozapina (CLZ) en rata consciente. Los valores representan la media ± error estandar de 5 animales. *p<0.05 y +p<0.01 vs grupo control (ANOVA, Dunnett's post hoc test).

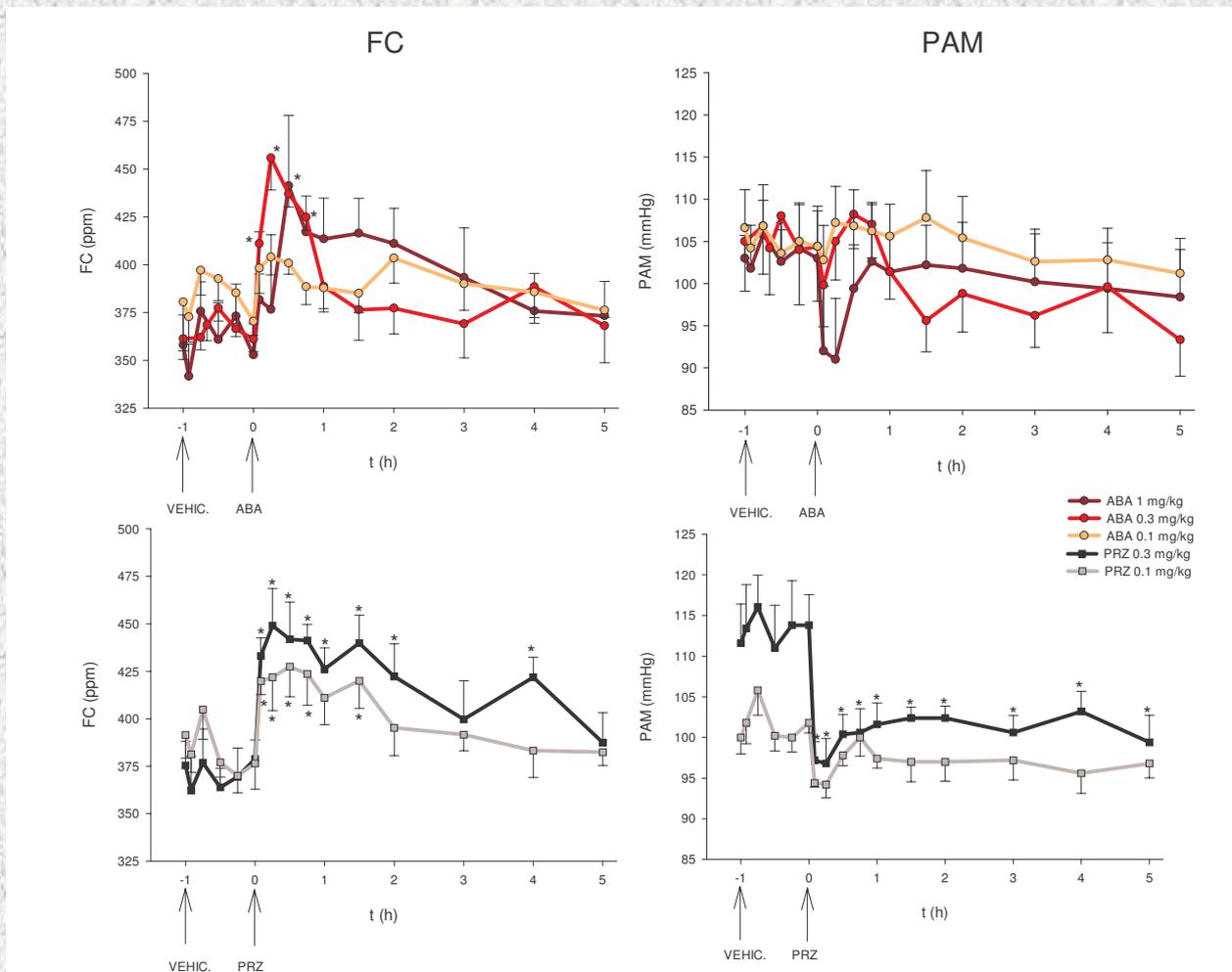


Fig. 30. Cambios en la frecuencia cardíaca y presión arterial media (FC y PAM) tras administración endovenosa de Abaperidona (ABA) o Prazosina (PRZ) en rata consciente. Los valores representan la media \pm error estandar de 5 animales. * $p < 0.05$ vs valores basales (ANOVA de medidas repetidas).

V.- DISCUSIÓN

V.- DISCUSIÓN

Abaperidona ha demostrado una potente afinidad por varios receptores cerebrales centrales (α_1 , 5-HT_{2A}, D₂, 5-HT_{2C} y H₁) en los estudios de radioligando. Estos datos se han corroborado mediante los estudios funcionales y los estudios conductuales *in vivo* realizados, confirmando que es un compuesto con actividad multireceptorial. Dado que está descrito que un perfil multireceptorial proporciona actividad antipsicótica con escasa inducción de efectos secundarios (Meltzer 1999; Kapur et al., 1999; Sawa & Snyder, 2002), los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que Abaperidona puede ser un buen candidato para el tratamiento de la esquizofrenia.

Abaperidona demuestra un ratio 5HT_{2A}/D₂ realmente interesante (tabla 15), y concordante tanto en los ensayos *in vitro* como los estudios *in vivo*. Este ratio de Abaperidona, superior a 1 si se calcula a partir de las pKi (-log(K_i)) o inferior a 1 si se infiere directamente de las K_i o DI₅₀, es equivalente al mostrado por los otros antipsicóticos atípicos Clozapina y Risperidona, de acuerdo con la hipótesis de Meltzer et al. (1989).

Además, Abaperidona demuestra el menor potencial cataleptogénico (mayor ratio EPS) de todos los compuestos evaluados en este trabajo (Tabla 15).

Por otro lado, Abaperidona ejerce mayor antagonismo α_1 que Risperidona y Haloperidol, pero relacionado respecto a sus respectivas afinidades por el receptor D₂, se obtiene un ratio de actividad α_1 entre el ratio de Risperidona y equivalente al obtenido por Clozapina (Tabla 15).

Desglosando este resumen de actividades e interrelaciones, se discutirá la importancia de los resultados obtenidos a nivel dopaminérgico, serotoninérgico, α -adrenérgico, efectos secundarios y las posibles extrapolaciones a clínica.

Tabla 15. Ratios de actividad *in vitro* e *in vivo* entre distintos receptores.

	RATIO	ENSAYOS DE AFINIDAD				ESTUDIOS CONDUCTUALES			
		ABA	HAL	RIS	CLZ	ABA	HAL	RIS	CLZ
Atipicidad	5-HT _{2A} / D ₂	0.20	7.50	0.05	0.03 [#]	0.33	1.81	0.10	0.06
	pKi 5-HT _{2A} / pKi D ₂	1.09	0.89	1.17	1.25 [#]	--	--	--	--
Selectividad DA-NA	α_1 / D ₂	0.18	--	0.84	0.22	0.21	9.81	0.41	0.09
Selectividad Adrenérgica	α_2 / α_1	107	--	3	5	--	--	--	--
Ratio EPS		--	--	--	--	35.3	6.3	17.5	>7.9*

[#] Dato bibliográfico, afinidad de clozapina por receptor 5HT_{2A} K_i= 9.6 nM (Schotte et al., 1996). Cálculo pKi=-log Ki. Ratio de atipicidad *in vivo*: DI₅₀ head-twitches / DI₅₀ climbing; ratio selectividad dopamina vs noradrenalina *in vivo*: DI₅₀ letalidad Noradrenalina / DI₅₀ climbing. Ratio EPS: DE₅₀ catalepsia / DI₅₀ climbing.. *Dato extrapolado de la catalepsia inducida por Clozapina. – No determinado. ABA, Abaperidona; RIS, Risperidona; HAL, Haloperidol; CLZ, Clozapina; DA, dopamina; NA, noradrenalina.

Abaperidona, ha demostrado una elevada afinidad por el receptor D₂ y un potentísimo antagonismo en distintos modelos animales validados, predictivos de eficacia antipsicótica. Abaperidona, podría contribuir a paliar los síntomas positivos de la esquizofrenia, ya que el antagonismo al receptor D₂ se ha correlacionado positivamente con mejoras clínicas de esta sintomatología (Peroutka & Snyder, 1980; Wadenberg et al, 2001b).

Los datos obtenidos, tanto en los modelos de eficacia relacionados con mecanismos dopaminérgicos, como de efectos adversos, sugieren que el antagonismo D₂ ejercido por Abaperidona tiene lugar preferentemente en las vías dopaminérgicas mesolímbicas y mesocorticales, ambas relacionadas con el efecto antipsicótico de estos fármacos (Arnt & Skarsfeldt, 1998; Millan et al, 2000; Sawa & Snyder, 2002).

Primero, los resultados de eficacia *in vivo* obtenidos en la prueba del comportamiento de escalada y en las hiperactividades inducidas por agonistas dopaminérgicos, sugieren que Abaperidona inhibiría potentemente la población de receptores D₂ de las áreas límbicas cerebrales (Protais, 1976; Arnt & Skarsfeldt, 1998).

Más importante, los resultados del paradigma de la reversión de los déficits sensorimotrices inducidos por apomorfina, corroboran los anteriores. Abaperidona revertió de manera estadísticamente significativa los déficits inducidos por apomorfina, sin demostrar un efecto *per se*, al igual que tampoco los demostraron Risperidona ni Clozapina, de acuerdo con lo publicado por otros grupos (Depoortere et al., 1997a). Este paradigma es el único modelo animal que tiene un modelo equivalente en clínica, habiéndose demostrado déficits sensorimotrices dramáticos en pacientes esquizofrénicos, por lo que resultados favorables en esta prueba se consideran un potente índice predictivo de actividad antipsicótica en clínica (Braff et al., 1978; Braff & Meyer, 1990; Geyer 1998).

Segundo, los resultados *ex-vivo* demuestran una menor regulación ascendente de receptores D₂ en el estriado en los animales tratados con Abaperidona que con Risperidona y Haloperidol, a similar afinidad *in vitro* por dicho receptor demostrada por los tres compuestos.

Tercero, la dosis que induce catalepsia o inhibe las estereotipias inducidas por agonistas dopaminérgicos, relacionadas con la actividad dopaminérgica en la vía nigroestriada, respecto a la dosis que induce actividad antipsicótica, representa un margen claramente más amplio para Abaperidona que para Risperidona y Haloperidol. Estos datos son corroborados por estudios de otros grupos en que se demuestra que Risperidona induce catalepsia en rata (Grimm & See, 1998), aunque menor que Haloperidol. En estudios subagudos de catalepsia (17 días), Abaperidona a diferencia de Risperidona y Haloperidol, no muestra un efecto acumulativo y el porcentaje de catalepsia es siempre menor que el de los otros dos compuestos, a pesar de que se ha descrito que la administración continua de antipsicóticos induce tolerancia en la catalepsia en rata (Kruzich & See, 2000).

Cuarto, el aumento de los niveles de prolactina en suero inducido por Abaperidona, relacionado con la actividad sobre la vía dopaminérgica tuberoinfundibular, es significativamente menor que los incrementos inducidos por Risperidona y Haloperidol, tanto a 1 como a 3 días de administración, inclusive habiendo utilizado una dosis de compuesto subtoxicológica. Los resultados de la elevada prolactinemia inducida por Risperidona, llegando a detectarse en el 65% de los pacientes tratados con este antipsicótico atípico, están ampliamente descritos en la literatura (Casey, 1997; Richelson & Souder, 2000; Brunelleschi et al 2003).

Finalmente, la afinidad de Abaperidona por otros receptores dopaminérgicos, D₁ y D₃, es igual o superior respectivamente, que su afinidad por el receptor D₂ :

Estudios *postmortem* demuestran una sobreexpresión de receptores D₃ en los cerebros de esquizofrénicos no tratados mientras que los niveles son normales en pacientes tratados y, estudios de asociación genética, correlacionan positivamente polimorfismos del gen que codifica este receptor con la susceptibilidad a la esquizofrenia (Gurevich et al., 1997; Dubertret et al., 1998). Además, este receptor está localizado casi exclusivamente en el sistema límbico, con origen en el área ventral-tegmental (VTA) y con proyecciones al núcleo accumbens y área cortical con implicación en numerosos comportamientos, mayoritariamente la modulación de la actividad motora y el sistema de recompensa (Levant, 1997).

Todos los antipsicóticos atípicos se unen con elevada afinidad al receptor D₃. La administración aguda de estos compuestos induce un aumento significativo de los niveles extracelulares de dopamina, noradrenalina y acetilcolina. Por ello se ha relacionado el antagonismo a este receptor con la eficacia antipsicótica (Schwartz et al, 2000; Leriche et al., 2003; Lacroix et al., 2003), lo que estaría en consonancia con la potente eficacia preclínica demostrada por Abaperidona. Sería interesante comprobar si esta potente afinidad de Abaperidona por el receptor D₃ se correspondería con una potente actividad *in vivo*. Existen algunos modelos animales descritos para ello, como la reversión a la hipotermia inducida por 7-OH-DPAT (7-hidroxi-dipropil aminotetralin)-agonista D₃ no selectivo- o la reversión a la hipolocomoción inducida por este mismo agonista (Millan et al., 1995; Shafer & Levant,

1998). Sin embargo, se dan varios problemas con estos modelos: primero la ausencia del propio agonista selectivo, ya que a dosis elevadas el 7-OH-DPAT actúa preferentemente como D₂ (Sokoloff et al, 1995) y segundo que tanto en la hipotermia como en la hipolocomoción están implicados varios receptores centrales, con lo que es difícil inferir cuánto de ello es debido al bloqueo de los D₃. Medidas más directas como estudios de microdiálisis *in vivo* sufrirían de las mismas limitaciones por carencia de compuestos selectivos que indujesen y bloqueasen respectivamente la liberación de dopamina y además se ha demostrado que estos compuestos agonistas son poco potentes en estos estudios (Sokoloff et al., 1995; Shafer & Levant, 1998). Por este motivo, la acción de los antipsicóticos sobre el receptor D₃ es difícil de evaluar de manera fehaciente *in vivo*.

Respecto al receptor dopaminérgico D₁, el equilibrio del antagonismo a los receptores D₁ y D₂ puede contribuir al control de los síntomas motores indeseables. El efecto de los receptores D₁ puede deberse tanto a una acción sinérgica con los receptores D₂, ya que es necesaria la estimulación de los uno de los receptores dopaminérgicos para inducir sensibilidad a la estereotipia antes que se produzca este comportamiento debido a la acción conjunta de los dos receptores, como a un efecto per se (Daly & Waddington, 1992; Kuczenski & Segal, 1999). Se ha demostrado que el antagonismo a los receptores D₁ ejerce una inhibición directa de las vías nigroestriadas (DeLong 1990) reduciendo la excitación de las vías motoras descendientes, por lo que el antagonismo a este receptor parece regular el tono muscular y evita la aparición de catalepsia en ratas (Hemsley & Crocker, 2001) y primates no humanos (Barnes & Gerlach, 1995). En consecuencia, el efecto ejercido por Abaperidona sobre los receptores D₁, puede ser uno de los factores que contribuya a su escasa inducción de EPS.

El modelo animal utilizado para evaluar el efecto *in vivo* de Abaperidona sobre éste receptor, la inhibición del autoaseo inducido por SKF 38393, se ha considerado como predictivo de posibles efectos motores adversos, porque hemos considerado la exacerbación del aseo como un tipo de movimiento estereotipado, lo que permite deducir las consideraciones anteriores sobre los EPS. Es más, sería interesante corroborar nuestros datos con un agonista D₁ completo, como el SKF 82958, en la

prueba de los 'tremolous jaw movements' en ratas (Mayorga et al., 1999), ya que el SKF38393 es sólo un agonista parcial y se ha realizado la prueba con ratones.

Por otro lado, existen bastantes trabajos que relacionan la acción sobre el receptor D₁ con la eficacia contra sintomatología negativa y cognoscitiva. Estos trabajos, realizados principalmente con Clozapina, aducen que dado que estos receptores son los receptores dopaminérgicos mayoritarios en el córtex, es probable que no sólo tengan una función 'adyuvante' para la activación de los D₂ y especulan que una acción tipo agonismo inverso o agonismo parcial mejora dicha sintomatología (Josselyn et al., 1997; El-Ghundi et al., 1999; Oerther & Ahlenius, 2000) ya que la activación de estos receptores en el córtex prefrontal mejora la cognición en primates (Lidow et al, 1998), aunque es una hipótesis que no ha tenido más desarrollo. Basándonos en la hipótesis de estos trabajos, sería interesante comprobar el tipo de actividad intrínseca que ejerce Abaperidona sobre este receptor, que de manera bastante rápida se podría hacer estudiando si la hipotermia inducida por Abaperidona es bloqueada con un compuesto antagonista D₁, peJ SCH 23390 (Salmi & Ahlenius., 1996; Oerther & Ahlenius, 2000).

Así mismo, la elevada actividad de Abaperidona en modelos considerados predictivos de eficacia con baja inducción de EPS, pueden explicarse también por su elevada afinidad y actividad antagonista sobre distintos receptores de serotonina, como los 5HT_{2A} y 5HT_{2C}.

Abaperidona produce una ocupación significativa de receptores 5HT_{2A} a una concentración menor que la necesaria para el bloqueo de D₂ (0.08 mg/kg en la inhibición de las sacudidas de cabeza versus 0.24 mg/kg en la inhibición de la escalada, respectivamente). Esto permite suponer que Abaperidona, al igual que Risperidona, Clozapina y Olanzapina, saturaría estos receptores a dosis subterapéuticas, siendo uno de los rasgos característicos que le conferiría atipicidad. Para confirmarlo realmente, podrían realizarse estudios de neuroimagen *in vivo*, peJ PET, viendo cómo la administración de Abaperidona desplaza agonistas 5HT_{2A} y D₂ marcados y el ratio de ocupación entre ambos receptores.

Estos resultados son coherentes tanto con lo publicado por Arnt & Skarsfeldt (1998) a nivel preclínico como por Kapur et al. (1999) en estudios clínicos respecto a otros antipsicóticos atípicos (Fig 31).

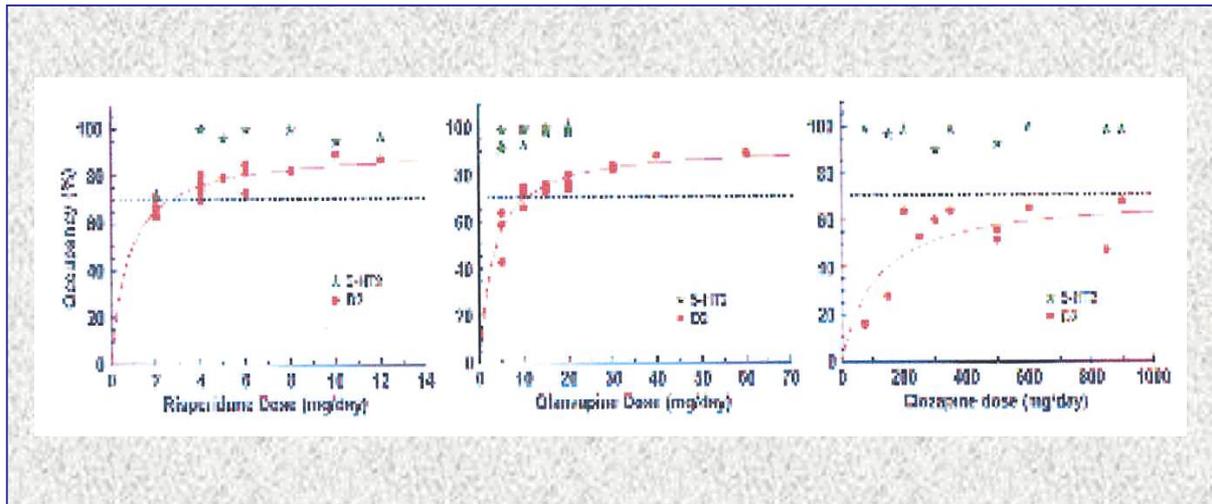


Fig 31. Relación entre la dosis diaria y el nivel de ocupación de receptores 5-HT_{2A} (azul) y D₂ (rojo) para Risperidona, Olanzapina y Clozapina. La línea horizontal muestra el nivel teórico esperado de ocupación del receptor D₂ a la dosis máxima de Clozapina (Kapur et al, 1999).

Por ello, además de una acción directa sobre los ganglios basales, Abaperidona, debido a su antagonismo por el receptor 5-HT_{2A}, podría ejercer una actividad moduladora sobre distintas vías dopaminérgicas.

A nivel límbico, estudios electrofisiológicos demostraron la existencia de despolarización neuronal en rodajas de núcleo accumbens e hipocampo inducida por serotonina debida a la excitación de los receptores 5-HT_{2A} (Aghajanian, 1995). La serotonina ejerce un efecto inhibitor sobre el 'firing-rate' de neuronas dopaminérgicas, ya que el efecto de Anfetamina sobre neuronas del núcleo tegmental ventral (A10) y núcleo accumbens es bloqueado por antagonistas 5HT_{2A} y aumenta cuando existe depleción de serotonina (Schmidt et al., 1995; Abi-Dargham et al., 1997). Por otro lado,

los antipsicóticos atípicos, a diferencia de los típicos, facilitan la acción dopaminérgica en la zona límbica del núcleo accumbens (“shell”) frente a la zona estriada (“core”) (Marcus et al., 2000).

A nivel nigroestriado, trabajos con antagonistas 5-HT_{2A} demostraron que los antipsicóticos atípicos inhibían el incremento de metabolismo de dopamina nigroestriada inducido por Haloperidol, aunque el control de la liberación de dopamina en este sistema es dependiente del grado de bloqueo de los receptores dopaminérgicos (Lucas et al. 2000). La administración subcrónica de antipsicóticos atípicos disminuiría la incidencia de EPS porque el bloqueo de las proyecciones procedentes del núcleo Dorsal de Raphe (NDR) produce la subsiguiente desinhibición de las neuronas dopaminérgicas nigroestriadas (Ichikawa & Meltzer, 1995; Kruzich & See, 2000). Además, se ha descrito que la administración de antipsicóticos induce una paradójica regulación a la baja de los receptores 5HT_{2A} en el córtex, facilitando el mantenimiento de la acción de estos compuestos al contribuir a esta desinhibición de otros sistemas neurotransmisores (Van Oekelen et al., 2003).

Así mismo, los estudios *ex vivo* confirman la unión de Abaperidona en los receptores 5-HT_{2A} del córtex, aunque debido al poco tiempo de administración de los compuestos sea difícil discernir si se producirá esta regulación a la baja propia de estos receptores. Este antagonismo de Abaperidona podría tener un efecto modulador de la dopamina en esta área, favoreciendo la terapia contra los síntomas cognitivos y negativos de la esquizofrenia (Richelson, 1999; Bergqvist et al., 1999; Meltzer & McGurk, 1999).

En consecuencia, la potente acción antagonista *in vivo* de Abaperidona sobre los receptores 5-HT_{2A} podría contribuir a la mejora global de los síntomas de la esquizofrenia, tanto cognitivos como positivos y negativos, por su posible acción directa e indirecta en el área límbica y córtex (Meltzer, 1999; Wadenberg et al., 2001a), así como disminuir la incidencia de EPS por su posible regulación del área estriada (Kapur et al., 1999; Kruzich & See, 2000).

Abaperidona demuestra también elevada afinidad por el receptor 5HT_{2C}, superior a la obtenida por el receptor D₂, y un antagonismo *in vivo* por este receptor similar al ejercido por Clozapina. Este antagonismo se ha comprobado principalmente

en los receptores de las áreas límbicas y estriado, ya que se ha demostrado que la acción de los compuestos en el modelo de la hipolocomoción se regula en estas áreas, a diferencia del modelo de la hipofagia que incide en las áreas del hipotálamo (Fone et al 1998; Prinssen et al 2000).

Los resultados *in vivo* obtenidos por Abaperidona y Clozapina demuestran una tendencia clara a revertir la acción del m-CPP. Este efecto ha sido descrito con anterioridad por varios grupos de investigación independientes con Clozapina y Olanzapina, algunos de los cuales obtuvieron resultados significativos (Prinssen et al., 2000) pero otros únicamente una tendencia (Czyrak et al. 1994 y Fiorella et al 1996). Estas diferencias pueden deberse tanto a aspectos metodológicos (elevada variación tanto de la dosis del mCPP como del tiempo de valoración, según el grupo de trabajo), como a los efectos hipolocomotores propios de estos compuestos, ya que muchas veces la dosis que induce sedación es superior a la dosis necesaria para revertir el efecto del mCPP, como en el caso de Risperidona y Olanzapina. Debido a ello, comprobar si Abaperidona revierte la hipofagia inducida por agonistas 5HT_{2C} y si este efecto es bloqueado por antagonistas selectivos, ahora disponibles como el SB242084, confirmaría esta acción antagonista 5HT_{2C} observada en la prueba de la hipolocomoción.

El antagonismo al receptor 5-HT_{2C} confiere claras ventajas. Por un lado, ejerce un control tónico inhibitorio sobre las vías dopaminérgicas nigroestriadas, que a diferencia de lo que ocurre con el antagonismo a los 5-HT_{2A} no es dependiente del grado de bloqueo dopaminérgico, habiéndose publicado trabajos en los que se sugiere un potencial anticataléptico (Reavill et al 1999) y antiparkinson (Fox & Brotchie, 2000) de los compuestos antagonistas a este receptor. Por otro lado, también ejerce un control inhibitorio sobre las vías dopaminérgicas tuberoinfundibulares (Bagdy, 1996; Maes et al., 2001). Este control de las vías dopaminérgicas nigroestriadas y tuberoinfundibulares contribuiría a una menor incidencia de EPS y de niveles de prolactina circulante respectivamente (Bagdy, 1996; Lucas et al. 2000; Zhelyaskova-Savova et al., 2000).

Abaperidona ha demostrado menor inducción de EPS y menor incremento de los niveles de prolactina que Haloperidol y Risperidona, pudiendo ser uno de los factores

contribuyentes su antagonismo a este receptor, tal como se ha comprobado en trabajos preliminares con Olanzapina (Scheepers et al. 2000).

Interesantemente, **Abaperidona ha demostrado una potente actividad *in vivo* sobre el receptor glutamatoérgico NMDA**, tal como se deduce de los resultados del test de la inhibición de la hiperactividad inducida por dizocilpina.

Desde principios de los 90 la teoría hipoglutamatoérgica postula que los síntomas esquizofrénicos están relacionados con una reducción funcional del glutamato (Deutsch et al., 1989; Kim et al, 1990). Los antagonistas del receptor NMDA inducen o exacerban los estados psicóticos en humanos, con una sintomatología clínica similar a la de la esquizofrenia (Lathi et al, 1995). Deficiencias en la transmisión glutamatoérgica han sido implicadas en la génesis de la sintomatología negativa y déficits cognitivos (Sokoloff, 1998).

Aunque los antipsicóticos no actúan directamente sobre los receptores glutamatoérgicos, como demuestra la nula afinidad por estos receptores de estos compuestos, son capaces de revertir los cambios de comportamiento inducidos por antagonistas glutamatoérgicos. Estos efectos estarían mediados mayoritariamente por las interacciones con los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos en el córtex y otras áreas cerebrales. Es conocido que estos compuestos producen efectos contrapuestos sobre los receptores NMDA (reducción) y los AMPA (incremento) en el estriado sugiriendo que los distintos tipos de receptores ionotrópicos glutamatoérgicos responden diferente a los cambios a largo plazo de la neurotransmisión de serotonina y dopamina (Lipska & Weinberg, 1997; Meltzer et al, 1997, Tarazi et al., 2003).

En animales, dizocilpina y fenciclidina inducen unos síndromes conductuales caracterizados por hiperactividad a dosis bajas y ataxia y movimientos estereotipados a dosis elevadas (Liljequist et al., 1991). La respuesta locomotora inducida por la dizocilpina tiene lugar mayoritariamente en la vía mesolímbica y es dependiente de la estimulación de los receptores dopaminérgicos D₃ (Kinon & Lieberman, 1996; Leriche et al., 2003). Por ello, el bloqueo selectivo de esta hiperactividad ejercido por Abaperidona, con elevada afinidad por el receptor D₃, demuestra que modula los receptores NMDA *in vivo* y aporta un indicio más del perfil de actividad antipsicótica atípica de este compuesto.

Así mismo, en una prueba más compleja, Abaperidona demuestra una clara tendencia a revertir los déficits sensorimotrices inducidos por PCP, a diferencia de los antipsicóticos de referencia utilizados. El circuito neuronal implicado en la respuesta a la disrupción del PPI inducida por PCP es muy amplio, describiéndose como circuito descendiente cortico-límbico-estriado-pálido-pontino, en el que la amígdala, el hipocampo y el córtex prefrontal medial serían áreas neuroanatómicas clave, pero en el que también intervendría de manera aditiva los efectos sobre el resto de estructuras, relacionadas con los déficits cognitivos y síntomas negativos (Bakshi & Geyer, 1998; Swerdlow & Geyer, 1998; Swerdlow et al., 2000; Bast & Feldon, 2003).

Sin embargo, según trabajos de otros grupos, Clozapina, Olanzapina y Prazosin sí revierten los déficits en el PPI inducidos por PCP o dizocilpina, (Bakshi et al., 1994; Bakshi & Geyer, 1999). Los resultados publicados para Risperidona son más contradictorios (Swerdlow & Geyer, 1998).

Un posible factor que puede afectar los resultados es la sedación de los animales tratados, que disminuiría la capacidad de saltar cuando se asustan. En el caso de Risperidona y Clozapina la falta de respuesta en este estudio no sería atribuible a sedación, porque a pesar de que en la prueba de la actividad motora espontánea se detecta sedación estadísticamente significativa a las dosis de 1mg/kg en Risperidona y a partir de los 10 mg/kg en Clozapina, en los animales de estos grupos de tratamientos sin PCP, el porcentaje de inhibición de PPI es similar al de los controles (controles: 77.8 y 76.3%, Risperidona-0.5mg/kg: 72.8%, Risperidona-1mg/kg: 76.0%, Clozapina-10mg/kg: 87.0%, Clozapina-30mg/kg: 67.9%), por lo que se demuestra que saltan cuando es necesario. Por otro lado también se demuestra que ninguno de los compuestos tuvo efecto per se sobre el déficit de PPI inducido por PCP, al igual que sucedió en el estudio del PPI inducido por apomorfina con ratas Wistar.

Estas diferencias de resultados podrían atribuirse en gran parte al uso de distintas metodologías de trabajo. Así, la mayoría de los trabajos citados emplean un Acoustic Startle System de San Diego Instr (USA) en el que únicamente se generan ruidos, no tonos y ruidos como el de Coulburn Instr (USA) empleado por nosotros. Sin embargo, y en un equipo distinto, nuestros valores basales ('baseline') de %PPI en los animales control, entre 70-80%, son equivalentes a los descritos por los autores arriba

mencionados y el déficit inducido por el PCP es estadísticamente significativo. También se ha descrito en la literatura la importancia de los dB emitidos en los pulsos y prepulsos en la variabilidad de la respuesta, siendo uno de los factores clave que define la sensibilidad de la prueba (Graham, 1975; Depoortere et al., 1997a y 1997b). En consecuencia, el uso de diferentes tipos de sonidos generados por el tipo de equipo empleado, ha podido influir claramente en nuestros resultados.

Además, en el equipo de San Diego Instr. (USA) las cámaras donde se colocan los animales de experimentación, son independientes para cada animal. Por el contrario, en el aparato de Coulburn Instr. (USA), las cámaras son de 4 animales. Durante la fase de susto algunos animales emiten sonidos inaudibles al oído humano pero audibles para el resto de animales que comparten cámara (Kaltwasser, 1990), además del olor secretado por el miedo, por lo que los animales, a pesar de la precaución de la aleatorización de los grupos de tratamiento, pueden influenciarse. Por ello, bajo condiciones experimentales similares a las descritas por estos grupos, sería de esperar que Abaperidona demostrase eficacia, habiendo ya demostrado una clara tendencia en nuestro estudio.

Esta actividad de Abaperidona sobre el receptor NMDA ha sido confirmada en otros estudios realizados por grupos independientes. Estos estudios demuestran que Abaperidona previene el aumento de 'heat shock protein-70' (hsp 70) inducido por PCP en el córtex prefrontal de rata (García-Osta et al, 2003).

En consecuencia, Abaperidona demuestra ejercer regulación indirecta sobre el receptor NMDA que en vista de la literatura existente suponemos que es mayoritaria en el área mesolímbica y córtex prefrontal, por lo que podría contribuir a paliar los déficit cognitivos de la esquizofrenia y la sintomatología negativa.

Finalmente, **Abaperidona demuestra una elevada afinidad y un potente antagonismo por el receptor α_1 -adrenérgico**, tanto en estudios funcionales como en modelos *in vivo*. En estas pruebas, los resultados de Abaperidona indican que es más potente que el antagonista α_1 de referencia, Prazosin. El ratio de selectividad noradrenalina-dopamina (α_1/D_2) *in vitro* de Abaperidona es similar al Clozapina y más noradrenérgico que Risperidona, y unas 46 veces más selectivo por los receptores α_1 -adrenérgicos *in vivo* que Haloperidol.

Se ha descrito que la administración crónica de Clozapina y Risperidona, pero no Haloperidol, incrementa el 'firing rate' de las neuronas noradrenérgicas en el locus coeruleus. Este incremento de 'firing-rate' no estaría mediado por los receptores α_2 ya que no afecta a las dosis de clonidina necesarias para inhibirlo y por el contrario sí es inducido Prazosin, antagonista α_1 . Este aumento de actividad noradrenérgica provoca un descenso significativo en los niveles de noradrenalina en el córtex prefrontal, una de las zonas de destino de las proyecciones neuronales del locus coeruleus, lo cual puede contribuir al alivio de los síntomas negativos y mejora de los déficits cognitivos (Breier et al., 1998; Nasif et al., 2000).

Además, el bloqueo de los α_1 -adrenoreceptores en el área límbica o cortical, atenúa la acción locomotora de compuestos psicoestimulantes. Prazosin, modula específicamente el 'firing rate' de las neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral (A10). Estudios experimentales con compuestos antagonistas selectivos D₂, como Raclopride o Quinpirol, demostraron que el pretratamiento con Prazosin incrementa la respuesta de Raclopride en el paradigma de la evitación condicionada ('Conditioned Avoidance Response- CAR'), así como la inhibición producida por Quinpirol en modelos de hiperactividad, corroborando la existencia de una regulación noradrenérgica de la actividad dopaminérgica mesolímbica (Obuchowicz, 1999; Wadenberg et al., 2000).

El mecanismo de esta interacción todavía no está esclarecido, pero se han demostrado distintos niveles de acción del antagonismo a los receptores α_1 -adrenérgicos.

A nivel dopaminérgico, este antagonismo modula la respuesta dopaminérgica preferentemente en la vía mesolímbica frente a la nigroestriada: facilita la liberación de dopamina en la zona de la concha o 'shell' (límbica) versus el núcleo o 'core' (nigroestriada) en el núcleo accumbens. Además, este antagonismo no tiene efecto en otros núcleos del área nigroestriada, existen trabajos que demuestran que Prazosin no tiene efectos sobre la catalepsia inducida por antagonistas D₂. Igualmente modula la liberación de dopamina en el córtex prefrontal (Gioanni et al., 1998; Marcus et al., 2000; Millan et al., 2000; Wadenberg et al., 2000).

A nivel serotoninérgico, el núcleo dorsal de Raphe recibe abundante inervación procedente de las neuronas noradrenérgicas pontinas y distintos estudios demuestran abundancia de α_1 -adrenoceptores en esta área y en el córtex frontal. Por ello, el antagonismo a los receptores α_1 -adrenérgicos reduce la liberación de serotonina en los núcleos dorsales de Raphe y ejerce un control distal de los mismos desde el área cortical, mientras que a su vez los antagonistas 5-HT_{2A/2C} incrementan la liberación de noradrenalina (Peyron et al., 1996; Marcus et al., 2000; Bortolozzi & Artigas, 2003).

El conjunto de estas interacciones debidas al antagonismo α_1 -adrenérgico podría contribuir a la actividad preferencial de Abaperidona en las vías mesolímbicas / mesocorticales y a la mejora de los déficits cognitivos.

Debido a la relevancia de este antagonismo en la posible acción antipsicótica de Abaperidona y a que el test *in vivo* utilizado es robusto pero más funcional que conductual, podría ser interesante corroborar estos datos con pruebas complementarias más complejas como la reversión del estímulo discriminativo inducido por agonistas α_1 -adrenérgicos (pej. St 587) o con medidas algo más directas como estudios de microdiálisis muestreando en distintas áreas cerebrales.

Por otro lado, este potente antagonismo α_1 -adrenérgico ejercido por Abaperidona puede estar implicado en su favorable respuesta al paradigma del PPI inducido por PCP. Está descrito que Prazosin inhibe la liberación de dopamina en el núcleo accumbens inducida por el antagonista NMDA dizocilpina (MK801). En nuestros resultados Prazosin, igual que Abaperidona, demuestra una clara tendencia a revertir el PPI inducido por PCP, corroborada por otros grupos que han demostrado reversión significativa (Bakshi & Geyer, 1997; Bakshi & Geyer, 1999) o se ha documentado la inhibición del PPI inducida por agonistas α_1 -adrenérgicos como cirazolina (Carasso et al., 1998), sugiriendo que el sistema noradrenérgico tiene un papel importante en el procesamiento sensorimotor. Esta acción podría estar mediada tanto por un procesamiento sensorial indirecto a través de la conexión tálamo-córtex modulada por los adrenoceptores como por una actividad directa de los propios α_1 -adrenoceptores en el mismo córtex (Gioanni et al, 1998; Bakshi & Geyer, 1999).

Interesantemente, a pesar de que los receptores α_1 -adrenérgicos son el subtipo de adrenoceptores predominantes en el corazón y también se hallan en los vasos sanguíneos (Zongh & Minneman, 1999), los estudios cardiovasculares en rata consciente han demostrado que **Abaperidona no afecta a la presión arterial** y los efectos sobre la frecuencia cardíaca son significativamente menores que los demostrados por Risperidona y Clozapina, inclusive a dosis 10 veces superiores a su dosis preclínica D₂ *in vivo*.

El motivo de este favorable perfil cardiovascular mostrado por Abaperidona no está dilucidado. Se puede especular que su escaso antagonismo *in vivo* por los receptores muscarínicos puede ser uno de los factores clave, ya que el bloqueo de los receptores histaminérgicos, muscarínicos y dopaminérgicos periféricos se hallan implicados en los efectos cardiovasculares secundarios (Meltzer et al., 2002). Sin embargo, este escaso antagonismo muscarínico es compartido por Risperidona, que contrariamente a Abaperidona, induce evidentes efectos cardiovasculares en el mismo modelo.

Probablemente, estos contrastes en el efecto cardiovascular entre Abaperidona y Risperidona sean debidos a otras diferencias en sus respectivos perfiles multireceptoriales.

Abaperidona, por su elevada selectividad por los receptores α_1 versus α_2 , tanto en ensayos *in vitro* como funcionales, puede inducir menores efectos sobre la frecuencia cardíaca que Risperidona y Clozapina. Estos dos últimos compuestos son prácticamente los dos únicos antipsicóticos que presentan una afinidad equivalente por ambos subtipos de adrenoceptores (Schotte et al., 1996; Richelson & Souder, 2000). Al no ser selectivos, tienen una mayor probabilidad de inducir taquicardia debido al bloqueo de los receptores α_2 presinápticos, que impide controlar la concentración de noradrenalina en la hendidura sináptica. Por otro lado, la hipotensión relacionada con la acción α_1 puede ser contrarrestada por la acción sobre los receptores presinápticos D₂ periféricos, que controlarían la liberación de noradrenalina.

Referente a la actividad anticolinérgica de los antipsicóticos, existe cierta polémica sobre si poseer elevada actividad sobre los receptores muscarínicos es positivo o no. Como se ha mencionado, Abaperidona, al igual que Risperidona,

demuestra escasa interacción con dichos receptores. A nivel periférico tiene implicaciones cardiovasculares ya comentadas. La duda reside en las acciones centrales y su relación con los procesos cognitivos.

En estudios clínicos de los años 80 se demostró que fisostigmina mejoraba los síntomas cognitivos de pacientes esquizofrénicos, aunque de forma moderada e intermitente y a menudo no corroborado por otros estudios. Por otro lado, el tratamiento más común para minimizar los EPS inducidos por los antipsicóticos típicos fueron los fármacos anticolinérgicos, que agravaban los problemas cognitivos de los pacientes esquizofrénicos al deteriorar la memoria y aprendizaje. Posteriormente, estudios *postmortem* y de neuroimagen demostraron un descenso de receptores muscarínicos en zonas del córtex, ganglios basales y tálamo en pacientes esquizofrénicos (Dean et al., 2003; Katerina et al., 2003).

Sin embargo, Clozapina y Olanzapina, antipsicóticos atípicos con potente antagonismo colinérgico, no empeoran la memoria y aprendizaje y demostraron superior eficacia que los antipsicóticos típicos en tratar los déficits cognitivos (Keefe et al., 1999). Se ha sugerido que estos compuestos, vía un antagonismo a los autoreceptores M₂ y sobre todo un agonismo parcial por los receptores M₁ y M₄, incrementan el flujo extracelular de acetilcolina en las áreas corticales e hipocampales relacionadas con la cognición. Sin embargo, Risperidona, al igual que Abaperidona, no demuestra afinidad relevante por estos receptores, por lo que se sugirió que Risperidona aumentaba los niveles de acetilcolina vía un agonismo parcial sobre los receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}, aunque estudios posteriores no lo demostraron. Por lo tanto, no está todavía esclarecido el mecanismo por el cual compuestos con una afinidad por los receptores muscarínicos poco relevante, como Risperidona, e igualmente Abaperidona, inducirían un aumento de la actividad colinérgica en el córtex favorecedora del control de síntomas cognitivos (Dean et al., 2003).

Otro punto importante para **Abaperidona es que no induce sedación**, a pesar de su potente afinidad por los receptores α₁ y también H₁, ambos implicados en la inducción de sedación.

Abaperidona inhibe la actividad motora espontánea a dosis 4 veces superiores que las necesarias para inducir sedación con Risperidona o Haloperidol. Abaperidona

demuestra un margen entre inducción de sedación y su dosis eficaz preclínica claramente superior al de Clozapina (ratio actividad motora espontánea / climbing: 12.5 Abaperidona y 1.3 Clozapina) la cual está considerada un antipsicótico con potente acción sedante a nivel clínico (Casey, 1997; Richelson, 1999).

En estudios subagudos (2.5 mg/kg, po, 10 días) con ratas conscientes implantadas teleméricamente, Abaperidona confirmó los resultados obtenidos en los estudios agudos y no indujo cambios significativos ni en los parámetros hemodinámicos ni tampoco en los parámetros de actividad motora, a diferencia de Risperidona (Brasó et al, 1999).

Estudios comparativos recientes de EEG en ratas conscientes, corroboran que Risperidona causa sedación moderada al inducir cambios en la densidad del espectro en la banda de alta frecuencia (9.8 a 16 Hz). En cambio Olanzapina y Clozapina causan un incremento dosis dependiente de la densidad del espectro en todas las bandas de frecuencias, en dosis inferiores a las requeridas para inhibir los efectos de apomorfina, confirmando su potente efecto sedante (Ahnaou et al., 2003). La sedación y somnolencia diurna están consideradas como efectos indeseables en la terapia crónica con antipsicóticos (Casey, 1997; Richelson, 1999), por lo que Abaperidona mostraría una clara ventaja frente a los antipsicóticos atípicos actuales.

La razón de esta menor sedación inducida por Abaperidona no se conoce. Por ello sería interesante llevar a cabo distintos estudios para dilucidar este punto. En primer lugar se puede especular si la acción sobre los receptores α_1 y H₁ es realmente un antagonismo, como parece por los ensayos funcionales realizados en rata desmedulada y en íleo de cobayo respectivamente, o dependiendo de la dosis puede ser un agonismo parcial o agonismo inverso mediante pruebas funcionales. Igualmente, existen subpoblaciones de estos receptores, por lo que estudios de radioligando con estas subpoblaciones quizás indicarían diferencias entre los antipsicóticos que explicasen este perfil de Abaperidona.

Por otro lado, existen otros receptores implicados en las funciones motoras y/o sedación, como por ejemplo los histaminérgicos H₃, la subunidad α_1 de los receptores GABA_A, los cannabinoides CB₁ (McLeod RL et al., 1998; Moler et al., 2001; Croxford JL, 2003), sin embargo, Abaperidona no se une con afinidad relevante por estos

receptores, tal como se comprobó en el cribado primario de receptores mencionado, por lo que es poco probable que influyan en esta acción.

Un punto interesante a estudiar sería el efecto de Abaperidona sobre el espectro EEG en distintas áreas cerebrales y correlacionarlo con la distribución de receptores en dichas áreas. Quizá esta prueba nos indicaría si existen diferencias y en qué en el efecto de este compuesto sobre la actividad cerebral, comparativamente a otros antipsicóticos y nos daría alguna pista sobre la que empezar a trabajar a nivel de receptores.

Finalmente, una posible ventaja de Abaperidona sería una menor inducción de incremento de peso que Clozapina y Olanzapina, que son los dos compuestos comercializados que inducen mayor ganancia de peso. Este efecto indeseable, implícito en el propio mecanismo de acción de estos compuestos, es una de las principales causas de discontinuación de la medicación (Baptista, 1999; O'Keefe et al. 2003).

El mecanismo del aumento de peso asociado a los antipsicóticos es desconocido. Las interacciones de los antipsicóticos sobre los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico pueden estimular las áreas cerebrales reguladoras del apetito (Baptista, 1999). A nivel molecular este aumento de peso se ha correlacionado positivamente a la afinidad por los receptores H₁, α_1 y α_2 , 5HT_{2C} y 5HT₆ principalmente (Kroeze et al. 2003).

Abaperidona, con menor sedación y menor afinidad por los receptores α_2 -adrenérgicos que los otros APS atípicos podría inducir menor aumento de peso. Sería realmente una ventaja clara para el compuesto poder confirmar este punto en Abaperidona. Para ello se podría realizar un estudio del incremento de peso inducido por distintos antipsicóticos tras administración subaguda en ratas, aunque generalmente no se ha descrito una elevada correlación entre los datos preclínicos en estos modelos experimentales y los resultados clínicos, si serviría para posicionar Abaperidona respecto a otros compuestos.

VI.-CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados expuestos en esta memoria, es de resaltar la excelente concordancia de los resultados *in vitro*, funcionales e *in vivo* obtenida. Así mismo, la discusión desarrollada pone de manifiesto la idoneidad de los modelos elegidos en base a lo que se pretendía demostrar y a la información disponible. Por todo ello se puede concluir que:

- 1.- De acuerdo con los planteamientos establecidos, se demuestra que Abaperidona es un compuesto multireceptorial acorde con el grupo terapéutico al que pertenece. Se demuestra que se une con potente afinidad por receptores considerados imprescindibles para la acción antipsicótica (p ej, dopaminérgicos D₂, D₃, D₁ y serotoninérgico 5HT_{2A}) y confirma el valor añadido de su afinidad en rango nM por el receptor α_1 -adrenérgico, más potente que su acción sobre D₂.
- 2.- Se puede concluir que es un compuesto con mecanismo de acción atípico. Acorde con el perfil que se intentó seleccionar en las series diseñadas a priori, el ratio de afinidad por los receptores 5HT_{2A}/D₂ es menor de 1 (pK_i 5HT_{2A}/D₂>1). Este ratio se corrobora en los estudios con modelos conductuales (dosis eficaz en la prueba de los 'head-twitches' inducidos por DOI respecto a la dosis eficaz en la prueba del 'climbing' inducido por apomorfina).
- 3.- Así mismo, la acción de este compuesto sobre la regulación al alza de la población de los receptores 5HT_{2A} y D₂ en las áreas corticales y límbicas y un menor efecto sobre el área estriada demuestra una distribución regional de su acción, confirmando su perfil atípico.
- 4.- Los estudios en modelos conductuales relacionados con el receptor dopaminérgico D₂ demuestran que Abaperidona ejerce un antagonismo potente por vía oral sobre este receptor, clave para el tratamiento de la esquizofrenia. Además se puede concluir que esta acción se ejerce preferencialmente sobre las vías mesolímbica/mesocortical. Ello se deduce del amplio margen entre la dosis

necesaria para inducir efectos adversos (catalepsia-EPS, estereotipias) respecto a la dosis necesaria para inducir actividad (comportamiento de escalada, hiperactividades). En consonancia, se demuestra menor efecto en las vías nigroestriadas (escasos efectos motores) y tuberoinfundibulares (baja inducción de prolactinemia).

- 5.- Se demuestra que esta acción preferencial de Abaperidona sobre las vías mesolímbica/mesocortical respecto a la vía nigroestriada está modulada por el antagonismo ejercido sobre los receptores 5HT_{2A} (prueba de la inhibición de los 'head-twitches' inducidos por DOI) y α_1 -adrenérgico (prueba de la protección a la letalidad inducida por NA) en los ganglios basales y área cortical. Así mismo, la acción sobre la vía tuberoinfundibular está modulada por su antagonismo a los receptores 5HT_{2C} (prueba de la reversión a la locomoción inducida por mCPP).
- 6.- En distintos modelos considerados predictivos de eficacia se demuestra que Abaperidona podría ser eficaz en la sintomatología positiva y negativa y los déficits cognitivos de la esquizofrenia. Abaperidona revierte los déficits sensorimotores inducidos por apomorfina, indicativo de su posible acción clínica contra la sintomatología positiva, de acuerdo con la hipótesis hiperdopaminérgica de la esquizofrenia. Abaperidona inhibe la hiperactividad inducida por dizocilpina y demuestra tendencia a revertir los déficits sensorimotores inducidos por fenciclidina (antagonistas NMDA), indicativo de su posible acción clínica contra la sintomatología negativa y déficits cognitivos, de acuerdo con la hipótesis hipoglutamatérgica de la esquizofrenia. Se demuestra, por la acción de Prazosin (antagonista α_1), similar a la de Abaperidona en el paradigma del PPI y de acuerdo con la literatura existente, que el potente antagonismo α_1 -adrenérgico de Abaperidona es uno de los factores clave que contribuye a esta favorable actividad.
- 7.- Basándose en modelos experimentales en animal consciente, se concluye que Abaperidona induce escasos efectos cardiovasculares y de sedación a pesar del potente antagonismo α_1 -adrenérgico, demostrando que este antagonismo no es

el único factor implicado en estos efectos adversos, tal como venían apuntando otros grupos de trabajo.

- 8.- El estudio sobre los receptores escogidos para caracterizar los posibles efectos secundarios de Abaperidona (adrenérgicos, muscarínicos e histaminérgicos) demuestra escasa afinidad por los receptores muscarínicos y α_2 - y β -adrenérgicos. Por lo tanto, se puede concluir que Abaperidona demuestra elevada selectividad sobre el receptor α_1 -adrenérgico frente a los otros receptores adrenérgicos ensayados, confiriéndole una menor incidencia de efectos cardiovasculares. Además la escasa afinidad por los receptores muscarínicos es corroborada por los estudios *in vivo* (protección a la letalidad inducida por fisostigmina), pudiendo concluir que Abaperidona tendrá baja propensión a inducir efectos anticolinérgicos.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

VII.- BIBLIOGRAFÍA

- Abi-Dargham A, Laruelle M, Aghajanian GK, Charney D, Krystal J. (1997). The role of serotonin in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *J. Neuropsych. & Clin Neurosci.*, 9, 1-17.
- Aghajanian GK (1995). Electrophysiology of serotonin receptor subtypes and signal transduction pathways. In: *Psychopharmacology: The fourth generation of Progress*. Bloom FR & Kupfer DJ (eds). Raven, NY, p1451-1459.
- Ahnaou A, Megens AA, Drinkenburg WH. (2003). The atypical antipsychotics risperidone, clozapine and olanzapine differ regarding their sedative potency in rats. *Neuropsychobiology* 48, 47-54.
- Angermeyer MC and Matschinger H. (2003). The stigma of mental illness: effects of labelling on public attitudes towards people with mental disorders. *Acta Psychiatr. Scand.* 108(4), 304-309.
- Arango C, Breier A, McMahon R, Carpenter WT, Buchanan RW (2003). The relationship of clozapine and haloperidol treatment response to prefrontal, hippocampal, and caudate brain volumes. *Am J. Psychiatry* 160(8), 1421-1427.
- Arnt J. and Skarsfeldt T. (1998) Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. *Neuropsychopharmacol.* 18, 63-101.
- Arranz MJ, Munro J, Owen MJ, Spurlock G, Sham P, Zhao J, Kirov C et al. (1998). Evidence for association between polymorphisms in the promoter and coding regions of the 5-HT_{2A} receptor gene and response to clozapine. *Mol. Psychiatry* 3, 61-66.
- Bagdy, G. (1996). Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor-mediated oxytocin, prolactin and ACTH/corticosterone responses. *Behav Brain Res.*, 73(1-2), 277-280.
- Bakshi VP, Swerdlow NR, Geyer MA. (1994). Clozapine antagonizes phencyclidine-induced deficits in sensorimotor gating of startle responses. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 271, 787-794.

-
- Bakshi VP and Geyer MA. (1998). Multiple limbic regions mediate the disruption of prepulse inhibition produced in rats by the non-competitive NMDA antagonist dizocilpine. *J. Neurosci.*, 18(20), 8394-8401.
- Bakshi VP and Geyer MA. (1999). Alpha-1-adrenergic receptors mediate sensorimotor gating deficits produced by intracerebral dizocilpine administration in rats. *Neurosci*, 92(1), 113-121.
- Baldessarini, RJ; Huston-Lyons, D; Campbell, A; Marshall, E; Cohen, BM. (1992). Do central noradrenergic actions contribute to the atypical properties of Clozapine?. *Br J Psychiatry*, 160 (suppl. 17), 12-16.
- Baldessarini, R. J. and Frankenburg, F.R. (1991). Clozapina: a novel antipsychotic agent. *N England J Med*. 324: 746-754.
- Baptista T. (1999). Body weight gain induced by antipsychotic drugs: mechanism and management. *Acta Psychiatr. Scand.*, 100, 3-16.
- Bard JA; Zgombick J; Adham N; Vaysse P; Branchek TA; Weinshank RL. (1993). Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT₇) positively linked to adenylate cyclase. *J Biol Chem*. 268(31), 23422-23426.
- Barnes TRE and Gerlach J. (1995). D₁ receptor antagonists in schizophrenia. *Psychopharm.*, 121: 287-288.
- Barnes N.M. and Sharp, T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38, 1038-1152.
- Bartzokis G, Nuechterlein KH, Lu PH, Gitlin M, Rogers S, Mintz J. (2003). Dysregulated brain development in adult men with schizophrenia: a magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry*, 53(5), 412-421.
- Bast T and Feldon J. (2003). Hippocampal modulation of sensorimotor processes. *Prog. Neurobiol.* 70(4), 319-345.

-
- Bergqvist P., Dong J., Blier P. (1999). Effect of atypical antipsychotic drugs on 5-HT₂ receptors in the rat orbito-frontal cortex: an *in vivo* electrophysiological study. *Psychopharm.*, 143 : 89-96.
- Bersani G, Grispini A, Marinir S, Pasini A, Valducci M, Ciani N. (1986). Neuroleptic-induced extrapyramidal side-effects: Clinical perspective with ritanserin (R55 667), a new selective 5HT₂ receptor blocking agent. *Clin. Ther. Res.* 40, 492-499.
- Bersani, G; Grispini, A; Marinir, S; Valducci, M; Ciani, N (1986). Neuroleptic-induced extrapyramidal side-effects: Clinical perspective with ritanserin (R55 667), a new selective 5HT₂ receptor blocking agent. *Clin Ther Res* 40 492-499.
- Billard, W; Ruperto, V; Crosby, G; Iorio, LC; Barnett, A. (1984). Characterization of the binding of 3H-SCH 23390, a selective D-1 receptor antagonist ligand, in rat striatum. *Life Sci.* Oct 29;35(18):1885-93.
- Bortolozzi A and Artigas F. (2003). Control of 5-Hydroxytryptamine release in the Dorsal Rafe Nucleus by the noradrenergic system in rat brain. Role of α -adrenoceptors. *Neuropharmacology*, 28, 421-434.
- Braff DL, Heaton R, Kuck J, Cullum M, et al. (1991). The generalized pattern of neuropsychological deficits in outpatients with chronic schizophrenia with heterogeneous Wisconsin Card Sorting Test results. *Arch. Gen. Psychiatry*, 48, 891-898.
- Braff DL. and Geyer M. (1990). Sensorimotor gating and schizophrenia: human and animal model studies. *Arch. Gen Psychiatry*, 47, 181-188.
- Braff DL, Stone C., Callaway E, Geyer MA, Glick ID and Bali L. (1978). Prestimulus effects on human startle reflex in normals and schizophrenics. *Psychophysiology*, 15, 339-343.
- Brasó A., Planas JM, Cartheuser CF, Palop D, Príncipe M, Carcassona C et al. (1999). Safety tests in Abaperidone, a new antipsychotic. *Fund.& Clin. Pharmacol.*, 13(suppl1),283s.
- Breier A, Elman I, Goldstein DS (1998). Norepinephrine and schizophrenia: a new hypothesis for antipsychotic drug action. *Adv. Pharmacol*, 42, 785-788.

-
- Breier A., Buchanan R., Waltrip R., Listwak S. and D. Goldstein. (1994). The effect of Clozapina on Plasma Norepinephrine: Relationship to Clinical Efficacy. *Neuropsychopharmacology*, 10, 1-7.
- Broadbelt K, Byne W, Jones LB. (2002). Evidence for a decrease in basilar dendrites of pyramidal cells in schizophrenic medial prefrontal cortex. *Schizophr. Res.*, 58(1), 75-81.
- Brunelleschi S, Zeppegno P, Risso F, Cattaneo CI, Torre E. (2003). Risperidone-associated hyperprolactinemia: evaluation in twenty psychiatric outpatients. *Pharmacol. Res.*, 48(4), 405-409.
- Buckley, NJ; Bonner, TI; Buckley, CM; Brann, MR. (1989). Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol.*;35(4):469-76.
- Carasso BS, Bakshi VP, Geyer MA. (1998). Disruption in prepulse inhibition after α_1 adrenoceptor stimulation. *Neuropharmacol* 37, 401-404.
- Carlsson A. (1988). The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, 1, 179-185.
- Casey DE (1997). The relationship of pharmacology to side effects. *Am J. Psychiatry*, 58(10), 55-58.
- Chana C, Landau S, Beasley C, Everall IP, Cotter D. (2003). Two-dimensional assessment of cytoarchitecture in the anterior cingulate cortex in major depressive disorder, bipolar disorder and schizophrenia: evidence for decreased neuronal somal size and increased neuronal density. *Biol Psychiatry*, 53(12), 1086-1098.
- Charest, A; Wainer, BH; Albert, PR. (1993). Cloning and differentiation-induced expression of a murine serotonin1A receptor in a septal cell line. *J Neurosci.*;13(12):5164-71.
- Cheng, Y; Prusoff, WH. (1973). Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol.* Dec 1;22(23):3099-108.

-
- Chowdhari KV, Mirnics K, Semwal P et al. (2002). Association and linkage analyses of RGS4 polymorphism in schizophrenia. *Hum. Mol. Genet.*, 11, 1373-1380.
- Chumakov I, Blumenfeld M, Guerassimenko O, Cavarec L et al. (2002) Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 13675-13680.
- Cohen BM and Lipinski JF. (1986). In vivo potencies of antipsychotic drugs in blocking α₁ and dopamine D₂ receptors: implications for drug mechanism of action. *Life Sci.*, 39, 2571-2580.
- Cotter D, Mackay D, Chana G, Beasley C, Landau S, Everall IP (2002). Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder. *Cereb Cortex*, 12(4), 386-394.
- Cravchik A, Sibley DR, Gejman PV. (1996). Functional analysis of the human D₂ dopamine receptor missense variants. *J. Biol. Chem.* 271, 26013-26017.
- Croxford JL. (2003). Therapeutic potential of cannabinoids in CNS disease. *CNS Drugs*, 17(3), 179-202.
- Czyrak A, Skuza G, Rogoz Z, Frankiewicz T, Maj J. (1994). Pharmacological action of zotepine and other antipsychotics on central 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. *Arzeimittelforschung*, 44(2), 113-118.
- Dalman C, Allebeck P, Cullberg J, Grunewald C, Koster M. (1999). Obstetric complications and the risk of schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 56,234-240.
- Dalman C. & Allebeck P. (2002). Paternal age and schizophrenia: further support for an association. *Am.J. Psychiatry* 159(9), 1591-1592.
- Daly SA and Waddington JL. (1992). Two directions of dopamine D₁/D₂ receptor interaction in studies of behavioral regulation: a finding generic to four new, selective dopamine D₁ receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*, 213(2), 251-258.

-
- Davis KL, Stewart DG, Friedman JI, Buchsbaum M, Harvey PD, Ho PD, Buxbaum J, Haroutunian V. (2003). White matter changes in schizophrenia: evidence for myelin-related dysfunction. *Arch Gen Psychiatry*, 60(5), 443-456.
- Dean B. (2000). Signal transmission, rather than reception, is the underlying neurochemical abnormality in schizophrenia. *Aust N Z J Psychiatry*, 34(4), 560-569.
- Dean B, Bymaster FP, Scarr E. (2003). Muscarinic receptors in schizophrenia. *Curr.Mol. Medicine*, 3, 419-426.
- DeLong MR. (1990). Primate model of movement disorders of basal ganglia origin. *TINS*, 13, 281-285.
- De Paermentier, F; Cheetham, SC; Crompton, MR; Horton, RW. (1989). Beta-adrenoceptors in human brain labelled with [3H]dihydroalprenolol and [3H]CGP 12177. *Eur J Pharmacol.*; 167(3):397-405.
- Depoortere R, Perrault G, Sanger DJ (1997a). Some but not all antipsychotic drugs potentiate a low level of prepulse inhibition shown by rats of the wistar strain. *Behav. Pharmacol.*, 8, 364-372.
- Depoortere R, Perrault G, Sanger DJ (1997b). Potentiation of prepulse inhibition of the startle reflex in rat pharmacological evaluation of the procedure as a model for detecting antipsychotic activity. *Psychopharmacol.* 133(4), 366-374.
- Deutsch S., Mastropaolo J., Schwartz B., Rosse R. and Morihisa J. (1989). A "glutamatergic hypothesis" of schizophrenia. *Clin. Neuropharmacol.*, 12, 1 - 13.
- De Vries DJ and Beart PM. (1985). Competitive inhibition of ³Hspiperone binding to D2 dopamine receptors in striatal homogenates by organic calcium channel antagonists and polyvalent cations. *Eur. J. Pharmacol.* 106, 133-139.
- De Vries, DJ; Beart, PM. (1985). Competitive inhibition of [3H]spiperone binding to D-2 dopamine receptors in striatal homogenates by organic calcium channel antagonist and polyvalent cations. *Eur J Pharmacol.*;106(3):133-139.

-
- Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DMS-IV). Fourth Edition. American Psychiatric Association.
- Dini, S; Caselli, GF; Ferrari, MP; Giani, R; Clavenna, G. (1991). Heterogeneity of [3H]-mepyramine binding sites in guinea pig cerebellum and lung. *Agents Actions.* ;33(1-2):181-4.
- Doxey JC and Roach AG. (1980). Presynaptic α adrenoceptors; in vitro methods and preparations utilized in the evaluation of agonists and antagonists. *J. Auton. Pharmacol*, 1, 73.
- Dubertret C., Gorwood P., Ades J., Feingold J., Schwartz JC. and Sokoloff P. (1998). Meta-analysis of DRD3 gene and schizophrenia: Ethnic heterogeneity and significant association in caucasians. *Am.J.Med.Genet.*, 81, 318-322.
- Dulawa SC and Geyer MA (2000). Effects of strain and serotonergic agents on prepulse inhibition and habituation in mice. *Neuropharm.*, 39, 2170-2179.
- Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, et al., (2001). Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(12), 6917-69-22.
- El-Ghundi M., Fletcher PJ., Drago J., Sibley D., O'Dowd BF., George SR. (1999). Spatial learning deficit in dopamine D₁ receptor knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* 383, 95-106.
- Escandon, NA; Zimmermann, DC; McCall, RB. (1994). Characterization of the serotonin1A receptor antagonist activity of WAY-100135 and spiperone. *J Pharmacol Exp Ther.*; 268(1):441-7.
- Fannon D, Chitnis X, Doku V et al (2000). Features of structural brain abnormality detected in first-episode psychosis. *Am. J. Psychiatry*, 157(11), 1829-1834.
- Fardé L., Wiesel F., Nordstrom A. and Sedvall G. (1989). D₁- and D₂- dopamine receptor occupancy during treatment with conventional and atypical neuroleptics. *Psychopharmacology*, 99, S28-31.

-
- Farver DK. (2003). Neuroleptic malignant syndrome induced by atypical antipsychotics. *Expert Opin Drug Saf*, 2(1), 21-35.
- Fatemi SH, Earle JA, McMenomy T. (2000). Reduction in Reelin immunoreactivity in hippocampus of subjects with schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *Mol Psychiatry*; 5(6), 654-663.
- Fiorella, D.; Rabin, R.A. and Winter, J.C. (1996). The interaction of clozapine with the metachlorophenylpiperazine (mCPP) discriminative stimulus. *Life Sci.* , 58, 353-358.
- Fone, K.C.; Austin, R.H.; Topham, I.A.; Kennett, G.A. and Punhani,T. (1998). Effect of chronic m-CPP on locomotion, hypophagia, plasma corticosterone and 5-HT_{2C} receptor levels in the rat. *Br. J.Pharmacol.*, 123(8), 1707-1715.
- Fox SH. and Brotchie J. (2000). 5-HT_{2C} receptor antagonists enhance the behavioural response to dopamine D1 receptor agonist in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Eur.J.Pharmacol.*, 398, 59-64.
- García-Osta A., Frechilla D, Del Rio J. (2003). Reduced basal and phencyclidine-induced expresión of heat shock protein-70 in rat prefrontal cortex by the atypical antipsychotic abaperidone. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 27(1): 31-36.
- Gaser C, Nenadic I, Buchsbaum BR, Hazlett EA, Buchsbaum MS (2004). Ventricular enlargement in schizophrenia related to volume reduction of the thalamus, striatum, and superior temporal cortex. *Am J Psychiatry* 161(1), 154-156.
- Gee L, Pearce E, Jackson M. (2003). Quality of life in schizophrenia: A grounded theory approach. *Health & Quality of Life Outcomes*, 1, 31. ([Http://www.hqlo.com/content/1/1/31](http://www.hqlo.com/content/1/1/31)).
- Geyer M.A. (1998). Behavioral studies of hallucinogenic drugs in animals: implications for schizophrenia research. *Pharmacopsychiatry*, 31(S), 73-79.
- Gillespie JS, Maclaren, Pollock D. (1970). A method of stimulating different segments of the autonomic outflow from the spinal column to various organs in the pithed rat and cat. *Br. J. Pharmacol.*, 40, 457-267.

-
- Gillin J, Kaplan J, Wyatt R. (1976). Clinical effects of tryptophan in chronic schizophrenic patients. *Biol Psychiatry*, 11, 635-639.
- Gioanni Y, Thierry A.M., Glowinski J. and Tassin J-P. (1998). α_1 -Adrenergic, D₁, and D₂ Receptors. Interactions in the Prefrontal Cortex: Implications for the Modality of Action of Different Types of Neuroleptics. *Synapse*, 30, 362-370.
- Gottesman I., Shields J. (1982). *Schizophrenia, the epigenetic puzzle*. Cambridge. Cambridge University Press, 209-233.
- Graham F. (1975). The more or less startling effects of weak prestimuli. *Psychophysiol.*, 12, 238-248.
- Green AI, Canuso CM, Brenner MJ, Wojcik JD. (2003). Detection and management of comorbidity in patients with schizophrenia. *Psychiatr. Clin North Am.*26(1), 115-139.
- Greenberg, DA; Prichard, DC; Snyder, SH. (1976). Alpha-noradrenergic receptor binding in mammalian brain: differential labeling of agonist and antagonist states. *Life Sci.*;19(1):69-76.
- Grenhoff, J; Svensson, TH. (1993). Prazosin modulates the firing pattern of dopamine neurons in rat ventral tegmental area. *Eur J Pharmacol*, 233 79-84.
- Grimm JW, See RE. (1998). Unique activation of extracellular striato-pallidal neurotransmitters in rats following acute risperidone. *Brain Res.*, 801, 182-189.
- Grohmann R., Schmidt L.G., Spieb-Kiefer C. and R  ther E. (1989). Agranulocytosis and significant leucopenia with neuroleptic drugs: results from the AM  P program. *Psychopharmacology*. 99: S109-112.
- Grossman, CJ; Kilpatrick, GJ; Bunce, KT. (1993). Development of a radioligand binding assay for 5-HT₄ receptors in guinea-pig and rat brain. *Br J Pharmacol.*;109(3):618-24.
- Gurevich EV, Bordelon Y, Shapiro RM, Arnold SE et al., (1997). Mesolimbic dopamine D₃ receptors and use of antipsychotics in patients with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry*, 54, 225-232.

-
- Gurevich, VV; Richardson, RM; Kim, CM; Hosey, MM; Benovic, JL. (1993). Binding of wild type and chimeric arresting to the m2 muscarinic cholinergic receptor. *J Biol Chem.*; 268(23):16879-82.
- Halbreich U and Kahn LS. (2003). Hormonal aspects of schizoprenias: an overview. *Psychoneuroendocrinology* 28, 1-16.
- Hall RC, Gardner ER, Popkin MK et al., (1981). Unrecognized phsysical illness prompting psychiatric admission: a prospective study. *Arch.Gen Psychiatry*, 138, 629-635.
- Harrison PJ. (1999). The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*, 122(4), 593-624.
- Harrison PJ, Freemantle N, Geddes JR. (2003). Meta-analysis of brain weight in schizophrenia. *Schiz. Res.*, 64(1), 25-34.
- Harrison PJ & Owen MJ. (2003). Genes for schizophrenia? Recent findings and their pathophysiological implications. *The Lancet*, 361, 417-419.
- Heckers S and Konradi C. Hippocampal neurons in schizophrenia. *J. Neural Transm.*, 109(5-6), 891-905.
- Hemsley KM and Crocker AD. (2001). Changes in muscle tone are regulated by D₁ and D₂ dopamine receptors in the ventral striatum and D1 receptors in the substantia nigra. *Neuropsychopharm*, 25, 514-526.
- Highley JR, Walker MA, Crow TJ et al. (2003). Low medial and lateral right pulvinar volumes in schizophrenia. A postmortem sutdy. *Am. J.Psychiatry* 160(6), 1177-1179.
- Himei A, Koh J, Sakai J, et al., (2002). The influence on the schizophrenic symptoms by the DRD2 Ser/Cys311 and -141C Ins/Del polymorphisms. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 56(1),97-102.
- Hoyer, D; Engel, G; Kalkman, HO. (1985). Molecular pharmacology of 5-HT₁ and 5-HT₂ recognition sites in rat and pig brain membranes: radioligand binding studies with [3H]5-HT, [3H]8-OH-DPAT,(-) [125I]iodocyanopindolol, [3H]mesulergine and [3H]ketanserin. *Eur J Pharmacol.*; 118(1-2):13-23.

-
- Ichikawa J. and Meltzer HY. (1995). DOI, a 5-HT_{2A/2C} agonist, potentiates amphetamine-induced dopamine release in rat striatum. *Brain Research.*, 698, 204-208.
- Ito K., Arinami T., Futamura N., Hamaguchi H., Toru M. (1993). A structural polymorphism of human dopamine D2 receptor, D2 (Ser³¹¹-Cys). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 196, 1369.
- Jablensky, A. (2000). Epidemiology of schizophrenia: the global burden of disease and disability. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*; 250(6):274-85.
- Josselyn SA; Miller R., Beninger RJ (1997). Behavioral effects of clozapine and dopamine receptor subtypes. *Neurosci. & Behav. Rev.*, 21(5), 531-558.
- Kaltwasser MT. (1990). Acoustic signaling in the black rat (*Ratus rattus*). *Physiol. Behav.* 48, 13-17.
- Kane, JM. (1985). Antipsychotic drug side effects: their relationship to dose. *J Clin Psychiatry*; 46 (5Pt 2):16-21.
- Kapur S., Zipursky R.B., Remington G. (1999) Clinical and theoretical implications of 5-HT₂ and D₂ receptor occupancy of Clozapina, Risperidona and Olanzapina in schizophrenia. *Am.J. Psychiatry* 156, 286-293.
- Kapur S. (2003). Psychosis as a state of aberrant salience : a framework linking biology, phenomenology, and pharmacology in schizophrenia. *Am.J. Psychiatry*, 160, 13-23.
- Katerina Z, Andrew K, Filomena M, Xu-Feng H. (2003) Investigation of M1/M4 muscarinic receptors in the anterior cingulate cortex in schizophrenia, bipolar disorders and major depression disorders. *Neuropsychopharm.*, advanced Online, Dec 17, doi :10.1038.
- Kawanishi Y, Tachikawa H, Suzuki T (2000). Pharmacogenomics and schizophrenia. *Eur.J. Pharmacol.* 410, 227-241.
- Keefe RS, Silva SG, Perkins DO et al (1999). The effects of atypical antipsychotic drugs on neurocognitive impairment in schizophrenia : a review and meta-analysis. *Schizophr. Bull.*, 25, 201-222.

-
- Killian JG, Kerr K, Lawrence C, Celermajer DS. (1999). Myocarditis and cardiomyopathy associated with clozapine. *Lancet*, 354 (9193):1841-1845.
- Kim J., Kornhuber H., Schimdt-Burgk W. and Holzmüller B. (1990). Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci. Lett.*, 20, 379 - 382.
- Kinon B. and Lieberman J. (1996). Mechanisms of action of atypical antipsychotic drugs: A critical analysis. *Psychopharmacology*, 124, 2 - 34.
- Kirch DG (1993). Infection and autoimmunity as aetiological factors in schizophrenia : a review and reappraisal. *Schizophr Bull.*, 19, 355-370.
- Knapp M. (1997). Costs of schizophrenia. *Br. J. Psychiatry*, 171, 509-518.
- Koh PO, Bergson C, Undie As, Goldman PS, Lidow MS (2003). Up-regulation of the D1 dopamine receptor-interacting protein, calcyon, in patients with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 60(3), 311-319.
- Koran LM, Sox HC, Marton KI et al.,(1989). Medical evaluation of psychiatric patients. I. Results in state mental health system. *Arch. Gen. Psychiatry*, 46, 733-74.
- Kroeze WK, Hufeisen SJ, Popadak BA et al (2003). H1-histamine receptor affinity predicts short-term weight gain for typical and atypical antipsychotic drug. *Neuropsychopharmacology* 28(3), 519-526.
- Kruzich PJ. and See R. (2000). An evaluation of the role of 5-HT₂ receptor antagonism during subchronic antipsychotic drug administration in rats. *Brain Res.* 875, 35-43.
- Kuczenski R and Segal DS. (1999). Sensitization of amphetamine-induced stereotyped behaviours during the acute response: role of D1 and D2 dopamine receptors. *Brain Res.*, 822, 164-74.
- Lacroix LP, Hous ME, Shah AJ, et al. (2003). Selective antagonism at dopamine D3 receptors enhances monoaminergic and cholinergic neurotransmission in the rat anterior cingulate cortex. *Neuropsychopharmacology*, 28(5), 839-849.

-
- Lahti AC, Koffil B, Laorte D, Tamminga CA. (1995). Subanesthetic dose of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacol.*, 13, 9-19.
- Lahti, RA; Evans, DL; Stratman, NC; Figur, LM. (1993). Dopamine D4 versus D2 receptor selectivity of dopamine receptor antagonists: possible therapeutic implications. *Eur J Pharmacol.*; 236(3):483-486.
- Lambert TJR, Velakoulis D, Pantelis C. (2003). Medical comorbidity in schizophrenia. *Med. J. American*, 178, S67-S70.
- Largent, BL; Gundlach, AL; Snyder, SH. (1986). Pharmacological and autoradiographic discrimination of sigma and phencyclidine receptor binding sites in brain with (+)-[3H]SKF 10,047, (+)-[3H]-3-[3-hydroxyphenyl]-N-(1-propyl)piperidine and [3H]-1-[1-(2-thienyl)cyclohexyl]piperidine. *J Pharmacol Exp Ther*; 238(2):739-48.
- Laurelle M, Abi-Dargham A, Van Dyck CH, et al. (1996). Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc. Natl Acad Sci USA*, 93, 9235-924.
- Lehrmann E, Hyde TM, Vawter MP, Becker KG, Kleinman JE, Free WJ (2003). The use of microarrays to characterize neuropsychiatric disorders: postmortem studies of substance abuse and schizophrenia. *Curr. Mol Med.*, 3(5), 437-446.
- Lerich L, Schwartz JC, Sokoloff P. (2003). The dopamine D3 receptor mediates locomotor hyperactivity induced by NMDA receptor blockade. *Neuropharm.* 45, 174-181.
- Levant B. (1997). The D3 dopamine receptor: Neurobiology and potential clinical relevance. *Pharm. Rev.*, 49(3), 231-252.
- Leysen JE, Niemegeers CJ, Van Nueten JM, Laduron PM. (1981). [³H]Ketanserin (R41468), a selective ³H ligand for serotonin₂ receptor binding sites. *Mol. Pharmacol.*, 21, 301-304.
- Leysen, JE; Niemegeers, CJ; Van Nueten, JM; Laduron, PM. (1982). [3H]Ketanserin (R 41 468), a selective 3H-ligand for serotonin₂ receptor binding sites. Binding properties, brain distribution, and functional role. *Mol Pharmacol.*;21(2):301-14.

-
- Lidow MS, Williams GV, Goldman-Rakic PS (1998). The cerebral cortex: a case for a common site of action of antipsychotics. *Trends Pharmacol Sci*, 19, 136140.
- Lidow MS, Song ZM, Castenr SA, Allen PB, et al. (2001). Antipsychotic treatment induces alterations in dendrite- and spine-associated proteins in dopamine rich areas of the primary cerebral cortex. *Biol Psychiatry*, 49(1), 1-12.
- Lieberman J., Johns C., Pollack S., Masian S., Bookstein P., Cooper T., Iadorola M. and J.Kane. (1993). Biochemical effects of Clozapina in cerebrospinal fluid of patients with schizophrenia. In: Tamminga C. and Schulz S. (eds). *Schizophrenia Research*, vol 1, New York, Raven Press, pp 341-349.
- Liljequist S., Ossowaka K. and Anden N. (1991). Effect of the NMDA receptor antagonist, MK-801, on locomotor activity and on the metabolism of dopamine in various brain areas of mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1991, 195, 55 - 61.
- Lipska BK and Weinberg DR.(1997). Novel research strategies in the pharmacology of schizophrenia. *Drugs of Today*, 33(2), 103-113.
- Liu, H. et al. (2002) Genetic variation at the 22q11 PRODH2/DGCR6 locus presents an unusual pattern and increases susceptibility to schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(6): 3717
- Lucas G., Deurwaerdere P., Cacci, S. and Spampinato U. (2000). The effect of serotonergic agents on Haloperidol-induced striatal dopamine release *in vivo*: opposite role of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptor subtypes and significance of the Haloperidol dose used. *Neuropharmacology*, 39, 1053-1063.
- Lundstrom K et al. (1996). Proposed schizophrenia-related gene polymorphism: expression of the Ser9Gly mutant human dopamine D3 receptor with the Semliki Forest virus System. *Biochem Biophys Res Comm.*, 225, 1068-1072.
- Luthin, GR; Wolfe, BB. (1984). Comparison of [3H]pirenzepine and [3H]quinuclidinylbenzilate binding to muscarinic cholinergic receptors in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther.*; 228(3):648-55.

-
- MacKenzie, RG; Steffey, ME; Manelli, AM; Pollock, NJ; Frail, DE. (1993). A D1/D2 chimeric dopamine receptor mediates a D1 response to a D2-selective agonist. *FEBS Lett.*; 323(1-2):59-62.
- Maes, M.; van West, D.; De Vos, N. et al. (2001). Lower baseline plasma cortisol and prolactin together with increased body temperature and higher mCPP-induced cortisol response in men with pedophilia. *Neuropsychopharmacology*, 24(1), 37-46.
- Malaspina D, Harlap S, Fenning S, Heiman D, et al., (2001). Advancing paternal age and the risk of schizophrenia. *Arch Gen. Psychiatry*, 58(4), 361-367.
- Marcus M., Nomikos G.G. and Svensson T.H. (2000). Effects of Atypical Antipsychotic Drugs on Dopamine Output in the Shell and the Core of Nucleus Accumbens: role of 5-HT_{2A} and α_1 -adrenoceptor antagonism. *Eur. J. Pharmacol.*, 10, 245-253.
- Mayorga AJ, Trevitt JT, Conlan A, Gianutsos G, Salamone JD (1999). Striatal and nigral D1 mechanisms involved in the antiparkinsonian effects of SKF 82958 (APB): studies of tremulous jaw movements in rats. *Psychopharmacology*, 143, 72-81.
- McLeod RL, Aslanian R, del Prado M, Duffy R et al. (1998). SCH 50971, an orally active histamine H₃ receptor agonist, inhibits central neurogenic vascular inflammation and produces sedation in the guinea pig. *J. Pharmacol Exp Ther*, 287(1), 43-50.
- Meltzer HY, Davidson M, Glassman AH, Vieweg WV (2002). Assessing cardiovascular risks versus clinical benefits of atypical antipsychotic drug treatment. *J. Clin Psychiatry*, 63(9), 25-29.
- Meltzer HY. (1999) The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharm.*, 21, 106S-115S.
- Meltzer HY and McGruk S. (1999). The effects of clozapine, risperidone and olanzapine on cognitive function in schizophrenia. *Schiz. Bull.* 25(2), 233-255.
- Meltzer HY., Matsubara S. and Lee J. (1989). Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2, and serotonin₂ pki values. *J.Pharmacol. Exp. Ther.*, 251: 238-246.

-
- Meltzer LT., Christoffersen CL and Serpa KA. (1997). Modulation of dopamine neuronal activity by glutamate receptor subtypes. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 21, 511-518.
- Millan MJ, Audinat V, Melon C, Newman-Tancredi A. (1995). Evidence that dopamine D₃ receptors participate in clozapine-induced hypothermia. *Eur J Pharmacol*, 280, 225-229.
- Millan M.J., Brocco M., Rivet J.M, Audinot V., Newman-Tancredi A., Maiofiss L., Queriaux S., Despaux N., Peglion J.L. and A. Dekeyne (2000). S18327 (2-{2-[4-(6-Fluoro-1,2-benzisoxazol-3-yl)piperid-1-yl]ethyl}3-phenyl imidazolin-2-one), a Novel, Potential Antipsychotic Displaying Marked Antagonist Properties at α_1 - and α_2 -Adrenergic Receptors: II. Functional Profile and a Multiparametric Comparison with Haloperidol, Clozapina, and 11 other Antipsychotic Agents. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 292, 54-66.
- Mita T, Hanada S, Nishino N, et al. (1986). Decreased serotonin S₂ and increased dopamine D₂ receptors in chronic schizophrenics. *Biological Psychiatry*, 21,1407-14014.
- Mizuguchi, H; Fukui, H; Yabumoto, M; Wada, H. (1978). The binding of [3H]mepyramine to histamine H₁ receptors in guinea-pig brain. *J Neurochem.*; 31(4):997-1004.
- Möhler H et al. (2001). GABA_A-receptor subtypes: a new pharmacology. *Curr. Op. Pharmacol.* 1:22-25.
- Morpurgo C. (1965). Antiparkinson drugs and neuroleptics. In: progress in brain research - horizons in neuropsychopharmacology. Eds w. A. Himwich and j. P. Schade. (elsevier, new york)., Vol.15, p.121.
- Mukaetova-Ladinska EB, Hurt J, Honer WG, Harrington CR, Wisclen CM. (2002). Loss of synaptic but not cytoskeletal proteins in the cerebellum of chronic schizophrenics. *Neurosci Lett.*, 317(3), 161-165.
- Murray RM and Lewis SW. (1987). Is schizophrenia a neurodevelopmental disorder?. *British Medical J.*, 295, 681-682.
- Nasif FJ, Cuadra GR, Ramirez OA (2000). Effects of chronic Risperidona on central noradrenergic transmission. *Eur J Pharmacol.*, 384, 101-109.

-
- Obuchowickz E. (1999). Differential behavioral effect of quinpirole in neuroleptic-pretreated rats-role of α_1 -adrenoceptors. *Eur J Pharmacol.*, 394, 67-33.
- OECD (Organization for Economic Co-operation and Development)-Council Directive, 1986. Anexo II 86/609/EEC.
- Oerher S and Ahlenius S. (2000). Atypical antipsychotics and dopamine D₁ receptor agonism: an in vivo experimental study using core temperature measurements in the rat. *J Phamacol & Exp Ther*, 292, 731-736.
- O'Keefe CD, Noordsy DL, Liss TB, Weiss H. (2003). Reversal of antipsychotic-associated weight gain. *J. Clin. Psychiatry* 64(8), 907-912.
- Palfreyman MG, Charles V, Blander J. (2002). The importance of using human-based models in gene and drug discovery. *Drug Disc World*, fall volume, 33-44.
- Peroutka SJ and Snyder SH. (1980). Relationship of neuroleptic drug effects at brain dopamine, serotonin, α -adrenergic, and histamine receptors to clinical potency. *Am.J.Psychiatry*, 137, 1518-1522.
- Peroutka, SJ. (1986). Pharmacological differentiation and characterization of 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{1C} binding sites in rat frontal cortex. *J Neurochem.*; 47(2):529-40.
- Peyron C, Luppi PH, Fort P, Rampon C, Jouvet M (1996). Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 364, 402-413.
- Pickar D., Owen R., Litman R., Konicki E., Gutierrez R. and M. Rapaport (1992). Clinical and biologic response to Clozapina in patients with schizophrenics. Crossover comparison with fluphenazine. *Arch. Gen. Psychiatry*, 49, 345-353.
- Pierri JN, Volk CL, Auh S, Sampson A, Lewis DA (2001). Decreased somal size of deep layer 3 pyramidal neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*, 58(5), 466-473.

-
- Pratt, GD; Bowery, NG. (1989). The 5-HT₃ receptor ligand, [3H]BRL 43694, binds to presynaptic sites in the nucleus tractus solitarius of the rat. *Neuropharmacology*; 28(12):1367-76.
- Prinssen EPM., Koek W., Kleven MS. (2000). The effects of antipsychotics with 5-HT_{2C} receptor affinity in behavioural assays selective for 5-HT_{2C} receptor antagonist properties of compounds. *Eur.J. Pharmacol.*, 388:57-67.
- Protais, P., Costentin, J. and Schwartz, J.C. (1976). Climbing behaviour induced by apomorphine in mice: a simple test for dopamine receptors in striatum. *Psychopharmacology*, 50: 1-6.
- Rajkowska G, Halaris A, Selemon LD (2001). Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorders. *Biol Psychiatry*, 49(9), 741-752.
- Rana BK, Shiina T, Insel PA. (2001). Genetic variations and polymorphisms of G protein-coupled receptors: functional and therapeutic implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 593-624.
- Reavill C., Kettle A., Holland V., et al. (1999). Attenuation of haloperidol-induced catalepsy by 5-HT_{2C} receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.*, 126, 572-574.
- Richelson E. (1999). Receptor Pharmacology of Neuroleptics: Relation to Clinical Effects. *J.Clin Psychiatry*, 60 (suppl 10):5-14.
- Richelson, E. and Souder, T. (2000). Binding of antipsychotic drugs to human brain receptors. Focus on newer generation compounds. *Life Sci.*, 68, 29-39.
- Rigdon GC. (1990). Differential effects of apomorphine on prepulse inhibition of acoustic startle reflex in two rat strains. *Psychopharmacol.*, 102, 419-421.
- Rigdon GC and Viik K. (1991). Prepulse inhibition as a screening test for potential antipsychotics. *Drug Dev. Res.*, 23, 91-99.

-
- Roth RM, Flashman LA, Saykin AJ, McAllister TW, Vidaver R (2004). Apathy in schizophrenia: reduced frontal lobe volume and neuropsychological deficits. *Am J Psychiatry* 161(1), 157-159.
- Rowley M, et al. (2001). Current and novel approaches to the drug treatment of schizophrenia. *J. Med. Chem.*, 44(4), 477.
- Ruat, M; Traiffort, E; Arrang, JM; Tardivel-Lacombe, J; Diaz, J; Leurs, R; Schwartz, JC. (1993). A novel rat serotonin (5-HT₆) receptor: molecular cloning, localization and stimulation of cAMP accumulation. *Biochem Biophys Res Commun.*; 193(1):268-76.
- Rupniak NMJ, Kilpatrick G, Hall MD, Jenner P, Marsden CD. (1984). Differential alterations in striatal dopamine receptor sensitivity induced by repeated administration of clinically equivalent doses of haloperidol, sulpiride or clozapine in rats. *Psychopharmacol.*, 84, 512-519.
- Salmi P and Ahlenius S (1996). Further evidence for clozapine as a dopamine D₁ receptor agonist. *Eur. J. Pharmacol.*, 307, 27-31.
- Savas HA, Unal B, Erbagci H, Inaloz S et al. (2002). Hippocampal volume in schizophrenia and its relationship with risperidone treatment: a stereological study. *Neuropsychobiology*, 46(2), 61-66.
- Sawa A and Snyder H. (2002). Schizophrenia: Diverse approaches to a complex disease. *Science*, 296, 692-695.
- Schwartz J-C., Diaz J., Pilon C., Sokoloff P. 2000. Possible implications of the dopamine D₃ receptor in schizophrenia and in antipsychotic drug actions. *Brain Res. Rev.*, 31, 277-287.
- Scheepers F.E., Gispen de Wied C.C. and Khan, R.S. (2000). The effects of Olanzapina on neuroendocrine responses induced by the serotonin agonist m- chlorophenylpiperazine (m-CPP). *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 10(3), S132-S134.
- Scherk H, Vogeley K, Falkai P (2003). The importance of interneurons in schizophrenic and affective disorders. *Fortschr. Neurol Psychiatr.* 71(suppl1), S27-S32.

-
- Schmidt CJ, Sorensen SM, Kehne JH, Carr AA, Palfreyman MG. (1995). The role of 5-HT_{2A} receptors in antipsychotic activity. *Life Sci.*, 56(25), 2209-2222.
- Schotte A, Janssen PFM, Gommersen W, Luyten WH, Van Gompel P, Lesage AS, De Loore K., Leysen JE. (1996). Risperidona compared with new and reference antipsychotic drugs: *in vitro* and *in vivo* receptor binding. *Psychopharmacology*, 124, 57-73.
- Sporn AL, Greenstein DK, Gogtay N, Jeffries NO et al. (2003). Progressive brain volume loss during adolescence in childhood onset schizophrenia. *Am. J. Psychiatry*, 160(12), 2181-2189.
- Schultz, SK; Andreasen, NC. (1999). Schizophrenia. *Lancet.*; 353(9162):1425-30.
- Schwartz, JC ; Diaz, J ; Pilon, C ; Sokoloff, P. (2000). Possible implications of the dopamine D₃ receptor in schizophrenia and in antipsychotic drug actions. *Brain Res Rev.*, 31, 277-287.
- Seeman P (2002). Atypical antipsychotic: mechanism of action. *Can J. Psychiatry*, 47(1), 27-38.
- Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K (1976). Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature*, 261, 717-719.
- Seeman, P and Van Tol, HH. (1993). Dopamine D₄ receptors bind inactive (+)-apomorphines, suggesting neuroleptic role. Sulpiride not stereoselective. *Eur J Pharmacol.*; 233(1):173-4.
- Shafer RA and Levant B. (1998). The D₃ dopamine receptor in cellular and organismal function. *Psychopharmacology*, 135, 1-16.
- Sharma T and Antonova L. (2003). Cognitive function in schizophrenia. Deficits, functional consequences and future treatment. *Psychiatr. Clin N Am.* 26, 25-40.
- Shen, Y; Monsma, FJ Jr; Metcalf, MA; Jose, PA; Hamblin, MW; Sibley, DR. (1993). Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype. *J Biol Chem.*; 268(24):18200-4.

-
- Sokoloff BP (1998). Expression of NMDAR1, GluR1, GluR7, and KA1 glutamate receptor mRNAs is decreased in frontal cortex of 'neuroleptic-free' schizophrenics: Evidence of reversible up-regulation by typical neuroleptics. *J. Neurochem.*, 71, 2454-2464.
- Sokoloff P, Diaz J, Levesque D, Pilon C, Dimitiadou V, Griffon N et al. (1995). Novel dopamine receptor subtypes as targets for antipsychotic drugs. *ANN. NY ACAD SCI*, 757, 278-292.
- Sokoloff P; Andrieux M; Besancon R; Pilon C; Martres MP; Giros B; Schwartz JC. (1992). Pharmacology of human dopamine D3 receptor expressed in a mammalian cell line: comparison with D2 receptor. *Eur J Pharmacol.*; 225(4):331-7.
- Stefansson H, Sigurdsson E, Steinhorsdottir V et al., (2002). Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am J. Hum. Genet.*, 71,877-892.
- Straub RE, Jian Y, MacLean CJ et al (2002). Genetic variation in the 6p22.3 gene DTNBP1, the human ortholog of the mouse dysbindin gene, is associated with schizophrenia. *Am J Hum. Genet.*, 71, 337-348.
- Suvisaari J, Mautemps N, Haukka J, Hovi T, Lonnqvist J. (2003). Childhood central nervous system viral infections and adult schizophrenia. *Am J. Psychiatry*, 160(6), 1183-1185.
- Suzuki A, Kondo T, Otani K et al. (2001). Association of the TaqI A polymorphism of the dopamine D2 receptor gene with the predisposition to neuroleptic malignant syndrome. *Am. J. Psychiatry* 158(10), 1714-1716.
- Swerdlow NR and Geyer MA. (1998). Using an animal model of deficient sensorimotor gating to study the pathophysiology and new treatments of schizophrenia. *Schiz. Bull.*, 24(2), 285-301.
- Swerdlow NR, Varty GB, Geyer MA. (1998). Discrepant findings of clozapine effects on prepulse inhibition of startle: is it the route or the rat?. *Neuropsychopharm.*, 18, 50-56.
- Swerdlow NR, Braff DL, Geyer MA. (2000). Animal models of deficient sensorimotor gating: what we know, what we think to know, and what we hope to know soon. *Behav. Pharmacol.*, 11, 185-204.

-
- Tarazi FI, Baldessarini RJ, Kula NS, Zhang K. (2003). Long-term effects of olanzapine, risperidone and quetiapine on ionotropic glutamate receptor types: Implications for antipsychotic drug treatment. *J. Pharmacol. & Exp. Therap.*, 306, 1145-1151.
- Thacker GK and Carpenter WT. (2001). Advances in Schizophrenia . *Nat. Med.*, 7(6), 692.
- Timmermans, PB; Ali, FK; Kwa, HY; Schoop, AM; Slothorst-Gridijk, FP; Van Zwieten, PA. (1981). Identical antagonist selectivity of central and peripheral alpha 1-adrenoceptors. *Mol Pharmacol.*; 20(2):295-301.
- Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, Wayland M, Feeman T, Jones PB, Starkey M, Webster MJ, Yolken RH, Bahn S (2003). Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorders. *Lancet*, 362, 798-805.
- To, ZP; Bonhaus, DW; Eglen, RM; Jakeman, LB. (1995). Characterization and distribution of putative 5-HT₇ receptors in guinea-pig brain. *Br J Pharmacol*; 115(1):107-16.
- Traiffort, E; Leurs, R; Arrang, JM; Tardivel-Lacombe, J; Diaz, J; Schwartz, JC; Ruat, M. (1994). Guinea pig histamine H₁ receptor. I. Gene cloning, characterization, and tissue expression revealed by in situ hybridization. *J Neurochem.*; 62(2):507-18.
- Van Rossum JM (1966). The significance of dopamine receptor blockade for the mechanism of action of neuroleptic drugs. *Arch Int Pharmacodyn Ther.*, 160, 492-494.
- Van Tol, HH; Bunzow, JR; Guan, HC; Sunahara, RK; Seeman, P; Niznik, HB; Civelli, O. (1991). Cloning of the gene for a human dopamine D₄ receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature.*; 350(6319):610-4.
- Verdoux H, Geddes JR, Takei N, Lawrie SM et al. (1997). Obstetric complications and age of onset in schizophrenia: An international collaborative meta-analysis of individual patient data. *Am. J. Psychiatry*, 154(9), 1220-1227.
- Wadenberg ML, Hertel P, Fernholm R., Hygge Blakeman K, Ahlenius S and Svensson TH, (2000). Enhancement of antipsychotic-like effects by combined treatment with the α_1 -adrenoceptor antagonist prazosin and the dopamine D₂ receptor antagonist raclopride in rats. *J. Neural Transm.*, 107, 1229-1238.

-
- Wadenberg ML, Soliman A, VanderSpek SC, Kapur S. (2001b). Dopamine D(2) receptor occupancy is a common mechanism underlying animal models of antipsychotics and their clinical effects. *Neuropsychopharm.*, 25(5), 633-641.
- Wadenberg ML., Browning JF., Young KA., Hicks PB. (2001a). Antagonism at 5-HT_{2A} receptor potentiates the effect of Haloperidol in a conditioned avoidance response task in rats. *Pharm. Biochem & Behav.*, 68, 363-370.
- Williams J, Spurlock G, McGuffin P, Mallet J, Nothen MM, Gill M, Aschauer H, Nylander PO, Macciardi F, Owen MJ. (1996). Association between schizophrenia and T102C polymorphism of the 5-hydroxytryptamine type 2a-receptor gene. European Multicentre Association Study of Schizophrenia (EMASS) Group. *Lancet* 347, 1294-1296.
- Wilmot CA and Szczepanik AM (1989). Effects of acute and chronic treatments with clozapine and haloperidol on serotonin (5HT₂) and dopamine (D₂) receptors in the rat brain. *Brain Res.*, 487, 288-298.
- Wong AHC., Buckle CE., Van Tol HHM. (2000). Polymorphisms in dopamine receptors: what do they tell us?. *Eur. J. Pharmacol.*, 410, 183-203.
- Yamamura, HI; Manian, AA; Snyder, SH. (1976). Muscarinic cholinergic receptor binding: influence of pimozone and chlorpromazine metabolites. *Life Sci.* 1;18(7):685-91.
- Zhelyazkova-Savova, M.D. and Negrev, N. (2000). Isoteoline, a putative serotonin antagonist, inhibits meta- chlorophenylpiperazine, but not 1-(2,-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane and 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetraline –induced increase of serum prolactin levels. *Pharmacol. Res.*, 42(1), 93-99.
- Zhong H and Minneman K.P (1999). α_1 -Adrenoceptor subtypes. *Eur J Pharmacol.*, 375, 261-276.

Links a Webs relacionadas con esquizofrenia o receptores implicados.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

National Institute of Mental Health

<http://www.nimh.nih.gov/research/genetics.htm>

http://www.psychguides.com/gl-treatment_of_schizophrenia_1999.html

<http://www.schizophrenia.com/>

Mental Health InfoSource: Schizophrenia

<http://www.mhsource.com/schizophrenia/>

National Alliance for the Mentally Ill (NAMI)

<http://www.nami.org>

National Alliance for Research on Schizophrenia and Depression

<http://www.narsad.org>

National Mental Health Association

<http://www.nmha.org>

Schizophrenia Genetics Initiative

<http://www-grb.nimh.nih.gov/gi.html>

World Fellowship for Schizophrenia and Allied Disorders

<http://www.world-schizophrenia.org>

