



Proyecciones de la corteza prefrontal a los núcleos monoaminérgicos del mesencéfalo: vías y receptores implicados.

Tesis Doctoral presentada por
Pablo Ernesto Vázquez Borsetti

Barcelona, Junio de 2008

**TRABAJO PRESENTADO PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA POR
LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA, PROGRAMA DE DOCTORADO DE
NEUROCIENCIAS (Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica, Facultad
de Medicina, Universidad de Barcelona)**

DEPARTAMENTO DE NEUROQUÍMICA Y NEUROFARMACOLOGÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS DE BARCELONA (IIBB)
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)

Directores:

Dr. Francesc Artigas Pérez

Profesor de Investigación del CSIC

Dra. Roser Cortés Colomé

Investigadora Científica del CSIC

Firmado: Pablo Ernesto Vázquez Borsetti

Barcelona, Junio de 2008

Este trabajo ha sido financiado con los siguientes proyectos:

- Control de la actividad de las neuronas serotoninérgicas y noradrenérgicas por la corteza prefrontal. Modulación por fármacos antidepresivos. CICYT SAF 2001-2133.
- Monoaminergic neurotransmission in prefrontal cortex. Target for augmentation strategies in schizophrenia. SENY Fundació.
- Papel de la corteza prefrontal en la fisiopatología de la esquizofrenia y acción terapéutica de fármacos antipsicóticos. CICYT (SAF2004-05525).

Y ha sido realizado con la ayuda de las siguiente beca predoctorales:

- Beca de Formación de Personal Universitario, Ministerio de Educación y Ciencia.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. LA CORTEZA PREFRONTAL	1
1.2 La corteza prefrontal en primates	1
1.3 La corteza prefrontal en la rata	2
1.4 La corteza prefrontal dorsolateral	3
1.5 La corteza prefrontal medial	3
1.6 La corteza prefrontal orbital	3
1.7 Proyecciones	3
1.7.1 Aferencia	4
1.7.2 Eferencias	5
1.7.2.1 Coproyecciones.....	5
1.8 Función	6
1.8.1 Función de la región dorsolateral	6
1.8.2 Función de la región orbital	7
1.8.3 Función de la región medial	8
2. NEUROTRANSMISIÓN SEROTONÉRGICA	9
3. NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA	10
4. RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS	12
5. ENFERMEDADES PSIQUIÁTRICAS (LA ESQUIZOFRENIA)	13
5.1 Antipsicóticos y modelos experimentales de la esquizofrenia	14
II. OBJETIVOS	17

III. MÉTODOS

1. ANIMALES	23
1.1 Coordenadas estereotáxicas	23
2. EXPERIMENTOS DE ELECTROFISIOLOGÍA	23
3. ESTUDIOS DE TRAZADO	24
3.1 Perfusión	25
3.2 Inmunofluorescencia indirecta (en portas)	25
4. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA EN TEJIDO EN SUSPENSIÓN	27
5. HIBRIDACIÓN IN SITU COMBINADA CON INMUNOHISTOQUÍMICA	28
5.1 Oligonucleótidos.	28
5.2 Marcaje radiactivo de oligonucleótidos	28
5.3 Purificación de las sondas marcadas	28
5.4 Hibridación	28
5.5 Combinación con inmunohistoquímica no fluorescente	29
5.6 Tratamiento fotográfico	30

IV. RESULTADOS

Trabajo 1	33
------------------------	----

Simultaneous projections from prefrontal cortex to the ventral tegmental area and dorsal raphe in the rat

Trabajo 2	62
------------------------	----

Pyramidal neurons in rat prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area and dorsal raphe nucleus express 5-HT_{2A} receptors

Trabajo 3	97
------------------------	----

Differential expression of AMPA receptor subunits in serotonergic and dopaminergic neurons of the dorsal raphe and ventral tegmental area of the rat

V. DISCUSIÓN	126
---------------------------	-----

1.1 Discusión general	126
1.2 Consideraciones funcionales	126
1.3 Consideraciones metodológicas	129
1.4 Esquizofrenia y antipsicóticos	131
VI. CONCLUSIONES	134
VI. BIBLIOGRAFÍA	138

Abreviaturas

5-HT	serotonina
ADN	ácido desoxiribonucleico
AI	corteza agranular insular
AID	corteza agranular insular, parte dorsal
AIV	corteza agranular insular, parte ventral
AMPA	ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
AOM	núcleo olfativo anterior, medial
AOV	núcleo olfativo anterior, ventral
ARN	ácido ribonucleico
ATV	área tegmental ventral
cc	cuerpo calloso
Cg	área cingulada
CLZ	clozapina
CM	núcleo centromedial del tálamo
COMT	catecol-O-metiltransferasa
CPFm	corteza prefrontal medial
DA	dopamina
DAB	3,3-diaminobenzidina
DISC	alterado-en-esquizofrenia (gen)
CTB	Subunidad B de la toxina colérica
CPFdl	corteza prefrontal dorsolateral
DOI	1-(2,5-dimetoxi-4-yodofenil)-2-aminopropano
GABA	ácido gamma-aminobutírico
GAD	descarboxilasa del ácido glutámico
GluR1	Subunidad 1 del receptor de glutamato
GluR2/3	Subunidad 2/3 del receptor de glutamato
IL	corteza infralímbica
KA	kainato
LC	locus coeruleus
L-DOPA	L-dihidroxifenilalanina
OL	corteza orbital lateral
LSD	dietilamida de ácido D-lisérgico
MD	núcleo mediodorsal del tálamo
MFB	medial forebrain bundle (haz medial proencefálico)
MOp	área motora primaria

MOs	área motora secundaria
NA	núcleo accumbens
NMDA	N-metil-D-aspartato
NR	núcleos del rafe
OB	bulbo olfatorio
CPFo	corteza prefrontal orbital
ORB	corteza orbital
PCP	fenciclidina
PL	corteza prelímbica
RD	núcleo dorsal del rafe
Re	núcleo talámico reuniens
Rh	núcleo talámico romboide
SN	substantia nigra
TdT	deoxinucleotidil transferasa terminal
TH	Tirosina hidroxilasa
TPH	Triptófano hidroxilasa
VLO	corteza orbital ventrolateral
VO	corteza orbital ventral

INTRODUCCIÓN

I. Introducción:

1. El lóbulo frontal.

El lóbulo frontal es una de las estructuras más desarrolladas del sistema nervioso central de los humanos, abarcando un tercio de la corteza cerebral, su gran desarrollo es un rasgo característico de los primates. Desde un punto de vista evolutivo, la tendencia parece haberse dirigido a un aumento en el tamaño y la importancia relativa de esta estructura perteneciente al neocórtex. Por ejemplo, en el caso de la corteza prefrontal (CPF), que corresponde a la porción más rostral del lóbulo frontal, el aumento fue de 10 veces en el humano con respecto al macaco y mil veces con respecto al ratón.

Además de la CPF, el lóbulo frontal (LF) está conformado por otras estructuras como el área precentral que está ubicada en la superficie medial del hemisferio, y que incluye el área motora secundaria (área 6 de Brodmann) y el área motora primaria (área 4 de Brodmann). En primates la estimulación de esta área produce movimientos de los miembros inferiores, la estimulación de la parte media produce movimientos de las extremidades superiores y tronco y la estimulación de la parte inferior produce movimientos de la cabeza y cuello.

Otra área incluida en el LF es el área motora suplementaria (también denominada área 6 de Brodmann) que no tiene una participación tan directa en el movimiento como la anterior.

En el LF también encontramos el campo ocular frontal que controla los movimientos oculares voluntarios y el área del lenguaje hablado descubierta por Paul Broca (áreas 44, 45 de Brodmann) formando parte de la CPF, la cual se describe en el próximo apartado. Existe especialización entre hemisferios y esto se ve claramente en esta función, ya que el hemisferio dominante, que suele ser el izquierdo, tiene tendencia a involucrarla.

1.1 La corteza prefrontal.

Anteriormente definida por criterios citoarquitectónicos y actualmente definida por criterios conectivo-funcionales, corresponde al área cortical que recibe proyecciones del núcleo medial dorsal del tálamo (MD) (Rose y Woolsey, 1947). Es una corteza de asociación que recibe información de la mayoría de las estructuras del cerebro y las procesa de una forma compleja. Esto queda evidenciado en parte en el hecho de que las neuronas piramidales de esta corteza tengan en promedio 23 veces más espinas dendríticas que una neurona piramidal de la corteza sensorial. La función de la CPF será desarrollada con mayor profundidad en un apartado específico, sin embargo para definirla debemos saber que está implicada en una gran cantidad de procesos cognitivos: la memoria operativa o de trabajo, las funciones ejecutivas, la toma de decisiones, la planificación del comportamiento y el procesamiento de señales emocionales son solo algunos de los aspectos en los que participa esta estructura.

1.2 La corteza prefrontal en primates.

La corteza prefrontal de los primates, ha sido subdividida en 3 regiones o redes, una red dorsolateral (CPFdl) de carácter cognitivo, una red orbital (CPFo) de relevancia a nivel emocional, y una red medial (CPFm) de carácter visceral-motor, las dos últimas muchas veces son tenidas en cuenta juntas por sus similitudes y su importancia en procesos socio-emocionales (Amodio y Frith, 2006).

Brodmann destacó que sus mapas del mono y del ser humano no eran idénticos (Brodmann, 1903). Él observó que las homologías entre ambas especies no son claras en las regiones prefrontal y cíngula. En el mapa humano, la CPFm es ocupada principalmente por las áreas 24, 25, 32 y 10, aunque Brodmann indicó particularmente que el área 32 no era homóloga al área 32 del mono.

La corteza prefrontal de monos contiene áreas intermedias, granular y agranular. Las áreas orbital y medial posteriores presentan 5 capas agranulares, mientras que el área orbital central presenta una capa IV incipiente y se la puede llamar intermedia. Finalmente, las áreas orbitales y mediales más rostrales son completamente granulares al igual que el área dorsolateral.

1.3 La corteza prefrontal en la rata.

La CPF de rata está subdividida en tres zonas generales: la lateral, que incluye el área insular agranular dorsal (AID), y el área insular ventral (AIV). La orbital que incluye, la orbital lateral (ol) la orbital ventral (ov) y orbital medial (om). La CPFm que se puede dividir en cingulado (Cg), Prelímbico (PL) e infralímbico (IL).

Si bien todas estas áreas emiten y reciben proyecciones desde el MD, cabe aclarar que su relación con otras estructuras cerebrales puede ser muy diversa por lo que no es de extrañar que también se hayan encontrado diferencias funcionales.

La característica citoarquitectónica más importante de la corteza prefrontal de la rata es que está compuesta exclusivamente de áreas corticales agranulares a diferencia de las estructuras homólogas presentes en los primates. Por este motivo Brodmann consideró que los roedores no tenían una corteza frontal comparable a la de los humanos.

Posteriormente, se realizaron estudios que demostraron la existencia de proyecciones desde el MD hacia regiones corticales en la rata, cumpliendo así con el requisito neuroanatómico que definió a la corteza prefrontal en primates. De acuerdo con este criterio, la corteza prefrontal incluye la corteza medial ventral y lateral (Goldman-Rakic and Porrino, 1985; Groenewegen, 1988; van Eden et al., 1998).

Uylings publicó una revisión en el año 2003 donde se discute la existencia o no de una CPF en la rata, según el autor existirían correlaciones anatómico-funcionales entre algunas áreas de la CPF del roedor con la de los primates, en particular la dorsomedial se asemejaría a la CPFdl de los primates

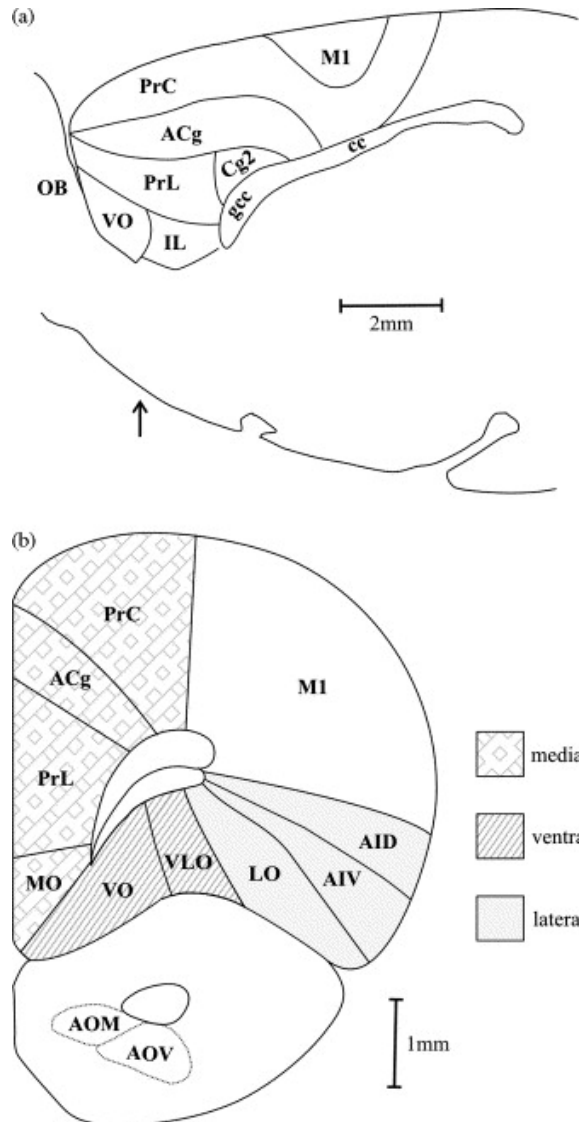


Figura 1: Diagramas de la corteza prefrontal de rata. a) sección sagital, 0.9 LL. b) Sección coronal unilateral, -3.5 AP rostral a bregma (representado por la flecha vertical). Los diferentes sombreados muestran tres subdivisiones de la corteza prefrontal (medial, ventral y lateral); AID y AIV, corteza insular dorsal y ventral; AOM y AOV, núcleo olfatorio anterior medial y ventral; cc, cuerpo caloso; ACg, corteza cingulada anterior; gcc, genu del cuerpo caloso; MO, LO, VLO y VO corteza orbital medial, lateral, ventrolateral y ventral; M1, área motora primaria; PrC, área motora secundaria; OB, bulbo olfatorio; PL, corteza prelímbica (Dalley, 2004)

A partir del patrón de proyecciones de la zona PL e IL se deduce que la primera participaría más en las funciones límbico-cognitivas (homólogas a la CPFdl de

primates). Ambas áreas, pero más la IL, proyectan a regiones que controlan la actividad autónoma/visceromotora. La estimulación de estas áreas produce cambios en la presión sanguínea, la respiración, la motilidad gastrointestinal y el ritmo cardíaco. Y además parecen estar implicadas en la modulación de comportamientos relacionados con el miedo (Milad y Quirk, 2002; Morgane et al., 2005). También participarían en tareas de atención, de selección de respuesta y memoria operativa (Brown and Bowman, 2002). Las lesiones en el área PL producen déficit en tareas de respuesta retardada, al igual que las lesiones dorsolaterales en primates (Delatour y Gisquet-Verrier, 1999; Delatour y Gisquet-Verrier, 2000).

1.4 La corteza prefrontal dorsolateral.

En primates corresponde a las áreas de Brodmann 9 y 46 según un criterio restrictivo. Es la parte "cognitiva" de la corteza prefrontal. Esta corteza recibe información de todas las modalidades sensoriales y de las áreas premotora y orbital (Groenewegen and Uylings, 2000), tiene un gran número de conexiones con estructuras motoras no primarias del lóbulo frontal medial (área motora suplementaria, presuplementaria y cingulada rostral), y lateral (corteza premotora), así como con el cerebelo y el colículo superior.

1.5 La corteza prefrontal medial.

En la rata, incluye la región cingulada anterior (Cg1), área prelímbica (PL) y el área infralímbica (IL). En primates algunos autores utilizan la nomenclatura anterior, para evitar confusiones aclaramos que esta ubicación es ocupada por las áreas Brodman 24 y 25. En ambos grupos estas áreas emiten una gran cantidad de proyecciones a los núcleos subcorticales que generan el alerta conductual, también llamados Sistema Ascendente Activador. Destacándose en este sentido las proyecciones recíprocas al hipotálamo, por su importancia en la vigilia, atención y

generación de respuestas emocionales, su relación con el estrés y su posible influencia en respuestas hormonales. Así, la corteza prefrontal medial no sólo controla las respuestas vegetativas corporales, sino que también controla la propia función cortical a través de su acción sobre estos sistemas (Saper, 2000; Floyd et al., 2001).

El área prelímbica es el lugar de convergencia de proyecciones procedentes de hipocampo, el núcleo amigdalino, la corteza entorrinal y el área infralímbica hacia la corteza prefrontal es por esto que se la identifica junto con la corteza orbital como dominio límbico de la corteza prefrontal, en el caso de esta estructura es fácil relacionar su patrón de conexiones con su función (Groenewegen and Uylings, 2000).

1.6 La corteza prefrontal orbital.

En primates esta estructura corresponde a las áreas de Brodmann 11, 12, 13 y 14. Se subdivide a su vez, en regiones lateral (OL), ventrolateral (VL) y medial (OM), que parecen ocupar las mismas áreas en primates y en humanos. Además la ínsula agranular también forma parte de esta red orbital. Una de las características de la CPFo de primates es la presencia de áreas intermedias o disgranulares.

1.7 Proyecciones.

La CPF está fuertemente interconectada con muchas estructuras tanto corticales como subcorticales, y por regla general se trata de conexiones recíprocas.

Algunos autores han propuesto que esta característica de la CPF es la base de la memoria de trabajo ya que podría generar un sistema reverberante que mantendría activa la información por cortos periodos de tiempo, sobre todo teniendo en cuenta su relación con áreas corticales de asociación sensoriales y otras áreas tales como el hipocampo y la corteza entorrinal (Funahashi, 1989; GoldmanRakic, 1995). Por otro lado, las áreas sensoriales y motoras primarias parecen no estar interconectadas con la CPF (Fuster, 1997).

La información procesada por la CPF es transmitida a las estructuras corticales a través de las poblaciones de neuronas situadas en capas profundas, fundamentalmente las neuronas piramidales de la capa 5, en general la mayoría de las eferencias de CPFm proceden de esta capa incluso en el caso de las estructuras subcorticales. Una excepción son las proyecciones al tálamo que se encuentran mayoritariamente en capa VI y a la amígdala basolateral, el estriado y el núcleo acumbens que, además de recibir proyecciones de capa V, reciben proyecciones de capa II (Gabbott et al., 2005).

1.7.1 Aferencias.

Como se ha comentado anteriormente, el rasgo distintivo de la CPF es la abundante innervación que recibe desde el MD. Lo cual, sumado a observaciones funcionales, ha permitido localizar de este área en un gran número de especies donde la estructura no necesariamente se encontraba en la misma ubicación. Otra característica de estas proyecciones es su organización topológica definida.

El MD no es el único núcleo del tálamo que proyecta a la CPF, esta última recibe proyecciones de todos los núcleos mediales del tálamo como por ejemplo los núcleos paratenial, paraventricular, intermedio-dorsal, romboide y reuniens y los núcleos intralaminares (Hsu and Price, 2007).

Otra importante entrada excitadora proviene del sistema límbico. Tanto la amígdala como el hipocampo emiten un gran número de proyecciones a la CPF, sobretudo a la CPFom (Krettek and Price, 1977). Otra estructura límbica que proyecta a la CPF es el hipotálamo pero a diferencia de las dos anteriores la entrada excitadora suele estar

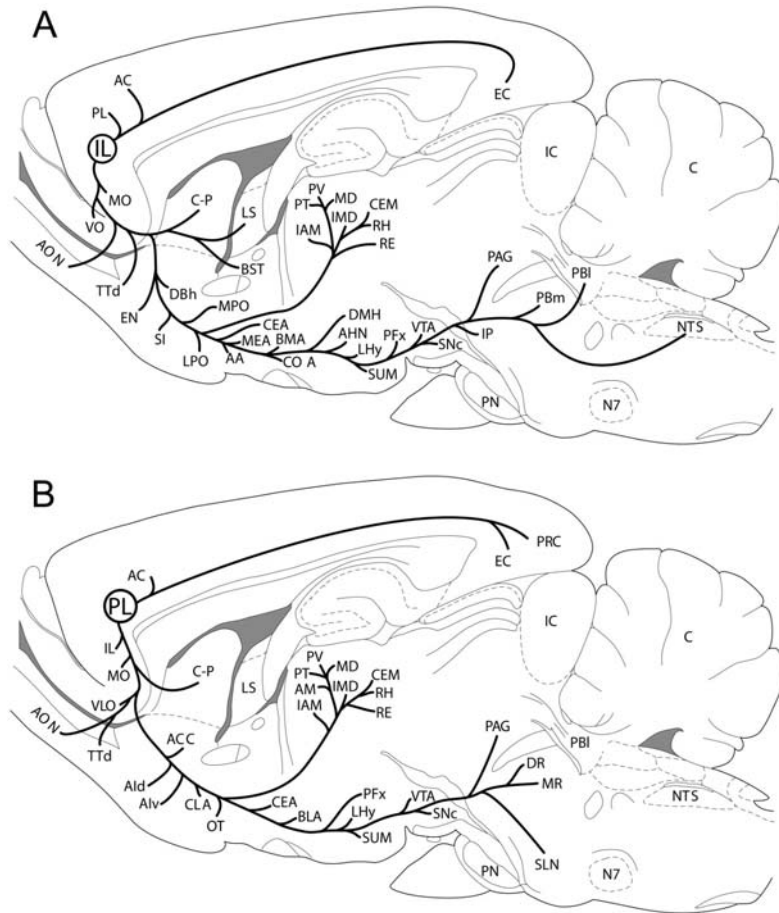


Figura 2: esquema de proyecciones desde la PL y el IL de la rata. (Vertes 2004).

mediada por otros transmisores además del glutamato, como por ejemplo hipocretina/orexina (Barbas and Blatt, 1995).

La CPF recibe multitud de entradas de distintas zonas de la corteza, lo que es coherente con la función de una corteza asociativa. El número de interconexiones aumenta a medida que se asciende en el grado de integración de la información sensorial, otro factor que destaca la característica de corteza asociativa es que la información de distintas modalidades sensoriales, visión, oído, gusto, convergen en las mismas zonas o por lo menos zonas aledañas. También cabe destacar que la CPF presenta una abundante innervación provenientes de la propia CPF, con un

importante aporte proveniente del hemisferio contralateral. La CPF también recibe información de zonas corticales vinculadas con la memoria tales como la corteza entorrinal y piriforme (Fuster, 1997). La CPFdl recibe proyecciones de las cortezas motora frontal, CPFo, CPFm, parietal, temporal y cingulada. Además recibe información visual de el lóbulo occipital, somatosensorial de los lóbulos parietales y auditiva de los temporales (Ongur and Price, 2000).

Es difícil encontrar un área en el cerebro que no reciba proyecciones desde los núcleos aminérgicos del mesencéfalo y la CPF no es una excepción ya que recibe aferencias serotoninérgicas del DR, Noradrenérgicas del LC y Dopaminérgicas y GABAérgicas del ATV (Carr and Sesack, 2000a).

Por último la CPF también recibe proyecciones del tronco del encéfalo (Fuster, 1997).

1.7.2 Eferencias.

Ya comentamos esta característica de la CPF de establecer proyecciones recíprocas, por lo cual las eferencias de la estructura serán mayormente las mismas que las

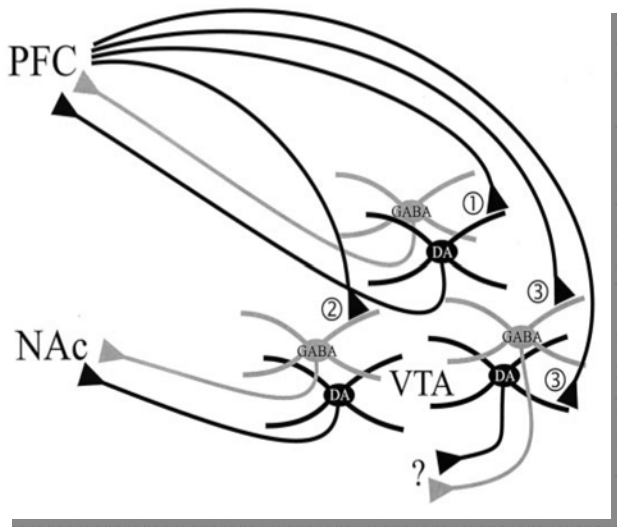


Figura 3: esquema de conexiones recíprocas entre la CPF y el ATV, además se incluye el patrón de estas conexiones en cuanto a la invasión del ATV hacia el NA (Carr and Sesack, 2000).

aferencias, una excepción a esta regla son los ganglios basales, ya que la CPF no parece recibir aferencias del núcleo acumbens.

A nivel subcortical, se sabe que la CPF proyecta a los ganglios basales, al tálamo, al hipotálamo, a la habénula (otra estructura que rompe la regla de la proyecciones recíprocas), a los núcleos aminérgicos del mesencéfalo (NR, LC, ATV, LDT), la amígdala y al hipocampo (Berendse and Groenewegen, 1991; Groenewegen et al., 1997; Groenewegen and Uylings, 2000).

La CPF también puede modular la actividad de las neuronas dopaminérgicas a través de una vía indirecta que pasa por el núcleo acumbens y el pálido ventral o a través de la modulación colinérgica que realiza el LDT y PPt (Floresco et al., 2003).

Trabajos de trazado y microscopía electrónica muestran que la CPF inerva neuronas dopaminérgicas que vuelven a la CPF y neuronas GABAérgicas que proyectan al núcleo acumbens con un alto grado de especificidad (figura 3) (Carr and Sesack, 2000b).

Otros estudios de trazado retrógrado en ratas indican que todas las zonas de la CPFm (Cg, PL e IL) y la CPFo proyectan, en mayor o menor grado, al RD (Sesack et al., 1989; Peyron et al., 1998).

La CPFm no es homogénea en cuanto a proyecciones, por ejemplo, el IL proyecta al séptum lateral, al núcleo del lecho de la estría terminal, núcleo preóptico lateral y medial, a la sustancia innominada y al núcleo endopiriforme del cerebro anterior, a los núcleos medial, basomedial y lateral de la amígdala, al hipotálamos y a los núcleos parabaraquial y solitario del tronco de encéfalo.

El área prelímbica emite escasas proyecciones a estas estructuras salvo en el caso de la amígdala basolateral, los blancos más abundantes para las proyecciones desde el área prelímbica son la corteza agranular insular, el claustrum, el núcleo acumbens, el tubérculo olfatorio, los núcleos paraventricular, mediodorsal y reuniens del tálamo, la parte capsular del núcleo central de la amígdala y los núcleos mediales y dorsales del rafe. De esta forma el patrón de proyecciones del IL indicaría una importante función en el

control visceral de forma similar a lo observado para la corteza prefrontal orbitomedial de los primates, mientras que el PL proyecta a áreas más relacionadas con funciones cognitivas por lo que podría tener homología con la corteza dorsolateral de los primates, ver figura 2 (Hurley et al., 1991; Vertes, 2004). En una revisión de Price (2007) también se relaciona la corteza OL de la rata con la corteza orbital de humanos.

1.7.2.1 Coproyecciones.

La utilización de técnicas de trazado de vías ha abierto la posibilidad de estudiar desde una perspectiva histológica la bifurcación de axones.

De esta forma la utilización de distintos trazadores como pueden ser el fluoro gold (Schmued and Heimer, 1990) o la subunidad b de la toxina colérica (CTB) (Luppi et al., 1987) ha permitido que muchos autores encontraran que algunas neuronas de la CPFm proyectan a más de una estructura y en otros casos confirmaran los resultados obtenidos por electrofisiología donde se sugerían estas bifurcaciones axonales. Algunas de las duplas encontradas incluyen: el RD y el LC, la amígdala basolateral (ABL) y el acumbens, ABL y séptum, ABL y la sustancia gris periacueductal (PAG), ABL y el estriado, el estriado y la espina dorsal (ED), la ED y el MD, ED y el hipotálamo lateral, núcleo de tracto solitario (NTS) y PAG, NTS y núcleo parabraquial, NTS y ED (Thierry et al., 1983; Neafsey et al., 1986; Gabbott et al., 2005; Lee et al., 2005).

1.8 Función.

Siempre se ha considerado al lóbulo frontal como el área del cerebro más relevante para la inteligencia. Desde este punto de vista, es paradójico que los pacientes con lesiones frontales presenten una inteligencia normal en las pruebas psicométricas. Actualmente resulta evidente que funciones complejas, como la inteligencia, no residen en un área concreta cerebral, sino que son el resultado de múltiples conexiones neuronales que forman redes entre diversas regiones

corticales y subcorticales. A pesar de esto, las lesiones en la CF producen una marcada disminución en ciertas capacidades que llevan al entorno de los pacientes a percibirlos como poco inteligentes, esto puede ser debido a que las actividades que más se resienten estén vinculadas con la interacción social y la personalidad.

La CPF está implicada en una gran cantidad de procesos cognitivos, como la memoria operativa o de trabajo, las funciones ejecutivas, en la toma de decisiones, la planificación del comportamiento y el procesamiento de señales emocionales.

En particular se conoce que la capacidad de mantener la actividad sostenida de un grupo de neuronas es la base de la memoria a corto plazo o memoria de trabajo. La misma tiene la función de retener provisionalmente información durante periodos cortos de tiempo (del orden de segundos) para llevar a cabo una acción posterior. Se distingue de la memoria semántica, en la que se produce una "consolidación" permanente de la información para luego almacenarse en circuitos neuronales y en la que está implicada la formación hipocampal, y tiene otro rasgo distintivo en el hecho de que sea necesaria la síntesis proteica y la formación de nuevas sinapsis. La función de la memoria operativa, en cambio, depende sólo de mantener un circuito determinado activado o "reverberando" por unos segundos.

La CPF parece no ser muy importante cuando se trata de llevar a cabo tareas simples, automáticas o que ya estén incorporadas por haberse repetido una gran cantidad de veces. Al contrario, parece ser importante cuando se precisa cierta flexibilidad por ejemplo al cambiar una conducta estereotipada por una nueva.

La mayoría de las funciones de este área fueron descubiertas gracias a pacientes que sufrieron lesiones, ya sea, por derrames cerebrales, tumores o accidentes. Por este motivo se explicará cual es el cuadro que se observa en estos pacientes cuando hable de cada área en particular

1.8.1 Función de la región dorsolateral.

Estudios en primates demostraron la existencia de neuronas, en la corteza prefrontal, que sólo descargan en los periodos en los que el animal tiene que concentrarse e inhibir respuestas incorrectas en espera de la respuesta adecuada. Quedó así de manifiesto el papel de la CPFdl en memoria de trabajo (Goldman-Rakic, 1996; Fuster, 1997).

Las lesiones en este área, principalmente en las áreas 9 y 10 de Brodmann, suelen producir el Síndrome dorsolateral frontal o síndrome disejecutivo. Se podría decir que este síndrome afecta fundamentalmente la capacidad para generar estrategias, siendo los pacientes mucho más perseverativos. Otra característica es que los pacientes desarrollan dificultades en la planificación de sus actos y en la formación de conceptos. Las alteraciones intelectuales incluyen trastornos en las siguientes funciones:

Disminución de la función ejecutiva, la capacidad predicativa, planear acciones y tomar decisiones para alcanzar un objetivo, de focalizar la atención en ello, de analizar los resultados y cambiar de táctica si es preciso, y no entretenerse con estímulos irrelevantes.

Disminución de la memoria de trabajo sin afectar su capacidad para almacenar información a largo plazo.

Dificultad para ordenar acontecimientos temporalmente y para seguir una secuencia por ejemplo verbal o motora.

Reducción de la fluidez de lenguaje, los pacientes pueden hablar pero tienen dificultades para generar palabras y para comprender estructuras gramaticales tanto en el lenguaje oral como escrito. Estos pacientes tienden a hablar poco y se observan anomalías en pruebas con tareas específicas. También se observa escasa fluidez a la hora de realizar dibujos espontáneamente y dificultades para copiar figuras complejas, esto puede ser debido a la implementación de una mala estrategia (Goel et al., 1997; Dimitrov et al., 1999; Koechlin et al., 1999).

Defecto en la programación motora, problemas para realizar tareas motoras alternantes o recíprocas con las manos. Los pacientes pueden presentar una disociación

entre sus respuestas verbales y motoras (Canavan et al., 1985).

Alteración del comportamiento, los pacientes con lesión dorsolateral tienden a aparecer apáticos, lentos, inatentos, desmotivados, distraídos, dependientes del ambiente, sin concretar la atención y carentes de curiosidad. La depresión es frecuente cuando la lesión está ubicada en el hemisferio izquierdo (Soares and Mann, 1997).

1.8.2 Función de la región orbital.

La corteza orbitofrontal forma parte del sistema límbico (Nauta, 1971) y tiene que ver con la adecuación con respecto al momento y la intensidad de las respuestas emocionales. Las lesiones en esta zona, especialmente en las áreas basales 11 y 12 de Brodmann, producen desinhibición e impulsividad y afectan de forma contundente la personalidad del individuo.

Por este motivo, a la sintomatología de las lesiones en este área se las llama síndrome orbitofrontal o de cambio de personalidad.

Los pacientes suelen ser desinhibidos, no tener en cuenta las normas sociales, con un mal control de los impulsos, incapaces de inhibir respuestas incorrectas y reiterativas.

Muchos presentan una tendencia a imitar a los que los rodean o a tocar y utilizar todos los objetos que tienen a su alcance en estos casos se dice que los pacientes desarrollan una conducta de imitación y utilización. Además de observarse una pérdida de autonomía (Lhermitte et al., 1986). También se describe que las lesiones en este área afectan el sentido del humor (Shammi and Stuss, 1999).

Al contrario de los pacientes con lesión dorsolateral, los que tienen una lesión basal parecen eufóricos, o incluso maníacos en ciertos casos. Esto es más frecuente en pacientes con lesiones derechas, pudiendo llegar a presentar un trastorno obsesivo-compulsivo (TOC). Cabe destacar que existen varios estudios que relacionan esta región con los trastornos obsesivos compulsivos sin necesidad de que el paciente presente algún tipo de lesión en el área (Aycicegi et al., 2003).

1.8.3 Función de la región medial.

La CPFm está involucrada tanto en procesos cognitivos como vicermotores (Verberne and Owens, 1998; Uylings et al., 2003) Está muy relacionada con la corteza orbital, a tal punto que en muchos trabajos son tenidas en cuenta juntas con el nombre de corteza orbitomedial, sin embargo, como se ha descrito anteriormente, esta estructura se encuentra más relacionada con el sistema de recompensa y toma de decisiones comparativas (Groenewegen et al., 1993; Schoenbaum et al., 2003).

Esta región tiene múltiples conexiones con regiones motoras y una función motora importante, sin embargo también está fuertemente relacionada con tareas cognitivas y emocionales. Las áreas 24 25 y 33 de Brodmann parecen jugar un rol determinante en el afecto, seguramente vinculado al gran número de conexiones que tienen con estructuras como la amígdala y la sustancia gris periacueductal. Además de regular funciones autonómicas y endocrinas, está involucrado con el aprendizaje emocional, en la expresión hablada de las emociones, su evaluación y su vinculación con estímulos externos. Una

actividad alta de la corteza cingulada está asociada tanto a tics como a trastornos obsesivo compulsivos.

El síndrome apatía y mutismo. Se puede producir por una lesión en cualquier parte de la corteza prefrontal medial pero sobretodo cuando esta abarca la corteza cingulada.

Un síntoma característico de la lesiones bilaterales del cingulado es el mutismo acinético o abulia, donde el paciente está despierto, pero no responde cuando se le habla y está sumido en una apatía total sin mostrar ningún tipo de emoción. En muchos casos puede hablar y moverse perfectamente y el problema reside en que los estímulos externos no logran motivar una respuesta. Inclusive pueden llegar a mostrar una respuesta reducida al dolor. Otras características son su desmotivación y su falta de interés por las cosas, aunque sean chocantes o nuevas para él (Devinsky et al., 1995). Así como la en el caso de la CPFo, se sabe, que está asociada al TOC, en el caso de la corteza cingulada se han encontrado indicios que la relacionan con trastornos bipolares encontrándose un volumen mayor de esta estructura en este tipo de pacientes (Javadapour et al., 2007).

5-HT_{1A} mRNA

5-HT_{2A} mRNA

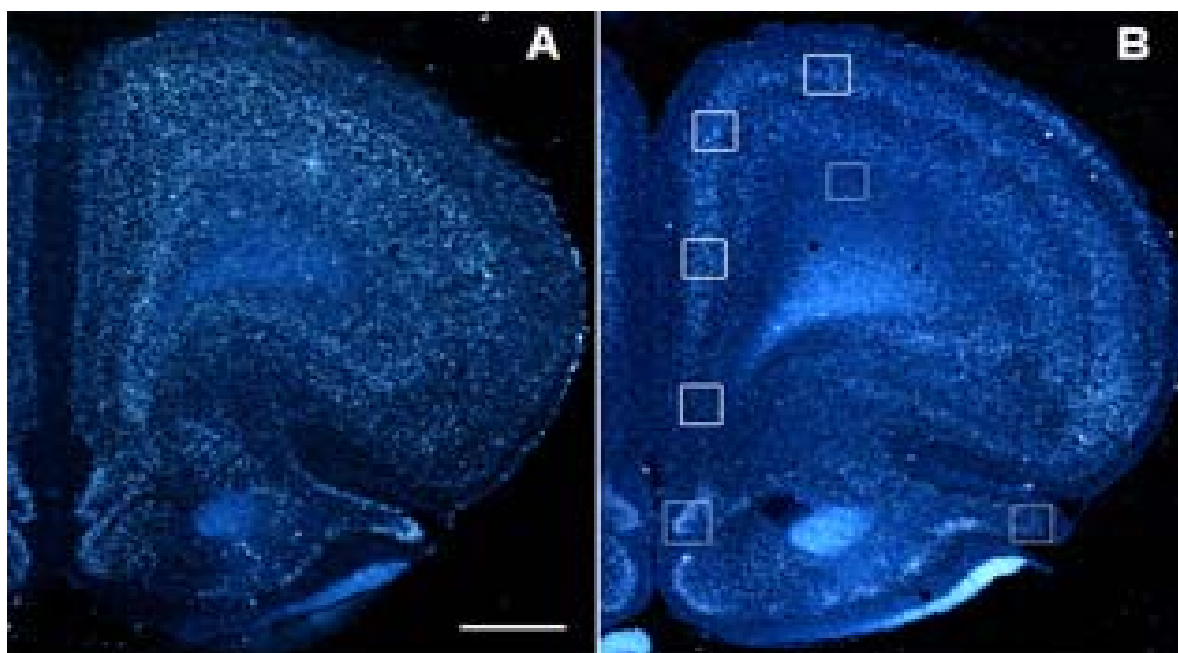


Figura 4: distribución de los mRNAs de los receptores 5-HT_{1A} (A) y 5-HT_{2A} (B) en la CPF de la rata (Santana et al. 2004)

2. NEUROTRANSMISIÓN SEROTONÉRGICA.

La serotonina esta involucrada en multitud de funciones autonómicas centrales tales como la regulación de la presión arterial (de ahí provino su nombre originalmente) el balance de sodio y de glucosa, algunas conductas como la alimentación y el sexo, la nocicepción, cognición, el control del vómito, el mantenimiento de la vigilia y comportamientos afectivos entre otros.

Se han reportado alteraciones serotoninérgicas en enfermedades psiquiátricas como depresión, esquizofrenia, ansiedad, ataques de pánico, trastornos obsesivo-compulsivos (TOC), en los trastornos de la alimentación como la anorexia y la bulimia y en trastornos neurológicos como la migraña (Coccaro et al., 1990).

La liberación de serotonina es proporcional a los niveles intracelulares de esta sustancia y la dinámica de su liberación parece alejarse del modelo cuántico de neurosecreción (Schaechter and Wurtman, 1990).

Los cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas están localizados en el cerebro medio, agrupados en los núcleos del rafe. Hasta el momento se han definido 9 núcleos del rafe: pallidus (B₁), obscurus (B₂), paragiganto cellulari, magnus (B₃), gris central de la medulla oblongata (B₄), pontino medial (B₅), pontino dorsal (B₆), RD (B₇), RM (B₈) y lemniscus medial (B₉), estos núcleos están ubicados en el tronco del encéfalo cerca de la línea media (Dahlström and Fuxe, 1964; Tork, 1990). De todos ellos el más importante en cuanto a número de células es el RD. Los núcleos B₅ a B₉ suelen emitir vías ascendentes dentro del encéfalo y los núcleos B₁ a B₄ suelen emitir proyecciones descendentes. RD y RM proyectan mayormente al cerebro anterior y es notable que siendo un reducido número de neuronas inerve casi la totalidad del cerebro. La vía por la que se propagan estos axones es el nervio intracraneal medial del cerebro anterior, o haz medial del cerebro anterior, que es la principal vía ascendente y descendente de los núcleos

aminérgicos del mesencéfalo hacia y desde la corteza (Kosofsky and Molliver, 1987).

La aferencias del RD fueron estudiadas entre otros por Christelle Peyron (1997), en un trabajo donde se puede encontrar una exhaustiva lista de aferencias a este núcleo, destacándose entre otros, la corteza cingulada infralímbica y orbital, la amígdala, el pálido ventral, de la estría terminal, todas las áreas preópticas, el hipotálamo anterior y la habénula.

Además de neuronas serotoninérgicas se han descrito otros tipos celulares en los núcleos del rafe como neuronas dopaminérgicas (Hökfelt et al., 1976), GABAérgicas (Nanopoulos et al., 1982) y otras que presentan una amplia gama de neuropéptidos (Xu and Hökfelt, 1997).

Es común que las estructuras del encéfalo reciban proyecciones paralelas topográficamente organizadas desde el RD y RM. En la rata la mayoría de los axones serotoninérgicos no están mielinizados y esto influye notablemente en la velocidad en la que se propagan los potenciales de acción (Azmitia and Gannon, 1983). Estas proyecciones no suelen organizarse en sinapsis convencionales, aunque esto puede depender de la zona de la corteza que se analice. La serotonina producida por el RD puede actuar a nivel neuronal pero también a otros niveles celulares dentro del encéfalo, en particular cabe destacar su acción sobre el sistema vascular.

Existen 7 familias de receptores serotoninérgicos (5-HT_{1a7}) y dentro de estas familias existen varios subtipos de receptor. Haremos especial hincapié en algunos subtipos por su abundancia y/o importancia fisiopatológica.

Dentro de los receptores de la familia 5-HT₁, hay 5 subtipos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}) originalmente existía un 5-HT_{1C} pero fue renombrado 5-HT_{2C}. El receptor 5-HT_{1A}, se expresa en todo el sistema nervioso pero especialmente en el hipocampo y en los núcleos de rafe (donde es autorreceptor); es un receptor inhibitorio que se une a proteína G_i e hiperpolariza la membrana a través de la apertura de canales de K⁺ y la modulación negativa de la actividad de la adenilato ciclasa (AC) (Raymond et al., 1999).

En la familia de receptores 5-HT₂, encontramos a 3 subtipos (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}), los tres son receptores de 7 pasos transmembrana que se unen a proteína Gq por lo que activan la cascada de la fosfolipasa C que entre otras cosas aumenta el calcio intracelular, al contrario que los anteriores estos son receptores excitadores y su activación produce despolarización en la célula (Barnes and Sharp, 1999)

El receptor 5-HT_{2A} se encuentra localizado mayoritariamente en la corteza cerebral (figura 4), especialmente en la corteza prefrontal. Está presente en las neuronas piramidales y se localiza preferentemente en el soma y dendrita apical, pero también ha sido encontrado en neuronas GABAérgicas (Santana et al., 2004).

Una característica de este receptor es su rápida regulación negativa, tanto los agonistas como los antagonistas reducen sus niveles en la membrana en cuestión de un par de días (Eison and Mullins, 1995).

En primates, la activación del receptor 5-HT_{2A} prefrontal mejora el desempeño en pruebas específicas para evaluar la memoria de trabajo (Williams et al., 2002). Los agonistas de este receptor son altamente alucinógenos a bajas dosis, influyendo tanto en la percepción como en los estados de ánimo (Nichols, 2004).

La gran mayoría de los antipsicóticos atípicos son antagonistas 5-HT_{2A}, así como agonistas 5-HT_{1A} (Kroeze and Roth, 1998; Meltzer, 1999). Así mismo, se han encontrado alteraciones en el receptor 5-HT_{2A} en trastornos como la depresión clínica y la esquizofrenia (Deutch et al., 1991; Schmidt et al., 1995).

El 5-HT_{2C} es otro receptor de esta familia que está abundantemente distribuido por el cerebro, con una alta concentración en algunas áreas de la corteza como por ejemplo la corteza cingulada, pero también presente en el sistema límbico y en algunas otras zonas específicas del cerebro como los ganglios basales.

Es interesante el hecho de que en humanos la administración de agonistas 5-HT_{2C} agrava algunos problemas como los trastornos afectivos (Kalkman and Fozard, 1991). Estos agonistas también producen una disminución del apetito en ratas.

El receptor 5-HT₄ se expresa en estructuras límbicas del cerebro (como el hipotálamo, el núcleo acumbens, la amígdala y el hipocampo) en las islas de Calleja, tubérculo olfatorio, fundus striati, ventral pálido, estriado, globo pálido, sustancia nigra y en la corteza (Domenech et al., 1994; Vilaro et al., 1996).

La cascada de señalización del receptor 5-HT₄, está mediada por la activación de la proteína Gs que activa la producción de cAMP por la adenilato ciclasa y la posterior activación de la PKA. Éstas vías de señalización producen un efecto excitador en la célula (Ronde et al., 1995).

Estudios farmacológicos han relacionado al 5-HT₄ con el control de las emociones la cognición y la ansiedad. En particular los receptores hipocámpales parecen estar involucrados en la adquisición y consolidación de la memoria y cierta modulación de la actividad locomotora (Silvestre et al., 1996; Buhot, 1997).

Los agonistas serotoninérgicos suelen utilizarse, entre otros tratamientos, como paliativo de algunos síntomas del síndrome orbitofrontal (Sarazin et al., 1998).

3. NEUROTRANSMISIÓN DOPAMINÉRGICA.

La dopamina es uno de los neurotransmisores con mayor relevancia fisiopatológica. Desde su descubrimiento por Carlson se la ha vinculado a multitud de patologías que van desde el ámbito psiquiátrico, si hablamos por ejemplo de esquizofrenia, hasta el ámbito neurológico, si hablamos de la enfermedad de Parkinson. Este neurotransmisor parece jugar un papel fundamental en el funcionamiento del encéfalo, así como es necesario para el correcto funcionamiento de las funciones motoras también es necesario para el correcto funcionamiento de otras áreas del cerebro.

La innervación dopaminérgica de la CPFm proviene predominantemente del ATV. Esta vía pertenece al sistema mesocorticolímbico y se diferencia del otro sistema dopaminérgico, el nigroestriatal, que tiene una función más orientada a la actividad motora.

Además de la CPFm, el sistema mesocorticolímbico está compuesto por el hipocampo, la amígdala y el núcleo acumbens (Thierry et al., 1973; Björklund and Lindvall, 1984; Sesack et al., 1995a). No es de extrañar, por las estructuras involucradas, que este sistema esté implicado en multitud de funciones fisiológicas y también en multitud de procesos patológicos en los que se puede encontrar al estrés, las adicciones y multitud de trastornos neuropsiquiátricos tales como la depresión y la psicosis (Spanagel and Weiss, 1999; Carlsson et al., 2001). Las células dopaminérgicas del sistema mesocorticolímbico parecen estar separadas espacialmente en dos grupos: unas que proyectan al núcleo acumbens en la zona paranigral y que forman el sistema mesoacúmbico o mesolímbico, y las que proyectan al la CPF que están ubicadas en la zona parabraquial y que forman parte del sistema mesocortical. El sistema mesoacúmbico estaría relacionado con el sistema de recompensa y las adicciones, también se especula que podría estar relacionado con la psicosis. En tanto que el sistema mesocortical estaría implicado en la modulación de funciones cognitivas y se especula que podría estar afectado en la esquizofrenia vinculado con los síntomas negativos y cognitivos (Lemoal and Simon, 1991)

La modulación positiva del sistema de la transmisión glutamatérgica en la CPF disminuye la liberación de dopamina en el área en condiciones de estrés (Del Arco and Mora, 2001).

La inervación dopaminérgica en la CPF realiza sinapsis tanto con células piramidales glutamatérgicas como con interneuronas GABAérgicas parvalbúmina positivas (Goldman-Rakic et al., 1989; Sesack et al., 1995b). En pacientes con síndrome disejecutivo se puede mejorar un poco la sintomatología con fármacos que incrementen la actividad dopaminérgica (Campbell et al., 1994).

Se han descrito 5 tipos de receptores dopaminérgicos (D1 a D5) algunos son excitadores (D1 y D5) y se acoplan a proteína Gs, que activa la AC. Otros, en cambio, son inhibidores (D2, D3 y D4) y se

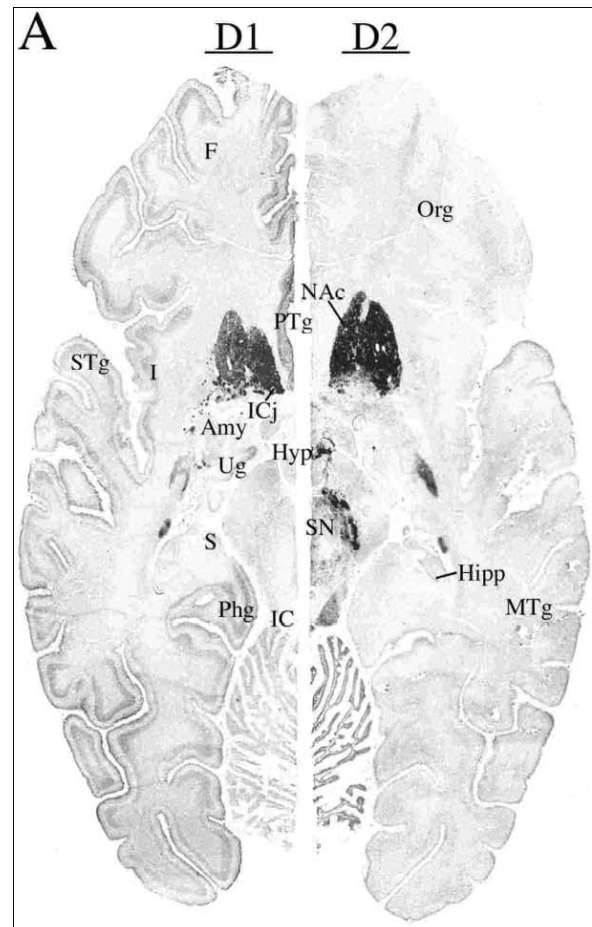


Figura 5: Autorradiografía donde se ve la distribución del receptor D1 (izquierda) y del receptor D2 (derecha) en un cerebro humano a un nivel aproximado de 100 mm desde el vértex. (Hurd et al., 2001).

acoplan a la proteína Gi/o que inhibe la adenilato ciclasa (Civelli et al., 1993) Los receptores de dopamina D1 y D2 se encuentran ampliamente distribuidos por el cerebro, sin embargo el núcleo caudado, el putamen y el NA tienen por mucha diferencia, la mayor proporción de estos receptores. Estudios de hibridación in situ indican que el mensajero de estos receptores puede llegar a expresarse más de 5 veces en el caudado que en estructuras corticales (figura 5) (Hurd et al., 2001).

A su vez la distribución de ambos receptores no suele ser paralela. El receptor D1 está presente en una mayor proporción en estructuras corticales mientras que el

receptor D2 se encuentra en mayor proporción en estructuras subcorticales (ver figura 2), donde el D1 está casi ausente como es el caso de muchas estructuras límbicas, salvo la amígdala, el tálamo y las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo (Hurd et al., 2001; Cortés et al., 1989).

Un estudio de doble marcaje utilizando FG combinado con hibridación *in situ* de los ARNm de los receptores D1 y D2 muestran que muchas de las neuronas de capas V-VI de la CPF que expresan estos receptores son corticocorticales, corticotalámicas y corticoestriatales (Gaspar et al., 1995).

Es destacable a nivel funcional el hecho de que la depleción de la DA prefrontal por 6-OHDA en primate y rata disminuya el correcto desempeño en tareas que involucran memoria operativa y cognición (Brozoski et al., 1979; Simon et al., 1980). También se sabe que el receptor D1 es uno de los que median esta participación dopaminérgica en la memoria de trabajo (Sawaguchi and Goldman-Rakic, 1994).

El resto de los receptores dopaminérgicos (D2, D3 y D4) se encuentra ampliamente distribuido por la corteza, y han sido encontrados en la CPF de primate. Es de destacar que su presencia no es tan marcada en el núcleo acumbens, el putamen y el estriado como ocurría con el D1 y el D2 (Lidow et al., 1998).

4. RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS

Hoy en día se conoce la existencia de 3 familias de receptores de glutamato que actúan a través de la apertura de canales iónicos (NMDA, AMPA y KA), por este motivo se los define como receptores ionotrópicos. Cada una de estas familias tiene características particulares que detallaremos a continuación:

Los receptores AMPA están ampliamente distribuidos por el cerebro y probablemente sean los más importantes en cuanto a transmisión sináptica. Estos receptores forman un canal que permite el paso de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . Además del sitio de unión del glutamato presentan sitios de unión para moduladores positivos como la ciclotiazida y sitios de unión para antagonistas como el NBQX. Son pentaméricos y pueden estar

compuestos por una o por varias de sus subunidades (GluR1-GluR4). Cada una de estas subunidades proviene de un gen que a su vez pueden tener variantes de splicing, como es el caso del GluR4c, que es una variante de del receptor GluR4. La distribución de las subunidades GluR1-4 es heterogénea en el cerebro observándose diferencias incluso entre subunidades. La subunidad GluR2 parece ser esencial en cuanto a la regulación de la permeabilidad al Ca^{2+} , una célula que careciera de esta subunidad permitiría la entrada de Ca^{2+} al recibir una señal glutamatérgica. Estudios de inmunohistoquímica han encontrado al receptor AMPA en el cuerpo de las neuronas de la corteza cerebral, los ganglios basales, el sistema límbico, el tálamo, el cerebelo y el cerebro medio. En la corteza y en el hipocampo se pueden observar neuronas piramidales que contienen las subunidades GluR1 y GluR2/3/4c. Por otro lado algunas células de la corteza que no son piramidales y que tienen proteínas que unen calcio como la calbindina y la parvalbúmina son selectivas para el receptor GluR1. En el estriado también se encuentra un patrón complejo de distribución de subunidades donde no siempre coinciden los distintos subtipos, en esta estructura el GluR1 parece estar presente en células colinérgicas. Esta subunidad también está presente en neuronas dopaminérgicas de sustancia nigra. El subtipo GluR4 ha sido encontrado en glía (astrocitos). En cerebelo también se han encontrado patrones diferenciales para cada subtipo, por ejemplo, las células de Purkinje contienen las subunidades GluR2/3/4c sin que se hayan podido encontrar las subunidades GluR1 y GluR4 (Martín et al., 1993).

Existen datos tanto clínicos como experimentales que sugieren que la modulación positiva de los receptores AMPA puede ser efectiva en el tratamiento de los déficit cognitivos. Los moduladores positivos del receptor incrementan las funciones cognitivas en roedores, mediante un mecanismo aparentemente mediado por una activación del hipocampo. Algo similar se ha observado en ensayos clínicos, donde se ha mejorado la función cognitiva

en pacientes ancianos o con problemas psiquiátricos (O'Neill et al., 2004).

Los receptores NMDA presentan una distribución aún más generalizada que los receptores AMPA, la corteza, el hipocampo y el cerebelo son algunas de las estructuras donde son más abundantes (Moriyoshi et al., 1991).

Los receptores de NMDA también forman un canal que debe estar compuesto por un mínimo de dos subunidades NR1 y dos subunidades NR2, siendo la subunidad NR1 la que forma la parte fundamental del complejo mientras que las subunidades NR2 modifican las propiedades de apertura y el efecto de algunos antagonistas.

Estos receptores tienen dos características muy importantes para su función, el ser canales de calcio y ser regulables por voltaje.

La apertura del canal produce una corriente lenta de Ca^{2+} que entra en la célula y activa distintas cascadas de señalización, algunas de las cuales terminan en generación de nuevas proteínas y que asocian a procesos de plasticidad sináptica. La segunda característica, el ser activable por voltaje, permite que el receptor funcione como un detector de coincidencias ya que la célula solo podrá captar la señal si antes es depolarizada mediante otra señal. Por lo cual este receptor no solo estaría vinculado a la plasticidad sináptica sino también a procesos asociativos, ambos fundamentales para la memoria.

La tercera familia de receptores ionotrópicos está formada por los receptores de kainato, se conocen cinco subunidades de este receptor que han sido clonadas. Para formar canales iónicos funcionales se necesitan al menos tres subunidades (GluR5, GluR6 y GluR7), mientras que las subunidades KA1 y KA2 modifican las propiedades farmacológicas y biofísicas. La expresión de los genes que codifican para el receptor de kainato también está ampliamente distribuida a través del sistema nervioso, incluyendo estructuras como la corteza, el sistema límbico y el cerebelo (Frerking and Nicoll, 2000).

Por último existe una familia totalmente distinta de receptores de glutamato que no forman canales iónicos y que están

acoplados a proteína G, se los llama receptores glutamatérgicos metabotrópicos y se conocen al menos 8 subtipos que han sido clasificados en tres grupos distintos, los subtipos mGlu1 y mGlu5 activan la fosfolipasa C y pertenecen al primer grupo, los subtipos mGlu2 y mGlu3 forman otro grupo que actúan inhibiendo la adenilato ciclasa, al igual que el tercer grupo, que esta formado por los receptores mGlu4, mGlu6, mGlu7 y mGlu8.

El receptor suele estar en forma de homodímero y presenta 2 sitios de modulación ortostéricos para los que se han encontrado fármacos que pueden modular un subtipo determinado de forma específica. Los receptores del grupo 1 suelen estar ubicados en la postsinapsis mientras que los mGlu2 y mGlu3 están localizados pre- y postsinápticamente, los mGluR3 son hallados también en las células gliales. Por otro lado, los del tercer grupo suelen ser presinápticos.

Los receptores mGlu1 se distribuyen abundantemente tanto en el cerebelo, como en el bulbo olfatorio, la región CA3, el tálamo, el giro dentado y PAG. Los mGlu5 se encuentran en las regiones CA1 y CA, en el séptum, en los ganglios basales y la amígdala. Los receptores mGlu2 se encuentran fundamentalmente en el núcleo caudado, hipocampo y giro dentado.

Distintos estudios vincularon estos receptores con la inducción y el mantenimiento de la LTP. Además, últimamente están tomando mucha relevancia como blancos farmacológicos para tratar patologías que van desde la epilepsia hasta la esquizofrenia y la ansiedad (Palucha and PILC, 2007).

5. LA ESQUIZOFRENIA.

Es un trastorno mental caracterizado por la presencia de por lo menos tres grupos de síntomas: Los síntomas positivos o psicóticos que constan de alucinaciones y/o delirios. Los síntomas negativos que involucran problemas afectivos y sociales con tendencia a manifestar depresión y apatía. Y por último los síntomas cognitivos que involucran una disminución de la capacidad intelectual del paciente. Dentro

de la sintomatología cognitiva caben destacar problemas vinculados con la atención, la memoria de trabajo, aprendizaje, fluidez verbal y funciones ejecutivas. Además mientras que los pacientes muestran fluctuaciones con respecto a los síntomas positivos y negativos, los problemas cognitivos permanecen relativamente estables y son evidentes incluso en pacientes que han tenido un solo ataque psicótico y que por lo tanto no han recibido ningún tipo de medicación (Harvey et al., 2003). Generalmente se pueden observar anomalías a nivel cognitivo, con respecto a la interacción social y la función motora antes de que aparezca la enfermedad, sin embargo estos síntomas son de escaso valor predictivo (Niemi et al., 2003). Los primeros episodios de la enfermedad suelen aparecer entre la segunda y la tercera década de vida, sin embargo también puede aparecer en niños o ancianos.

Al momento se desconoce la etiología de la enfermedad, sin embargo existen algunas hipótesis al respecto entre las que se pueden destacar:

La hipótesis dopaminérgica que postula que esta enfermedad es el resultado de un exceso en la actividad de este sistema.

La hipótesis serotoninérgica que postula un exceso en la actividad del sistema serotoninérgico.

Y la hipótesis hipoglutamatérgica que postula una baja actividad en la transmisión glutamatérgica en especial en la que es mediada por receptores de tipo NMDA.

A nivel morfológico se observa una disminución en el número de espinas dendríticas en la CPF de los pacientes, este es un dato que apoya indirectamente la hipótesis hipoglutamatérgica (ver más adelante). A pesar de que las espinas dendríticas que se pierden no tienen porque ser sólo las glutamatérgicas, por su importancia, se especula que es el sistema más afectado (Garey et al., 1994). Otro síntoma de la enfermedad son los problemas relacionados a la memoria de trabajo, estos han sido atribuidos a una disfunción de la CPFdl. En este sentido se sabe que una terapia útil pueden ser la utilización de tareas que incrementen el

desempeño cognitivo de los pacientes (Goldman-Rakic, 1999; Ross et al., 2006).

No son pocas las alteraciones estructurales encontradas en esquizofrenia, entre ellas se puede contar un crecimiento del tercer ventrículo y los ventrículos laterales, reducción en el volumen de las formaciones hipocampales y parahipocampales, así como el subículo, también parece haber una reducción de la CPF. Otras regiones que pueden estar alteradas son el tálamo el cuerpo caloso, el cerebelo y ganglios basales (Goldman-Rakic, 1999; Ross et al., 2006).

Estudios realizados con resonancia magnética funcional han encontrado anomalías en PFCdl, en el lóbulo temporal medial, hipocampo, en el giro parahippocampal, en el cíngulo anterior, en CPFm y la corteza parietal posterior, el estriado, el tálamo y el cerebelo (Niznikiewicz et al., 2003).

Actualmente se manejan algunos datos relevantes acerca de la enfermedad, se sabe que tiene un componente genético y de desarrollo ya que la incidencia de la enfermedad aumenta del 0.5 % y en forma gradual acompañando la proximidad genética hasta un 50% entre gemelos univitelinos, es interesante el hecho de que el acervo genético predisponga enormemente para la enfermedad pero que no sea determinante (Ross et al., 2006).

Se conocen algunos genes que se relacionan con esta susceptibilidad a la enfermedad, *dysbindin*, *neuregulin 1*, *DAOA*, *COMT*, *DISC1* y *DISC2* son sólo algunos de la veintena de genes relacionados. Entre estos genes se encuentra el *GRM3* que codifica para el receptor de glutamato metabotrópico *mGlu3* (Egan et al., 2004; Harrison and Weinberger, 2005). Otro de estos genes, el *DISC1*, (*Disrupted-In-Schizophrenia 1*) que regula la integración de las neuronas nuevas que se generan en el cerebro adulto (Duan et al., 2007).

5.1 Antipsicóticos y modelos experimentales de la esquizofrenia.

Hace 50 años Laboirt, propuso la utilización de la clorpromacina como tratamiento asintomático de la psicosis. El mecanismo de acción de este fármaco se identificó posteriormente con su efecto antagonista sobre el receptor D2 y de esta forma comenzó la hipótesis dopaminérgica de la esquizofrenia. Posteriormente el resto de los antipsicóticos que aparecieron continuaron teniendo como característica principal su efecto anti-D2 (ver tabla 1). Sin embargo en la actualidad esta hipótesis dopaminérgica presenta varios aspectos cuestionables, para empezar, después de 50 años de utilización de esta droga no sólo no se ha curado a ningún paciente con esquizofrenia, si no que tampoco se han encontrado alteraciones en el sistema dopaminérgico causados por la enfermedad (Weinberger, 2007). La hipótesis

domapaminérgica ha sido revisada posteriormente postulándose una hiperactividad en la vía mesolímbica que sería responsable de la sintomatología positiva y una hipoactividad en la vía mesocortical (sobretudo teniendo en cuenta el efecto de la falta de dopamina en la CPF) que sería responsable de los síntomas negativos y cognitivos (Davis et al., 1991). Con la aparición de los antipsicóticos atípicos se dio un proceso similar pero esta vez con el sistema serotoninérgico. Estos fármacos tienen un complejo patrón de unión a receptores, pero coinciden en tener una acción antagonista sobre los receptores 5-HT_{2A} además de la siempre presente acción sobre los receptores D2 (ver tabla 1). La ventaja principal de estos fármacos es una disminución en los efectos secundarios o “extrapiramidales” que incluyen síntomas motores parkinsonianos y elevados niveles de prolactina en sangre. Además, también suelen presentar una pequeña acción

Table 1 Relative neurotransmitter receptor affinities for antipsychotics at therapeutic doses (adapted from Miyamoto *et al*¹ and modified)

Receptor	Clozapine	Risperidone	Olanzapine	Quetiapine	Ziprasidone	Sertindole	Sulpiride	Amisulpride	Zotepine	Aripiprazole	Haloperidol
D ₁	+	+	++	-	+	++	-	-	+	-	+
D ₂	+	+++	++	+	+++	+++	++++	++++	++	++++	++++
D ₃	+	++	+	-	++	++	++	++	++	++	+++
D ₄	++	-	++	-	++	+	-	-	+	+	+++
5-HT _{1A}	-	-	-	-	+++				++	++	-
5-HT _{1D}	-	+	-	-	+++					+	-
5-HT _{2A}	+++	++++	+++	++	++++	++++	-	-	+++	+++	+
5-HT _{2C}	++	++	++	-	+++	++	-	-	++	+	-
5-HT ₆	++	-	++	-	+				++	+	-
5-HT ₇	++	+++	-	-	++				++	++	-
α ₁	+++	+++	++	+++	++	++	-	-	++	+	+++
α ₂	+	++	+	-	-	+	-	-	++	+	-
H ₁	+++	-	+++	++	-	+	-	-	++	+	-
m ₁	++++	-	+++	++	-	-	-	-	+	-	-
DA transporter	++		++								-
NA transporter	+		++		++				++		-
5-HT transporter					++						-

- = minimal to none; + = low; ++ = moderate; +++ = high; ++++ = very high.

Tabla1: Estudio comparativo de las afinidades de los antipsicóticos por receptores monoaminérgicos (Miyamoto et al., 2005).

beneficiosa con respecto al los otros dos grupos de síntomas que afectan a estos pacientes, los síntomas negativos y los cognitivos.

En la actualidad otros sistemas como el colinérgico y el glutamatérgico han cobrado relevancia como posibles dianas de fármacos antipsicóticos y se ha postulado que un desbalance en estos sistemas puede estar involucrado en la tan buscada etiología de esta enfermedad. En todos los casos se ha visto que la administración de fármacos que actúan en sentido opuesto al de los antipsicóticos, pueden simular algunos síntomas de la psicosis y/o agravar los síntomas de los mismos, esto ha dado lugar a una larga lista de modelos de esta enfermedad, sin tener bases acerca de su etiología.

Entre estos “psicoticomiméticos” se encuentran las anfetaminas, relacionadas con la hipótesis dopaminérgica, los agonistas del receptor 5-HT_{2A} relacionados con la hipótesis serotoninérgica y los antagonistas NMDA relacionados con la hipótesis glutamatérgica (Carlsson et al., 2001). Es difícil analizar el grado de semejanza que hay entre estos modelos farmacológicos y lo que realmente le ocurre a un paciente psicótico. Existen autores que sólo consideran alucinógenos a los agonistas 5-HT_{2A} y otros que ni siquiera consideran similares las alucinaciones generadas con fármacos con las características de las generadas en la patología (Nichols, 2004).

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

La hipótesis general del grupo de trabajo se orienta a una participación relevante de la CPF en la fisiopatología y tratamiento de la esquizofrenia y postula que los fármacos antipsicóticos atípicos (con la clozapina como paradigma) ejercen parte de su acción terapéutica a través de su interacción con receptores monoaminérgicos presentes en vías descendentes originadas en la corteza prefrontal. La presente tesis se ha realizado con los siguientes objetivos:

Objetivos generales

- Comprender las bases anatómicas del mecanismo de acción de los antipsicóticos atípicos en corteza prefrontal y su relación con los núcleos aminérgicos del mesencéfalo en la rata, a partir del estudio de dichas proyecciones y de la expresión de receptores

Objetivos específicos:

1. Evaluar la existencia de proyecciones simultáneas de la corteza prefrontal a los núcleos serotoninérgicos y dopaminérgicos del mesencéfalo (DR y ATV, respectivamente)
2. Determinar si las neuronas de la CPF que modulan la actividad de dichos núcleos expresan el receptor 5-HT_{2A}.
3. Examinar la distribución celular de receptores AMPA en el RD y el ATV.

MÉTODOS

II. Materiales y métodos.

1. Animales.

Todos los experimentos fueron realizados con ratas Wistar macho procedentes de Iffa Credo (Lyon, Francia). Los animales fueron estabulados en un ambiente controlado a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ y con un ciclo luz/oscuridad de 12 horas. Además, tuvieron permanente acceso a comida y agua.

En todo momento los animales fueron manipulados respetando la legislación española sobre protección de animales usados en la experimentación y de acuerdo con las normas de la unión europea de bienestar animal propuestos el 24 de noviembre de 1986 (86/609/EU) y siguiendo los procedimientos aprobados por el Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat de Cataluña

1.1 Coordenadas estereotáxicas.

Se escogieron las coordenadas en base al atlas de Paxinos y Watson (Paxinos and Watson, 1986). Salvo por algunas correcciones necesarias para adaptarlas al peso y a la cepa de ratas utilizadas. En el caso de la CPFm se utilizó AP 2.8 a 3.5, para el ATV (AP -5.4 a -5.6; LL -0.5; DV -8.2) y para el RD (AP -7.2 a -7.4; LL -3.1 con 30° de inclinación; DV -6.2 a -6.8) las coordenadas de inicio fueron tomadas con respecto a bregma salvo por las DV que fueron tomadas con respecto a la duramadre.

2. Experimentos de electrofisiología.

El objetivo esta serie de experimentos fue estudiar la proporción de neuronas la CPFm que bifurcan sus axones hacia el ATV y el RD con respecto a las que sólo proyectaban a una sola estructura. A tal fin se realizaron experimentos donde se observó la presencia del potencial

antidrómico cuando se estimularon ambas estructuras secuencialmente.

Para estos experimentos se utilizaron ratas con pesos que oscilaron entre los 250 y los 300 gramos. El anestésico utilizado fue hidrato de cloral a una dosis de 400 mg/kg (iv), otras dosis adicionales del anestésico de 80 mg/kg fueron administradas vía intravenosa a través de la vena femoral. La temperatura corporal se mantuvo alrededor de los 37° mediante la utilización de una manta térmica.

Antes de colocar al animal en el estereotáxico se untaron las barras del mismo con un anestésico de acción local, lidocaína al 5%.

Para evitar que las pulsaciones interfirieran con el experimento, se realizó un orificio en la membrana atlanto-occipital con el objetivo de liberar un poco de líquido cefalorraquídeo y así disminuir la presión intracraneal.

Las estimulaciones se realizaron con electrodos bipolares, formados por dos cables de acero recubiertos con esmalte como medio de aislamiento (California Fine Wire, Grover Beach, CA), el diámetro de los cables fue de $150 \mu\text{m}$, la separación entre las puntas de alrededor de $100 \mu\text{m}$ y la impedancia *in vitro* de 1030 K. Luego de la implantación estereotáxica en ambas estructuras, los electrodos fueron asegurados con pegamento y cemento dental. Las estimulaciones se generaron mediante una corriente continua generada en un estimulador Grass S-48 conectado a una unidad aisladora Grass SIU 5. Se utilizaron corrientes que aumentaron gradualmente desde 0.1 a 2 mA. El tiempo de duración de las estimulaciones fue de 0.2 ms y se realizaron con una frecuencia de 0.9 Hz. Para observar los potenciales antidrómicos se registraron neuronas de la CPFm y se realizaron estimulaciones secuenciales para el ATV y el RD. Para los registros extracelulares se utilizaron micropipetas de vidrio obtenidas a partir de tracción a alta temperatura de capilares de 2.0 mm (WPI, Sarasota, FL) realizados con un dispositivo Narishige PE-2 (Narishige Sci.

Inst., Tokyo, Japan). Como conductor para rellenar los microelectrodos se utilizó NaCl 2 M. Posteriormente se fracturaron las micropipetas utilizando un flujo de corriente y se seleccionaron los electrodos cuya impedancia fuera de entre 4 y 10 MΩ. Los registros extracelulares fueron amplificados con un dispositivo Neurodata IR283 (Cygnus Technology Inc., Delaware Water Gap, PA) , y reamplificados y filtrados con un Cibertec amplifier (Madrid, Spain) para luego ser digitalizados mediante un dispositivo DAT 1401, además, como interfase de software se utilizó el programa Spike2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK).

Se confirmó que se tratara de un registro unitario por la activación antidrómica desde la ATV y el RD (Fuller and Schlag, 1976) y se confirmó mediante histología la correcta ubicación de los electrodos de estimulación.

3. Estudios de trazado.

Para esta serie de experimentos se utilizaron ratas con pesos que oscilaron entre 250 y 300 g y que fueron anestesiadas por vía intraperitoneal con pentobarbital diluido 1:3 en agua (60 mg/kg). Una vez constatado que estuvieran profundamente anestesiadas se procedió a emplazar las ratas en el aparato estereotáxico (modelo David Kopf 640). Para las inyecciones de los trazadores se utilizaron micropipetas de vidrio obtenidas a partir de capilares de forma similar a los experimentos de electrofisiología, con la salvedad de que, en este caso, la punta fue cortada bajo el microscopio para que alcanzara un diámetro final de 30 μm. Posteriormente fueron rellenadas con los trazadores, ya sea con la subunidad B de la toxina colérica (CTB) (List Biological Laboratories, INC. Campbell, California,

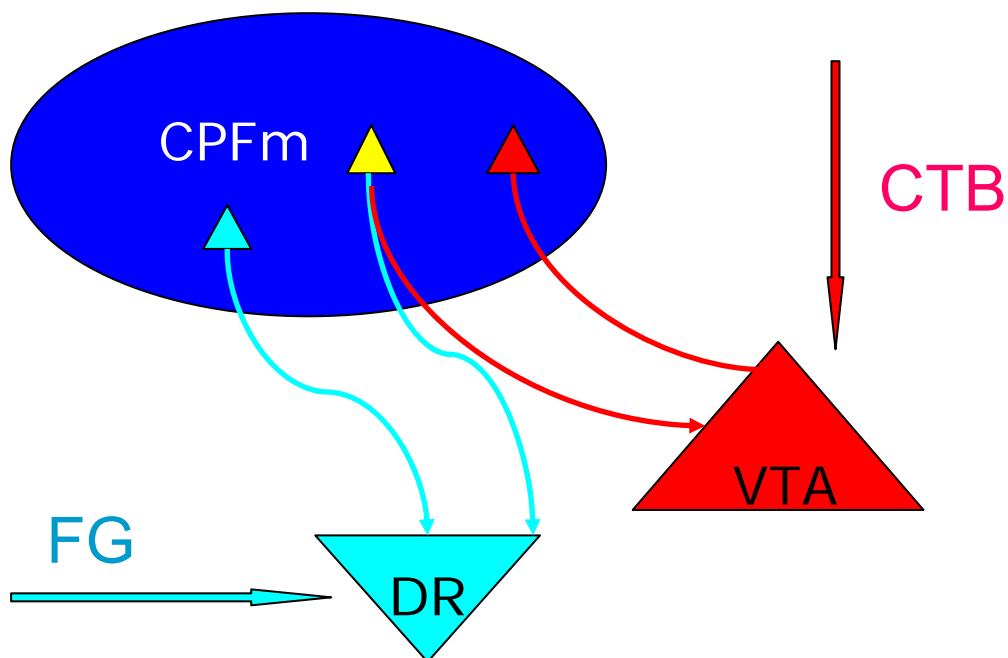


Figura 4: Esquema de inyecciones de CTB y FG. Se indica la marca que se esperaba encontrar en la CPFm donde el turquesa representa la marca de FG, el rojo la marca de CTB y el amarillo la presencia de ambas marcas.

USA) o con fluoro gold (FG, Fluorochrome LLC, Englewood, CO, USA). La CTB fue diluida a un 2% en agua destilada, en cambio el FG, por su baja solubilidad en agua, tuvo que ser diluido en tampón cacodilato (2% FG en 0.1 M cacodilato pH 7.3). Los trazadores fueron inyectados alternativamente en el RD y el ATV de forma que cada rata tuviera uno de los trazadores en cada estructura. Las inyecciones iontoforéticas fueron realizadas con pulsos positivos de 5 μ A de 7 s y otros 7 s sin corriente durante 10 min con un dispositivo Stoelting (Stoelting, Illinois, USA).

3.1 Perfusión.

Después de la cirugía las ratas fueron estabuladas por separado y, al cabo de 10 días, sacrificadas mediante una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital. Inmediatamente después, profundidas por vía intracardiaca con 50 mL de una solución de Tirode sin calcio (6.8 g/L NaCl; 0.4 g/L KCl; 0.32 g/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 0.10 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.17 g/L $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$; 2.2 g/L $NaHCO_3$; glucosa 1g/L) conteniendo además 0.1% de heparina a 37°C, seguido de una perfusión de solución de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0.1 M, pH 6.9) con el fin de fijar los tejidos, primero se pasaron 50 ml a 37°C y luego otros 300 ml a 4°C.

Después de la perfusión, se extrajo el cerebro, se mantuvo durante 90 min en la misma solución de paraformaldehído y se crioprotegió mediante una incubación de 48 horas a 4°C en una solución de sucrosa al 10% en PBS (0.1 M pH 7.4).

El paso siguiente fue la congelación de los cerebros, la misma se realizó mediante inmersión en isopentano a -30°C. Una vez congelados, los tejidos fueron cortados a un grosor de 14 μ m en un microtomo/criostato (Microm HM500 OM, Walldorf, Germany). Los cortes fueron montados en portas tratados con Histogrip (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) y conservados a -20°C hasta su utilización.

3.2 Inmunohistoquímica por fluorescencia indirecta en tejido montado en portas.

La metodología empleada en la inmunohistoquímica de los trazadores se basó en la empleada por Coons (1958). Las secciones fueron incubadas durante 3 o 4 días con el/los anticuerpo/s primario/s disuelto/s en solución salina en tampón fosfato 0.1M (PBS) conteniendo 0.3% Triton X-100 en cajas humidificadas mantenidas a 4°C. Se utilizó un anticuerpo contra la CTB (1:1000) solo o en combinación con anticuerpos contra la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) (1:100), o la enzima tirosina hidroxilasa (TH; 1:1000). Para mayor información sobre los anticuerpos ver la Tabla 1.

Las secciones fueron lavadas mediante tres inmersiones de 5 min en PBS y luego incubadas durante 30 min a 37°C con anticuerpos secundarios fluorescentes (Tabla 2) a una concentración 1:500 en PBS con 0.3% Triton X-100. Para detectar los anticuerpos de conejo (anti-CTB) se utilizaron anticuerpos generados en cabra o en burro conjugados con Alexa Fluor 546 (rojo) o 488 (verde) respectivamente, para detectar los anticuerpos de ratón (anti-TH) también se utilizaron anticuerpos generados en cabra pero conjugados con Alexa Fluor 488 y para detectar los anticuerpos de oveja (anti TPH) se utilizaron anticuerpos generados en burro conjugados con AlexaFluor 546, 488 o fluorescencia isotiocianato (FITC 1:50). Finalmente las secciones fueron lavadas 3 veces en PBS durante 5 min y recubiertas con Mowiol (Merck, Darmstadt, Alemania) y el cubreobjetos correspondiente. Las secciones fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E1000, Nikon, Tokyo, Japón) y un microscopio confocal (Leica SP2; Leica, Wezlar, Alemania) perteneciente al servicio de microscopia confocal del Parc Científic de Barcelona-Universitat de Barcelona (PCB-UB).

Antígeno	Generado en	Origen	Tipo
Toxina Colérica (subunidad B) (CTB)	Conejo	Sigma, St. Louis, MI, USA Núm. Catálogo C3062	Policlonal
Tirosina Hidroxilasa (TH)	Ratón	Diasorin, Stillwater, USA Núm. Catálogo 22941	Monoclonal
Triptófano Hidroxilasa (TPH)	Oveja	Chemicon Intl., USA; Núm. Catálogo AB1541	Policlonal
GAD67	Ratón	Chemicon Intl., USA; Núm. Catálogo MAB5406	Monoclonal
Receptor de Glutamato 1 (GluR1)	Conejo	Chemicon International, USA; Núm. Catálogo AB1504	Policlonal
Receptor de Glutamato 2/3 (GluR2/3)	Conejo	Chemicon International, USA; Núm. Catálogo AB1506	Policlonal
Receptor 5-HT _{2A}	Ratón	BD Pharmingen Núm. Catálogo 556326	Monoclonal

Tabla 1: Anticuerpos primarios

Detecta	Generado en	Origen	Característica
IgG de Conejo	Cabra	Molecular Probes, Leiden, Holanda	Alexa Fluor 546 (rojo)
IgG de Conejo	Burro	Molecular Probes, Leiden, Holanda	Alexa Fluor 488 (verde)
IgG de Ratón	Cabra	Molecular Probes, Leiden, Holanda	Alexa Fluor 488 (verde)
IgG de Oveja	Burro	Molecular Probes, Leiden, Holanda	Alexa Fluor 546 (rojo)
IgG de Oveja	Burro	Molecular Probes, Leiden, Holanda	Alexa Fluor 488 (verde)
IgG de Oveja	Burro	Chemicon Intl.	FITC (verde)
IgG de Conejo	Cabra	Vector laboratories, inc.	Biotinilado

Tabla 2: Anticuerpos secundarios

A partir de las imágenes de epifluorescencia se analizó en cada corte de CPF la distribución de las neuronas que proyectaban a cada estructura, mientras que el microscopio confocal se utilizó en el área de la corteza prefrontal medial (a -3.2 mm AP) para evaluar el número total de neuronas que contenían ambos marcajes o uno solo de ellos en un único corte. Se procedió de esta forma para evitar la posibilidad de sobrestimación de células con doble marcaje debido a un traspaso de señal por un canal que no correspondiera, algo que ocurre frecuentemente con la epifluorescencia, pero que puede ser evitado en un microscopio confocal espectral.

4. Inmunohistoquímica por fluorescencia en tejido en suspensión (*free floating*).

El nivel de sensibilidad alcanzado en la inmunohistoquímica en portas no fue suficiente para resolver la distribución de epítopes pertenecientes a proteínas que se encuentran en una baja concentración en el tejido, como es el caso de los receptores de membrana, por tal motivo se hizo necesario un cambio de estrategia en cuanto al sistema utilizado para realizar los ensayos inmunohistoquímicos. Uno de los mecanismos para aumentar la señal en una inmunohistoquímica es aumentar la penetrancia de los anticuerpos, si se incuban los cortes en flotación ésta se aumenta notablemente.

La preparación previa de los tejidos es similar a la necesaria para la inmunohistoquímica en portas con algunas diferencias. Con el fin de aumentar la resistencia de los tejidos y crioprotegerlos se procedió a dejarlos por 5 días en una mezcla de 30% de sucrosa disuelta en PBS con azida sódica.

El método de congelación fue el mismo que el anteriormente descrito. El grosor de los cortes en cambio fue mayor, 30µm. Los cortes fueron recolectados en pocillos conteniendo PBS con azida sódica y almacenados hasta su utilización a 4°C.

Las incubaciones se realizaron a 4°C en PBS con azida sódica, 0.3% Triton X-100 y suero de cerdo al 1% en agitación suave.

Para analizar el patrón de distribución de los subtipos de receptor glutamatérgico se probaron distintas combinaciones de anticuerpos, a saber:

anti-GluR1 y anti-TH

anti-GluR1 y anti-TPH

anti-GluR1 y anti-GAD67

anti-GluR2/3 y anti-TH

anti-GluR2/3 y anti-TPH

Los anticuerpos contra la TH y TPH se utilizaron en concentraciones de 1:3000 para el primero y 1:300 para el segundo. Los anticuerpos contra el GluR1 se utilizaron a una concentración de 1:200. Los anticuerpos contra el GluR2/3 también se utilizaron en una concentración de 1:200. Los anticuerpos monoclonales contra la enzima Ácido glutámico decarboxilasa (GAD67) se utilizaron a una concentración 1:250. Para más información ver Tabla 1.

Al cabo de 4 días, se realizaron 3 lavados de 10 minutos y se incubaron los tejidos con anticuerpos secundarios conjugados con alexas fluorescentes como se ya se ha descrito antes para la inmunohistoquímica en portas. Los tejidos se montaron en portas tratados con histogrip y se recubrieron con Mowiol. Con el fin de descartar cualquier posibilidad de falsa colocalización, las secciones fueron observadas en un microscopio confocal espectral (Leica TCS SL; Leica, Wezlar, Alemania) perteneciente al servicio de microscopía del Campus Casanova de la Universidad de Barcelona.

5. Hibridación in situ combinada con inmunohistoquímica.

Para responder algunas de las preguntas que surgieron de los objetivos del proyecto, se hizo indispensable la detección en tejido de un mRNA determinado junto con la visualización de la distribución de una proteína particular. La estrategia utilizada consistió en la combinación de técnicas de hibridación in situ junto con técnicas

inmunohistoquímicas. Los protocolos se basaron en los procedimientos de hibridación *in situ* propuestos por Hafén (Hafén et al., 1983) y Young (Young et al., 1986), siguiendo las modificaciones de Tomiyama (Tomiyama et al., 1997) y Serrats (Serrats et al., 2003). La combinación con la técnica de inmunohistoquímica fue el resultado del trabajo realizado en mayor medida por Peñas y Vilaró (2008) y modificado por Mori y Mengod (2008), introduciendo los ajustes necesarios para adaptar la técnica a los niveles de sensibilidad requeridos para este trabajo.

5.1 Oligonucleótidos.

Para la detección del mRNA se utilizaron oligonucleótidos marcados con ^{33}P como sondas. A tal fin se seleccionaron 3 secuencias diferentes de entre 48 y 50 pb complementarios al mRNA del receptor 5-HT_{2A}. Estas sondas correspondían a la secuencia de bases número 128-170 (rs2/N), 1380-1427 (rs2/C) y 939-987 (rs2/CL) del gen NM_017254. Los oligonucleótidos fueron diseñados tomando en cuenta el contenido en citosina y guanina y la selectividad por el mRNA de la especie animal utilizada. Con este fin, las secuencias de todos los oligonucleótidos se evaluaron por ordenador antes de ser sintetizados, utilizándose la utilidad BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) comparándolas con las bases de datos del EMBL y el GenBank. Las sondas se sintetizaron y purificaron mediante HPLC por Isogen Bioscience BV (Maarsden, Holanda).

5.2 Marcaje radiactivo de oligonucleótidos.

El ^{33}P es un elemento radiactivo que tiene una vida media 24 días y que emite radiación β , la cual tiene una gran capacidad ionizante/oxidante. Las sondas fueron marcadas en su extremo 3' con [^{33}P] α -dATP ([^{33}P] α -deoxiadenosina trifosfato, 3000 Ci/mmol; DuPont-NEN, Boston, USA) utilizando la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT,

5000U/ml, Calbiochem, La Joya, CA, USA). En la reacción de marcaje se incubaron 2 pmol de oligonucleótido, 17 pmol de [^{33}P] α -dATP y 5 unidades de TdT en un tampón de cacodilato de potasio (1mM) y cloruro de cobalto (1.5mM) pH 7.2 a 37°C durante 1-2 h. Se detuvo la reacción calentando a 65°C durante 5 minutos.

5.3 Purificación de las sondas marcadas.

Para eliminar los nucleótidos no incorporados en el ADN, la mezcla de reacción se purificó por cromatografía en columnas comerciales ProbeQuant™ G-50 Micro Columns (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Reino Unido), siguiendo las instrucciones del fabricante, que consisten en diluir la solución a purificar en tampón STE (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), cargarla en la columna de Sephadex™ G-50 DNA Grade F, que previamente se ha reconstituido mediante agitación y centrifugación durante 1 minuto a 735x g, y centrifugar durante 2 minutos a esta velocidad para recoger el oligonucleótido marcado.

5.4 Hibridación.

Los tejidos obtenidos como se detalla anteriormente se volvieron a fijar en una solución al 4% de paraformaldehído en 1x dPBS (8 mM NaH₂PO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 2.6 mM KCl) a 4°C durante 20 minutos. Seguidamente se realizó un lavado en dPBS a una concentración 3 veces mayor (3x dPBS) y dos lavados en 1x dPBS de 5 minutos a temperatura ambiente. Las secciones fueron incubadas 2 minutos en una solución de pronasa predigerida a una concentración final de 24 U/ml (Calbiochem, San diego, CA, USA) en 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA. El tratamiento con esta proteasa permite una mayor accesibilidad de la sonda al interior celular. La actividad proteolítica fue detenida con una solución de 2 mg/mL de glicina en 1x dPBS durante 30 segundos. Se realizaron 2 lavados de 30 segundos con 1x dPBS y

se deshidrataron los cortes con etanol al 70% y 100%.

Las secciones se hibridaron en 80 μ l de una solución tampón que contenía formamida (50%), 4x SSC (1x SSC:150 mM NaCl, 15 mM citrato sódico), 1x solución de Denhardt (0.02% Ficoll, 0.02% polivinilpirrolidona, 0.02% albúmina de suero bovino, BSA), 10% sulfato de dextrano, 1% sarkosil, 20 mM tampón de fosfato sódico pH 7.0, 250 μ g/ml de ARNt de levadura y 500 μ g/ml ADN de esperma de salmón. También se le agregaron las sondas marcadas observando que la actividad final correspondiera a $1,5-3 \times 10^7$ cpm/mL (Cortés et al., 1993).

Para evitar la evaporación durante la incubación las secciones fueron colocadas en cajas humidificadas y se recubrieron con Nescofilm (Bando Chemical Ind., Kobe, Japón). La hibridación se realizó a 42°C por un tiempo de 16-20 horas.

Después de la etapa de hibridación se realizaron 4 lavados de 45 minutos a temperatura ambiente en condiciones de alta astringencia, a 60°C en un tampón de lavado (0.6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5), con el fin de mantener sólo las uniones de alta especificidad.

5.5 Combinación con Inmunohistoquímica no fluorescente

Después de los lavados se restituyeron las condiciones de astringencia para evitar perder señal específica mediante una incubación de 15 minutos en tampón de baja astringencia que, además, contenía BSA para bloquear los sitios de unión inespecíficos del anticuerpo (Tris-HCl 0.10M pH 7.5, 1M NaCl, 2mM MgCl₂·6H₂O con 2% de BSA). Luego se realizó la incubación del anticuerpo primario contra la CTB, en el mismo tampón a 37°C. Al cabo de 4 horas se realizaron 3 lavados de 5 minutos en el tampón antes descrito con la salvedad de que no se le agregó BSA, este tampón se continuó utilizando en los pasos siguientes. Se incubaron los tejidos durante 30 minutos a 37° con un

anticuerpo secundario biotinilado generado en cabra contra anticuerpos de conejo (1:100; Vector Laboratories, CA, USA). Se realizaron otros 3 lavados de 5 minutos y se incubaron las secciones con una solución ABC del kit Vectastain Elite ABC (Vector Laboratories) a temperatura ambiente durante 1 hora en un tampón con bajo contenido salino (0.6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5). El kit Vectastain Elite ABC es un sistema de amplificación de la señal que actúa uniéndose a las biotinas de los anticuerpos mediante avidinas conjugadas a peroxidasa. Se realizaron otros tres lavados de 5 minutos. Luego se procedió a efectuar la reacción colorimétrica propiamente dicha, en tampón Tris-HCl 0.05M pH 7.5, conteniendo 0.5 mg/mL DAB (diaminobenzidine tetra hydrochloride, Sigma) y 1 μ l/ml H₂O₂ durante 5-10 minutos (dependiendo de la aparición del marcaje) a temperatura ambiente. Para finalizar se realizaron dos lavados en el tampón con bajo contenido salino (0.6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5) y se deshidrataron los cortes con etanol al 70% y 100%.

Para visualizar las sondas marcadas con ³³P las secciones fueron expuestas a película fotográfica Biomax MR (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) a -80°C durante un periodo de 4 días. Después de esto, la película fotográfica se reveló durante 5 min a 20°C en LX24 (Kodak), y se fijó durante 5 min en AL4 (Kodak). Finalmente se lavó en agua corriente durante 10 minutos y con agua desionizada. Este método permite la visualización macroscópica de las regiones enriquecidas en el mRNA de interés.

Para obtener una visualización microscópica del mRNA a nivel celular, se utilizó la técnica de inmersión en emulsión fotográfica líquida (dipping), que consiste en la inmersión de los portaobjetos con las secciones hibridadas en una emulsión fotográfica de sales de plata (emulsión nuclear K5, Ilford, Mobberly, Reino Unido) previamente diluida 1:1 con agua destilada y fundida a 42°C. La exposición se hizo en ausencia de luz y a 4°C por un tiempo que osciló entre 1 y 2 meses. Pasado este tiempo los portaobjetos

fueron finalmente revelados en D-19 (Kodak) y se fijaron en Ilford Hypam (Ilford). Posteriormente se montaron con Mowiol (Calbiochem).

Se realizaron controles para observar el efecto de la combinación sobre cada una de las técnicas por separado encontrándose diferencias en los niveles de sensibilidad obtenida pero no en el patrón de las distintas marcas. El resto de controles, de especificidad de la sonda de mRNA y los otros controles de interacciones entre técnicas fueron realizados en su momento por Pompeiano, Mori y Peñas (Mori F, 2008; Peñas R, 2008; Pompeiano M et al., 1994).

Las imágenes de los autorradiogramas se captaron con una cámara digital (Color View 12) acoplada a un microscopio Nikon Eclipse E1000 (Tokyo, Japón) usando el programa AnalySIS (Soft Imaging System GMBH, Münster, Alemania).

Se determinó el porcentaje de células marcadas con trazador retrógrado CTb que expresaban el mensajero del receptor

5-HT_{2A} en la corteza cerebral. Estos contajes se llevaron a cabo en cortes transversales del cerebro de tres ratas, por duplicado y en los que se contó la totalidad de las células marcadas con trazador que expresaban el mRNA del receptor. Cabe aclarar que si bien se observaron unas pocas neuronas CTb positivas presentes en la corteza motora, éstas no fueron tenidas en cuenta en este estudio.

5.6 Tratamiento fotográfico

Las imágenes fueron tratadas mediante los programas Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Software, San Jose, CA, USA), Análisis e ImageJ 1.32j (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Los tratamientos incluyeron realización de fotomontajes, modificaciones digitales de parámetros tales como brillo, contraste, pixelado y superposiciones. En ningún caso se realizaron tratamientos fotográficos que no fueran homogéneos para la totalidad de la imagen.

RESULTADOS

Trabajo 1

Simultaneous projections from prefrontal cortex to the ventral tegmental area and dorsal raphe in the rat.

Pablo Vázquez-Borsetti, Pau Celada, Roser Cortés, Francesc Artigas.

En este trabajo se han encontrado una importante proporción de neuronas de CPF que bifurcan sus axones proyectando tanto al ATV como al RD. Las estrategias experimentales utilizadas incluyeron utilizando técnicas de electrofisiología y de trazado de vías. Con respecto a las primeras, se estimuló secuencialmente el RD y el ATV, registrándose los correspondientes potenciales antidrómicos en neuronas de CPFm. Las latencias obtenidas desde el ATV fueron de 7.9 ± 0.7 ms con una velocidad de propagación del potencial estimada en 1.76 ± 0.14 (n=35, ATV) y en el caso del RD las latencias fueron de 13.7 ± 0.8 con una velocidad estimada de 1.11 ± 0.06 m/s (n=31, RD). Se registraron potenciales antidrómicos desde ambas áreas en un 60% de las neuronas piramidales registradas. Un 78% de las neuronas que proyectan al RD también proyectan al ATV y un 72% de las que proyectan al ATV también proyectan al RD. Los estudios histológicos muestran que las neuronas piramidales de la CPFm captaron ambos trazadores cuando estos fueron inyectados por separado en el ATV y el RD. La proporción de neuronas doblemente marcadas fue similar al observado por electrofisiología (ATV 81 ± 18 ; RD 52 ± 9 ; dobles 31 ± 4 ; n = 5 ratas) confirmando los resultados obtenidos mediante esta técnica.

Enviado a la revista **Cerebral Cortex**

Simultaneous projections from prefrontal cortex to the ventral tegmental area and dorsal raphe in the rat

Pablo Vázquez-Borsetti¹, Pau Celada^{1,2}, Roser Cortés^{1,3}, Francesc Artigas^{1,2}

¹*Department of Neurochemistry and Neuropharmacology,*

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), IDIBAPS

²*Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)*

³*Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas
(CIBERNED)*

08036 Barcelona, Spain

Corresponding author:

Francesc Artigas, PhD;

Dept. of Neurochemistry and Neuropharmacology,

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), IDIBAPS

Rosselló, 161, 6th floor, 08036 Barcelona, Spain.

Phone: +3493-363 8315;

Fax: +3493-363 8301;

e-mail: fapnqi@iibb.csic.es

Running title: *PFC projections to monoaminergic nuclei*

Abstract

The prefrontal cortex (PFC) is critically involved in numerous higher brain functions. PFC alterations have been reported in severe psychiatric conditions such as depression and schizophrenia, which are associated with derangements of the brainstem monoaminergic systems. Anatomical and functional evidence supports a PFC control of these ascending systems, raising the possibility that pathological or drug-induced changes in PFC may subsequently affect monoaminergic activity. Using electrophysiological and track-tracing techniques we report that a substantial proportion of midbrain-projecting pyramidal neurons in PFC exhibit simultaneous projections to the ventral tegmental area, (VTA) and the dorsal raphe nucleus (DR). Electrical stimulation of these nuclei in anesthetized rats evoked antidromic potentials in pyramidal neurons of the medial PFC. Of the 30 experiments performed, antidromic potentials were evoked in the same pyramidal neuron after sequential DR/VTA stimulation in 18 cases (60%). Likewise, tracer application in midbrain (fluorogold in the VTA and cholera toxin B in DR or viceversa) retrogradely labeled pyramidal neurons in PFC projecting to VTA (81 ± 18), to DR (52 ± 9) and to both nuclei (31 ± 4 ; $n = 5$ rats). These results indicate that the PFC may simultaneously coordinate the activity of dopaminergic and serotonergic systems within a short temporal domain via monosynaptic pathways.

Key words: dopamine; dorsal raphe, prefrontal cortex, pyramidal neurons, ventral tegmental area.

The prefrontal cortex (PFC) is involved in many higher brain functions, including mnemonic processes, attention and action planning, decision-taking, behavioral inhibition and control of emotional signals (Miller and Cohen, 2001; Fuster, 2001; Romo and Salinas, 2003). Although several PFC regions subserve specific roles (e.g., orbitofrontal and ventral PFC—emotional processing, dorsolateral PFC—cognitive processing), simultaneous activity changes occur in various cortical -and possibly subcortical- areas during working memory tasks, indicating the existence of distributed processes (Romo and Salinas, 2003). Thus, PFC functions largely rely on its extensive and often reciprocal connectivity with a vast array of cortical and subcortical structures (Groenewegen and Uylings, 2000; Miller and Cohen, 2001; Fuster, 2001).

Anatomical and electrophysiological studies have revealed the presence of a reciprocal connectivity between the medial PFC (mPFC) and the dorsal raphe nucleus (DR), which contains most of the ascending serotonergic (5-HT) neurons (Aghajanian and Wang, 1977; Sesack et al., 1989; Peyron et al., 1998; Hajós et al., 1998; Celada et al., 2001; Jankowski and Sesack, 2004; Gabbott et al., 2005). A similar connectivity exists for dopaminergic (DA) neurons of the ventral tegmental area (VTA) (Thierry et al., 1979; Thierry et al., 1983a; Tong et al., 1996b; Carr and Sesack, 2000; Gabbott et al., 2005; Geisler and Zahm, 2005). Afferent pathways from mPFC to these two nuclei exert a profound influence on the activity of DA and 5-HT neurons (Aghajanian and Wang, 1977; Thierry et al., 1979; Thierry et al., 1983a; Tong et al., 1996b; Hajós et al., 1998; Celada et al., 2001), which in turn project to cortical and limbic areas, including the PFC. Moreover, “up” and “down” states in mPFC and VTA are highly synchronized, suggesting coordinated states of activity in both structures (Peters et al., 2004; Gao et al., 2007).

The PFC-DR-VTA connectivity is a particularly interesting study subject due to the involvement of these brain areas in thought and affective disorders. Hence, the dopaminergic and serotonergic innervation of the PFC play important roles in cognitive processes, including working memory and cognitive flexibility (Williams and Goldman-Rakic, 1995; Williams et al., 2002; Clarke et al., 2004; Robbins and Roberts, 2007). Moreover, anatomical, cellular, metabolic and neurochemical alterations of the PFC have been reported in severe psychiatric conditions such as depression and schizophrenia which are also associated with derangements of both

monoaminergic systems (see for review Harrison, 1999; Selemon and Goldman-Rakic, 1999; Manji et al., 2001; Benes and Berretta, 2001; Drevets, 2001; Lewis et al., 2005). Furthermore, the functional interactions between the PFC, the VTA and the DR may be crucial for the understanding of the therapeutic action of antidepressant and antipsychotic drugs, which target transporters or receptors expressed by DA, 5-HT and PFC neurons (Cortés et al., 1988; Mengod et al., 1989; Weiner et al., 1991; Bymaster et al., 1996; Artigas et al., 1996; Arnt and Skarsfeldt, 1998; Santana et al., 2004). Finally, high frequency stimulation of Brodmann area 25 (Cg25) in treatment-resistant depressives induced an immediate clinical improvement, an effect that may involve the connectivity of Cg25 with midbrain nuclei (Mayberg et al., 2005).

However, despite VTA-projecting and DR-projecting pyramidal neurons in PFC are localized to the same areas (mainly prelimbic and infralimbic subdivisions), it is unknown whether these are segregated or overlapping populations. Using electrophysiological and track-tracing techniques, we report here that a substantial proportion of mPFC neurons project simultaneously to both nuclei, raising the possibility of a concurrent PFC control of the ascending DA and 5-HT pathways.

Experimental procedures

Animals

Male albino Wistar rats (Iffa Credo, Lyon, France) weighing 250-300 g were used in this study. Animals were kept in a controlled environment (12 h light/dark cycle and $22 \pm 2^\circ\text{C}$ room temperature) with food and water provided *ad libitum*. All experimental procedures used in this study were in strict compliance with the Spanish legislation and the European Communities Council directive 86/609/EEC on 'Protection of Animals Used in Experimental and Other Scientific Purposes' of 24 November 1986 (O.J. of E.C. L358, 18/12/1986). Animal work was carried out in the animal facilities of the School of Medicine of the University of Barcelona and all protocols used were approved by its Ethical Committee for Animal Research and by the "Departament de Medi Ambient i Habitatge" from the Catalan Government (Generalitat de Catalunya).

Electrophysiological recordings

We undertook a systematic study to evaluate the incidence of mPFC pyramidal neurons simultaneously projecting to the DR and the VTA using the antidromic potential technique (Fuller and Schlag, 1976). Rats were anesthetized (chloral hydrate 400 mg/kg i.p.) and positioned in the stereotaxic frame (David Kopf Instruments). Additional doses of chloral hydrate (80 mg/kg) were administered i.v. through the femoral vein. Body temperature was maintained at 37°C throughout the experiment with a heating pad. All wound margins and points of contact between the animal and the stereotaxic apparatus were infiltrated with lidocaine solution (5%). In order to minimize pulsation, the atlanto-occipital membrane was punctured to release some CSF. Bipolar stimulating electrodes consisted of two stainless steel enamel-coated wires (California Fine Wire, Grover Beach, CA) with a diameter of 150 µm and in vitro impedances of 10-30 KΩ. Poles were slightly separated under microscopic examination to 300-500 µm. Stimulating electrodes were stereotaxically implanted in both structures, the DR (AP -7.6 to -7.8; L -3.1 with 30° of inclination; DV -6.2 to -6.8) and VTA (AP -5.6 to -6.0; L -0.5; DV -8.2) (Paxinos and Watson, 1986). After implant, the electrodes were secured to the skull with glue and dental cement. Constant current electrical stimuli were generated with a Grass stimulation unit S-48 connected to a Grass SIU 5 stimulus isolation unit. Stimulating current was 1.16 ± 0.08 mA for DR and 1.14 ± 0.07 mA for VTA, 0.2 ms square pulses at 0.9 Hz. Pyramidal neurons were recorded extracellularly with glass micropipettes pulled from 2.0 mm capillary glass (WPI, Sarasota, FL) on a Narishige PE-2 pipette puller (Narishige Sci. Inst., Tokyo, Japan). Microelectrodes were filled with 2 M NaCl. Typically, in vitro impedance was between 4 and 10 MΩ. Single unit extracellular recordings were amplified with a Neurodata IR283 (Cygnus Technology Inc., Delaware Water Gap, PA), postamplified and filtered with a Cibertec amplifier (Madrid, Spain) and computed on-line using a DAT 1401plus interface system Spike2 software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK).

We systematically confirmed that only a single pyramidal neuron was recorded by identification by antidromic activation from the DR or the VTA (Fuller and Schlag, 1976). After recording antidromically-evoked spikes from one of these sites (VTA or DR), the current was switched to the other site (DR or VTA, respectively). Dual

projection neurons were characterized by the presence of antidromic spikes after stimulation from both sites.

Track-tracing studies

Animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg i.p.), and placed in a stereotaxic frame. Glass capillary tubes were heated, pulled and the tips broken to 30 μm diameter under microscopic control. The micropipettes were then filled with cholera toxin B subunit (CTB, List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA) or fluorogold (FG, Fluorochrome LLC, Englewood, CO, USA). A solution of CTB (2% in distilled water) was iontophoretically injected into the DR (n=4) or in the VTA (n=1). The same animals received subsequently iontophoretic injections of FG (2% in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3) into the VTA (n=4) or the DR (n=1), respectively. The iontophoretic injections were performed using a 5 μA positive-pulsed direct current for a total of 5 min (7 s on/off for 10 min). After surgery, rats were housed individually. Ten days after surgery, the animals were anesthetized with an i.p. overdose of sodium pentobarbital and perfused transcardially with 50 mL of calcium-free Tyrode's solution (6.8 g/L NaCl; 0.4 g/L KCl; 0.32 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.10 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.17 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2.2 g/L NaHCO_3 ; 1.1 g/L glucose) containing 0.1% heparin at 37°C, followed by 50 mL of warm (37°C) and 300 ml of cold (4°C) fixative (4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.9). After perfusion, the skull was opened and the brain carefully removed and stored for 2 days in a cryoprotective solution (10% sucrose in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4). The brains were then frozen by slow immersion into dry-ice chilled isopentane. Tissue sections, 14 μm thick, were cut on a microtome-cryostat (Microm HM500 OM, Walldorf, Germany), and mounted onto Histogrip-treated glass slides (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) and processed for the indirect immunofluorescence technique of Coons (1958). Thus, the sections were incubated during 3-4 days in a humid chamber at 4°C with a rabbit antiserum to CTB (1:1000; Sigma, St. Louis, MI, USA) alone or in combination with sheep anti-tryptophan hydroxylase (TPH) antiserum (1:100; Chemicon Intl.) or an anti-tyrosine hydroxylase (TH) monoclonal antibody (1:1000; Diasorin, Stillwater, MN, USA). Then the sections were rinsed in 0.1M phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 30 min at 37°C with appropriate combinations of the following antisera (1:500, Molecular

Probes, Leiden, NL): Alexa Fluor 546-conjugated goat anti-rabbit (for CTB) and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse (for TH) or Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit (for CTB) and Alexa Fluor 546-conjugated donkey anti-goat (for TPH). In sections from animals injected with FG in the DR, fluoresceine isothiocyanate (FITC)-conjugated donkey anti-sheep antiserum (1:50; Chemicon Intl.) was used as secondary antibody to detect TPH. Finally, the sections were washed in PBS and coverslipped using Mowiol (Merck, Darmstadt, Germany). The sections were observed in an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E1000, Nikon, Tokyo, Japan) and a confocal microscope (Leica SP2; Leica, Wezlar, Germany).

Data analysis

PFC sections were analyzed with an epifluorescence microscope to identify the distribution of pyramidal neurons projecting to the VTA and/or the DR. The medial and orbital cortices were then analyzed in more detail with the confocal microscope to determine the number of neurons projecting to each nucleus (or both). Digital images were obtained and treated with Adobe Photoshop to adjust brightness, contrast and size to make the final figures. Data are expressed as means \pm SEM. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Electrophysiological experiments

A total of 48 experiments were performed in which pyramidal neurons in mPFC were identified by antidromic stimulation from either the VTA or the DR. In some experiments ($n = 18$) histological examination revealed that one or other electrodes were slightly misplaced. Therefore, data on co-projecting neurons were taken from 30 experiments performed in 10 different rats. However, data on latencies and conduction velocities correspond to the total number of experiments performed, since these variables are not affected by small differences in electrode location.

Figure 1 shows the recording and stimulation sites. In 18/30 (60%) experiments, antidromic spikes were evoked in the same pyramidal neuron by sequential stimulation of the DR and the VTA. Five neurons (16.7 %) were

antidromically activated by DR stimulation but did not exhibit antidromic spikes during stimulation of the VTA whereas 7 neurons (22.3 %) were activated by VTA (but not DR) stimulation. Figure 2 shows representative examples of the recording of a pyramidal neuron projecting to the VTA, the DR and both. The latencies of the antidromic spikes evoked by VTA stimulation was significantly lower than those evoked by DR stimulation (Table 1).

Track-tracing studies

In order to verify the existence of pyramidal neurons in the PFC projecting to the DR and the VTA, we conducted a series of track-tracing experiments in which CTB and FG were microiontophoretically applied in the DR and the VTA, respectively (n = 4). Data from another rat in which CTB was applied in the VTA and FG in the DR are also given.

Figure 3 shows fluorescence microscope images depicting the localization of the tracers in the DR (CTB) and the VTA (FG) as well as the schematic representation of the localization of pyramidal neurons in PFC projecting to one or both nuclei (n = 4). In these rats, the tracers were confined within the respective nuclei, as shown by the colocalization of the tracer and the markers for serotonergic neurons of the DR (TPH) and dopaminergic neurons of the VTA (TH).

CTB application in the DR labeled a large number of neurons in layer V of the prelimbic and infralimbic subdivisions of the mPFC (Fig. 3). CTB application in DR also labeled a more moderate number of neurons in the anterior cingulate as well as in lateral and ventral orbitofrontal cortex. A few neurons were labeled in the agranular insular cortex, adjacent to those in the orbitofrontal cortex. As expected from the tracer application in the midline of the DR, labeled neurons were found ipsilateral and contralateral to the injection side.

FG application in the VTA also resulted in the labeling of a large number of neurons in the prelimbic and infralimbic mPFC (Fig. 3). With the exception of the orbitofrontal cortex, which contained only few FG-labeled neurons, the localization of VTA-projecting neurons was very similar to that of neurons projecting to the DR, in the cingulate, prelimbic and infralimbic subdivisions. In contrast to injections in the DR, FG application in the VTA mostly labeled neurons in the ipsilateral hemisphere, and, only a few VTA-projecting neurons were found in the contralateral side. Figure 4

shows the actual localization of mPFC pyramidal neurons projecting to DR (4A), VTA (4B) or both (4C).

Figure 5 shows fluorescence microscope images depicting the localization of the tracers in the DR and VTA of the rat injected with the inverse tracer combination (e.g., FG in the DR and CTB in VTA). This resulted in a distribution of labeled neurons similar to that described above. A large number of FG-labeled neurons (DR-projecting) was found in the medial and orbitofrontal cortex in both hemispheres. Likewise, CTB application in VTA labeled a large number of neurons in the ipsilateral mPFC and no neurons in orbitofrontal cortex. Very few CTB-labeled cells were detected in the contralateral mPFC. Table 2 shows the absolute number of DR-projecting and VTA-projecting neurons in the ipsilateral PFC of the 5 rats examined. On average, the percentage of dual projection neurons was $63 \pm 6 \%$ with respect to those projecting to DR and $42 \pm 6 \%$ with respect to those projecting to VTA.

Table 1. Latencies of antidromic spikes evoked in mPFC pyramidal neurons by stimulation of midbrain monoaminergic nuclei

Stimulation site	Latency (ms)	Speed (m/s)
DR (n = 31)	$13.7 \pm 0.8^*$	$1.11 \pm 0.06^*$
VTA (n = 35)	7.9 ± 0.7	1.76 ± 0.14

Data (mean \pm SEM) are latencies of antidromic spikes reaching layer V mPFC neurons by stimulation of bipolar electrodes located in the DR and the VTA (see Fig. 1). Speed was calculated considering the actual distance between mPFC and each structure (11 mm for VTA and 14 mm for DR), according to the atlas of rat brain (Paxinos and Watson, 1998)

* $p < 0.0002$ vs. VTA.

Table 2. Labeling of mPFC neurons by tracer application (CTB or FG) in the DR and VTA.

	VTA	DR	Both
Rat #1	49	22	15
Rat #2	147	47	38
Rat #3	88	75	39
Rat #4	57	50	33
Rat #5 (FG in VTA; CTB in DR)	65	68	32
<i>Average</i>	81 ± 18	52 ± 9	31 ± 4

Data are numbers of neurons labeled by CTB application in the VTA and FG application in the DR (rats #1-4) or viceversa (rat #5) in individual sections of the PFC (approx. Bregma +3.2; Paxinos and Watson, 1998).

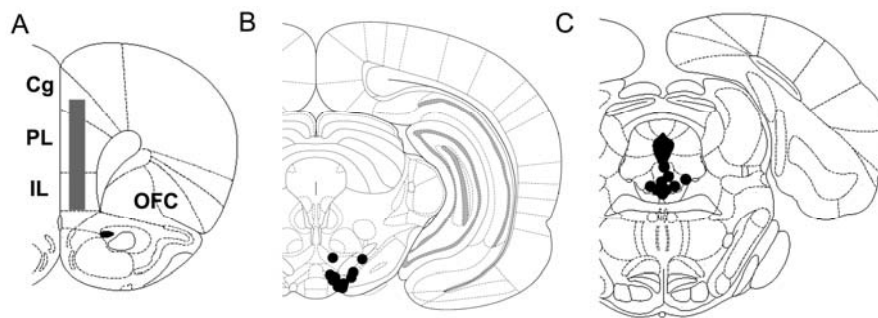


Figure 1. A) Schematic drawing of a frontal section of the rat brain at AP + 3.2 mm (Paxinos and Watson, CD edition, 1997, with permission from Elsevier Science) illustrating the area where pyramidal neurons were recorded. B, C) Schematic representation of the location (black dots) of the tip of bipolar electrodes used to stimulate the VTA (B) and the DR (C).

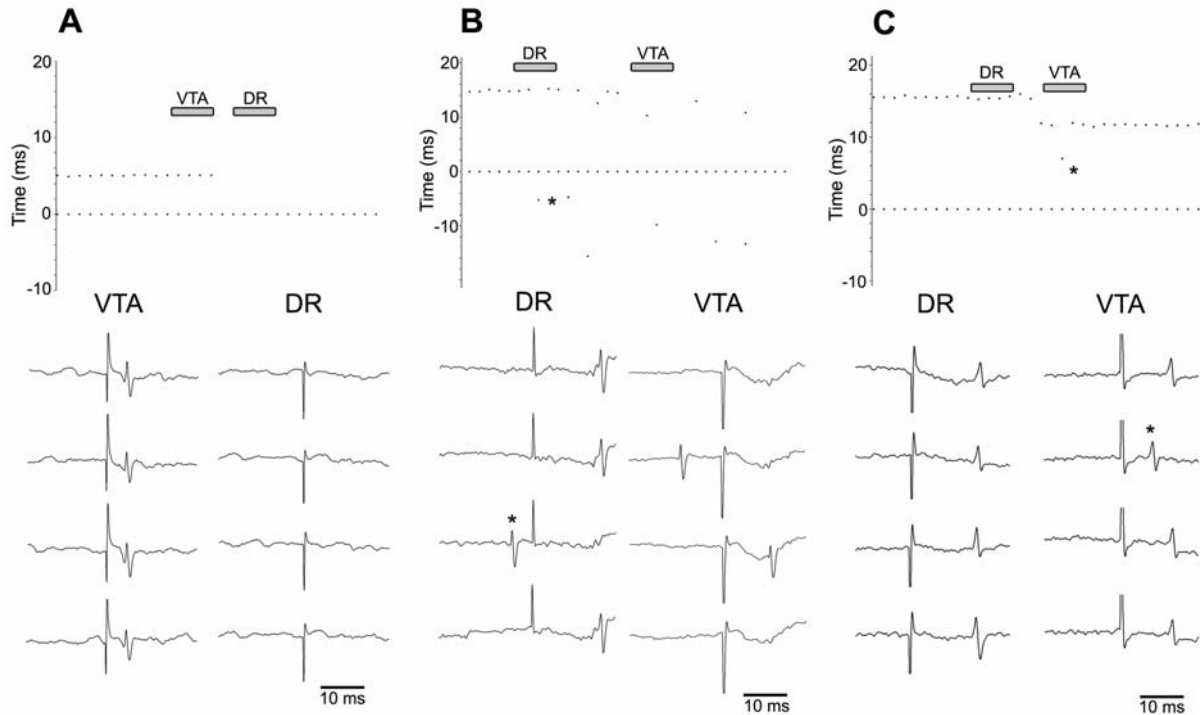
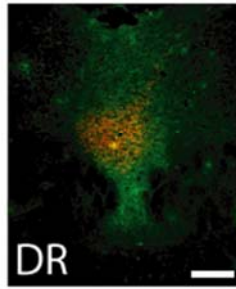
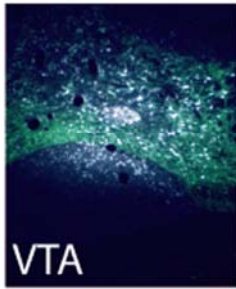
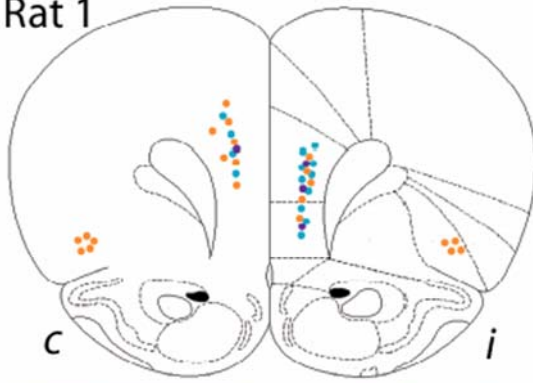
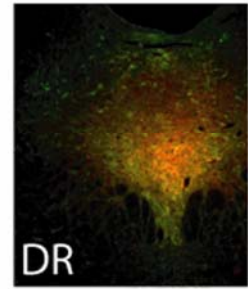
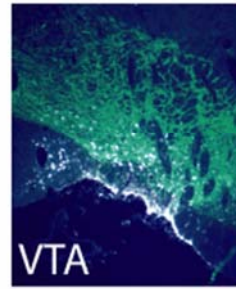
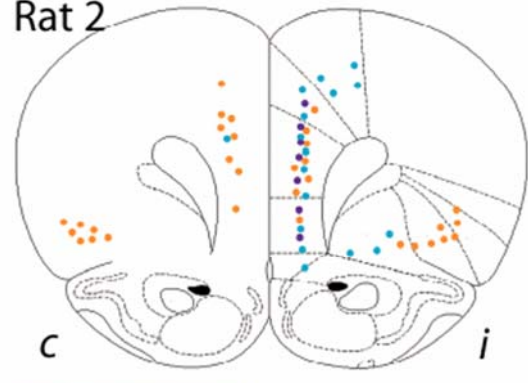


Figure 2. Identification of pyramidal neurons in mPFC by antidromic activation from the DR and VTA. Examples of pyramidal neurons projecting to the VTA (A), the DR (B) and to both nuclei (C). *Upper panels.* Raster plots. Each dot corresponds to an action potential fired by the pyramidal neuron recorded upon stimulation from the DR and/or the VTA. Dots at time = 0 correspond to the stimulus artifact. *Lower panels.* Actual spike traces corresponding to the time periods indicated in raster plots, immediately before and after switching the stimulating current from the DR to the VTA electrode. Asterisks denote antidromic spikes missing due to collisions with ongoing spontaneous action potentials during stimulation of the DR or VTA. A) Example of a mPFC pyramidal neuron showing antidromic potentials after stimulation from the VTA (latency 4.4ms) but not from DR. B) Example of a mPFC pyramidal neuron showing antidromic potentials after stimulation from the DR (latency 15 ms) but not from the VTA. C) Example of a mPFC pyramidal neuron showing antidromic potentials after stimulation from the DR (latency 15.8 ms) and from the VTA (latency 11.6 ms).

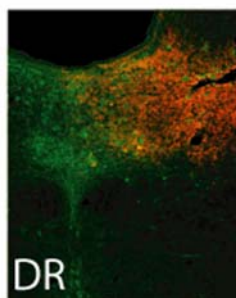
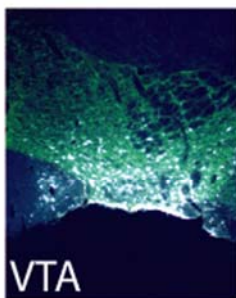
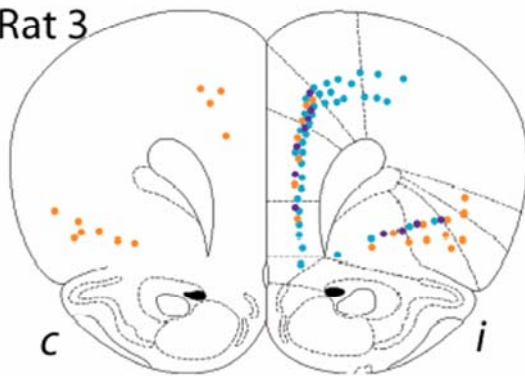
Rat 1



Rat 2



Rat 3



Rat 4

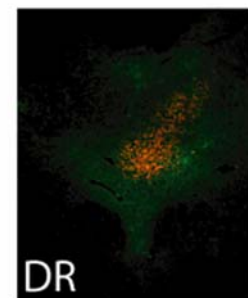
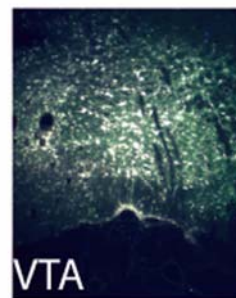
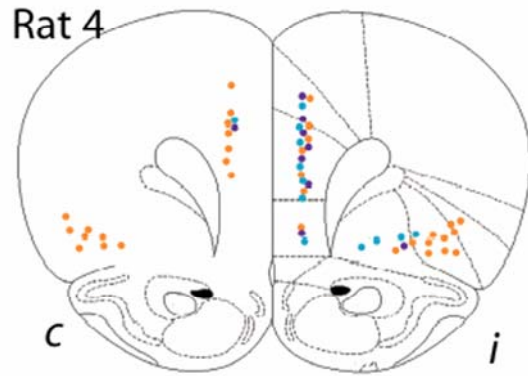


Figure 3. Retrograde labeling of PFC neurons after microiontophoretic application of FG in the VTA and CTB in the DR. For each rat (#1-4), schematic representations of coronal sections at the PFC level (+3.2 mm from bregma, Paxinos and Watson, 1986) illustrate the distribution of cells retrogradely-labeled with FG (blue dots), CTB (orange dots) or both tracers (violet dots). Every dot represents 5 labeled neurons. Note the presence of numerous neurons projecting to the VTA in the prelimbic and infralimbic cortices, extending dorsally to the cingulate and secondary motor areas and ventrally to the dorsal peduncular and orbital cortices in the hemisphere ipsilateral (*i*) to the injection site. Only few VTA-projecting neurons are found in the prelimbic cortex of the contralateral (*c*) side. Neurons projecting to the DR are detected in both the ipsilateral and contralateral hemispheres, mainly concentrated in the prelimbic and insular agranular cortices. CTB-labeled cells can also be encountered in the orbital, infralimbic and cingulate cortical areas. The location of injection sites in each rat is illustrated in the corresponding photomicrographs obtained from sections through the brainstem which show TH-immunoreactivity (green) and FG-fluorescence (white) in the VTA and TPH- (green) and CTB- (red) immunoreactivity the DR. Images were obtained with a Colorview camera in a Nikon Eclipse fluorescence microscope and were overlapped using AnalySIS software. Bar = 200µm.

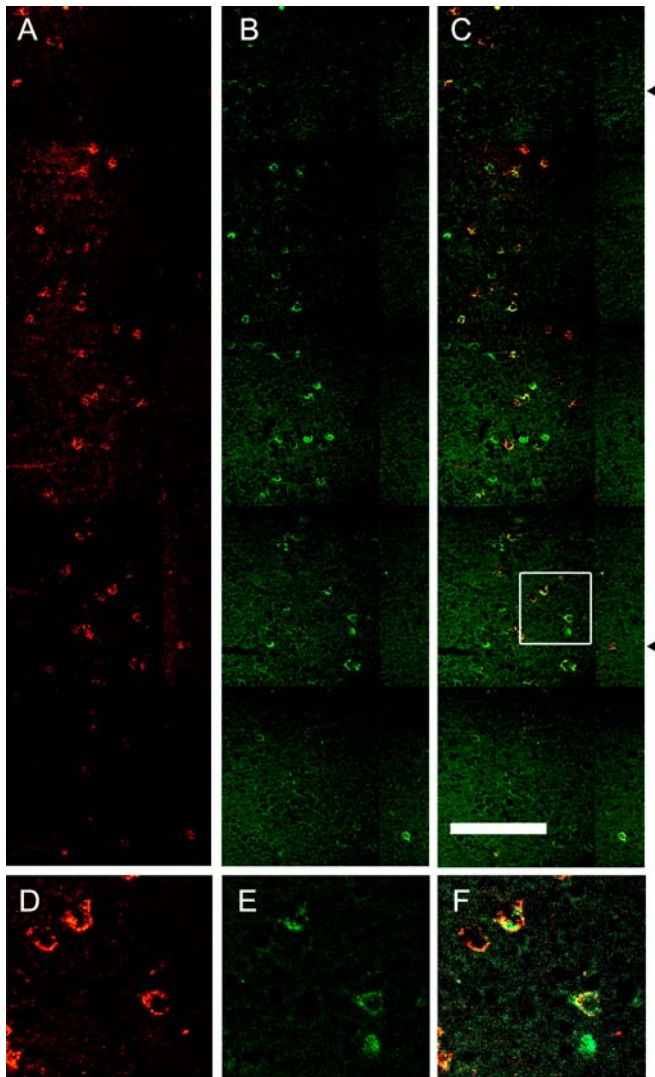


Figure 4. Confocal photomicrographs of a PFC coronal section of a rat (#4; see Fig. 3) that received CTB in the DR and FG in the VTA, after incubation with CTB antiserum. The images in A-C are montages of 10 consecutive optical sections (1 μm each) colorized and merged with the confocal software. Panels D-F show enlargements of the area boxed in C. A,D) CTB-immunoreactive cell bodies are observed along layer V of the mPFC. B, E) FG-fluorescence shown in green is also present in numerous cells in layer V. C,F) Superimposed images show the presence of CTB (red), FG (green) or both tracers (yellow). Black arrows on the right mark the limit between the cingulate and the prelimbic cortices (upper arrow) and the limit between the prelimbic and infralimbic cortices (down arrow). Bar = 200 μm .

Rat 5

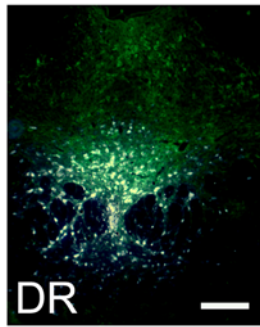
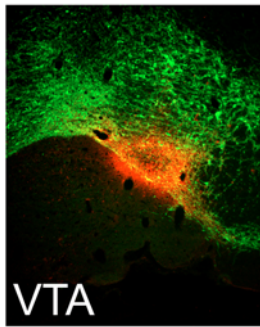
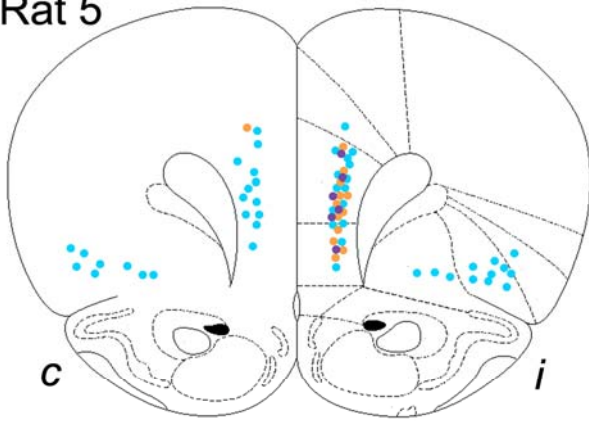


Figure 5 Retrograde labeling of PFC neurons after microiontophoretic application of CTB in the VTA and FG in the DR. Schematic representation of a coronal section at the prefrontal cortex level (+3.2 mm from bregma, Paxinos and Watson, 1986) illustrating the distribution of cells retrogradely-labeled with FG (blue dots), CTB (orange dots) or both tracers (violet dots) in rat #5. Every dot represents 5 labeled neurons. The distribution of VTA- and DR-

projecting cells is comparable to that described in Fig. 3. The location of injection sites is illustrated in photomicrographs obtained from sections through the brainstem of the same rat which show TH- (green) and CTB- (red) immunoreactivity in the VTA and TPH- immunoreactivity (green) and FG-fluorescence (white) in the DR. Images were obtained with a Colorview camera in a Nikon Eclipse fluorescence microscope and were overlapped using AnalySIS software. Bar = 200µm.

Discussion

The present study shows the existence of a substantial population of mPFC pyramidal neurons that simultaneously project to the VTA and the DR. The proportion of dual projection neurons can be estimated to be 60% according to the experiments using antidromic stimulations from both nuclei. The results from histological experiments reveal similar values when data were referred to the total number of DR-projecting neurons (63% also projected to VTA) and somewhat lower values (42%) when referring data to VTA-projecting neurons, which were more abundant. Irrespectively of this quantitative difference, these results indicate that the ascending 5-HT and DA pathways are under a concurrent control of their activity by the same pyramidal neurons in mPFC.

Methodological considerations

In agreement with occasional pilot observations (Puig et al., 2003), the use of the antidromic activation/collision test technique enabled a systematic identification of PFC pyramidal neurons projecting simultaneously to DR and VTA. This approach has been used to identify the existence of efferent neuronal projections with branching axons in different structures, including the PFC. In a pioneering study, Thierry et al., (1983a) reported on different patterns of dual-projection neurons in mPFC which innervated several structures such as mediodorsal thalamus, ventral tegmental area, substantia nigra, superior colliculus, central gray and habenula. The present study agrees with the view that PFC pyramidal neurons have branching axons to simultaneously coordinate the activity of various subcortical structures. The conduction velocities and latencies found here are within the range of those previously reported for mPFC pyramidal neurons projecting to the serotonergic and dopaminergic nuclei (Thierry et al., 1983a; Peterson et al., 1990; Celada et al., 2001; Puig et al., 2003). A significantly lower latency was found for the PFC-VTA pathway than for the PFC-DR pathway, which may be due to the shorter distance between mPFC and VTA and the proximity of the latter nucleus to the median forebrain bundle (MFB), implying that fast conduction myelinated axons exist for most of the trajectory between mPFC and VTA. It is unlikely that the electrical stimulation of the VTA, had

antidromically activated axons in the MFB under the present experimental conditions. In such a case, antidromic spikes would have been evoked in all VTA stimulations from the same rat, a situation we never observed.

The use of the track-tracing techniques provided essentially the same results, yet the percentage of co-projecting neurons found was somewhat lower than that obtained with the antidromic activation technique. Pyramidal neurons projecting to the DR and/or VTA were mainly found in layer V of the infralimbic, prelimbic and cingulate cortices, in agreement with previous reports in the literature using either electrophysiological or track-tracing techniques (Aghajanian and Wang, 1977; Thierry et al., 1979; Thierry et al., 1983b; Sesack et al., 1989; Tong et al., 1996b; Peyron et al., 1998; Hajós et al., 1998; Tong et al., 1998; Celada et al., 2001; Jankowski and Sesack, 2004; Gabbott et al., 2005; Geisler and Zahm, 2005). Likewise, more DR- than VTA-projecting neurons were found in the orbitofrontal cortex, which is in agreement with previously reported data (Peyron et al., 1998; Gabbott et al., 2005; Geisler and Zahm, 2005).

One possible limitation of the use of FG and CTB is the uptake by damaged fibers of passage close to the application site. This might be a potential confounding factor, particularly for the identification of VTA-projecting neurons, given the proximity of the VTA to the MFB. CTB has been reported to be taken up by fibers of passage (Chen and Aston-Jones, 1995). It is controversial whether FG can be also taken up by fibers of passage. While the majority of studies have reported no uptake (Schmued and Fallon, 1986; Pieribone and Aston-Jones, 1988; Schmued and Heimer, 1990), another study found FG uptake (Dado et al., 1990). However, this potential limitation can be minimized by the microiontophoretic application of the tracer, as used herein. This procedure resulted in a tracer distribution within the boundaries of the DR and VTA as observed by the coincidence of the tracer with the TPH and TH immunoreactivity used to label 5-HT and DA neurons, respectively. Moreover, should tracer application result in damage of MFB fibers and subsequent tracer uptake, a more widespread distribution of labeled neurons would have been observed in the PFC, particularly in the primary and secondary motor areas, that contain the largest proportion of corticospinal fibers of all PFC subdivisions (Gabbott et al., 2005). Only one rat (rat #3; see Fig. 3) had a significant number of neurons in the secondary motor area labeled by the tracer application in the VTA. Yet in this

case, the number of labeled neurons was higher in the mPFC (cingulate, prelimbic and infralimbic) than in the motor PFC.

Moreover, the ratio between the number of VTA-projecting neurons and DR-projecting neurons in the mPFC was 1.5 on average (see Table 2), which is in close agreement with that reported using single applications of wheat germ agglutinin conjugated with horseradish peroxidase in each site (VTA/DR ratios of 3.28, 1.21 and 1.02 for the infralimbic, prelimbic and cingulate cortices; see Table 3 in Gabbott et al., 2005). Based on this evidence, it is highly likely that the present methods specifically labeled pyramidal neurons in mPFC projecting to the DR- and the VTA.

Notwithstanding the reliability of both techniques, as used herein, a quantitative difference was noted. The percentage of dual-projection neurons obtained with the antidromic activation technique was 60% which was essentially identical (63%) to that obtained by track-tracing techniques when results were expressed by reference to the total of DR-projecting neurons. A lower proportion (42%) was obtained when expressing the data by reference to VTA-projecting neurons, which are more abundant in mPFC. One possible reason for this difference is the smaller size of the VTA compared with the DR, which extends ~2 mm in the rostrocaudal axis. Then, it is possible that only a small proportion of the actual number of PFC neurons projecting to the DR had been labeled by tracer application in this nucleus compared with those labeled by tracer application in the VTA. This would result in an apparently greater number of VTA-projecting neurons in the mPFC, as observed, and therefore in a comparatively lower percentage of dual-projection neurons when expressed by reference to VTA. Additionally, it may be that electrical stimulation may activate myelinated axons in the VTA that would not take up the tracers.

Functional implications

The mPFC exerts a very important control of the activity of 5-HT neurons. Two independent studies revealed that more than 80% of DR 5-HT neurons responded to the electrical stimulation of the mPFC (Hajós et al., 1998; Celada et al., 2001). The responses elicited differ, possibly depending on the stimulation site. Stimulation of the infralimbic PFC resulted in a majority of inhibitory responses in 5-HT neurons, which were not blocked by the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635, while stimulation at a more dorsal site increased the proportion of excitatory responses

(Hajós et al., 1998). Subsequent tracing studies revealed that ventral aspects of the PFC mainly synapse with GABA cells in the DR (Varga et al., 2001; Jankowski and Sesack, 2004), and establish a low proportion of synaptic contacts with 5-HT cells (Jankowski and Sesack, 2004). However, electrical stimulation of the mPFC in a more dorsal coordinate (DV 3.5-4 mm; prelimbic area) evoked both monosynaptic excitations (latency 17 ms) and inhibitions in DR 5-HT neurons. Excitations were AMPA- and NMDA-receptor mediated, thus supporting the view that prefrontal afferents establish direct excitatory contacts with 5-HT neurons (Celada et al., 2001). Unlike in Hajós et al. (1998), inhibitions evoked by prefrontal stimulation were WAY-100635-sensitive and the proportion of excitations increased in animals depleted of 5-HT, suggesting the involvement of 5-HT_{1A} autoreceptor-mediated inhibitions in addition to GABA_A-mediated inhibitions (Celada et al., 2001). Moreover, both the electrical and chemical stimulation of the prefrontal PFC increased the activity of DR 5-HT neurons and increased DR 5-HT release (Celada et al., 2001; Martin-Ruiz et al., 2001; Amargos-Bosch et al., 2003) giving support to the notion of an excitatory PFC input to DR 5-HT neurons.

Thus, PFC afferents to DR have a profound and complex influence on the activity of the ascending 5-HT systems, possibly in a region-dependent manner, with the infralimbic PFC having a more marked suppressing effect of 5-HT neuron activity via inputs onto DR GABA cells.

Likewise, the major afferent excitatory pathway to the VTA originates in the PFC, as reported by anatomical and electrophysiological studies (Thierry et al., 1979; Thierry et al., 1983b; Hurley et al., 1991; Sesack and Pickel, 1992; Tong et al., 1996a; Tong et al., 1998; Carr and Sesack, 2000; Gabbott et al., 2005; Geisler and Zahm, 2005). mPFC afferents synapse onto DA and non-DA (GABA) cells with well established connectivity patterns. Thus, DA neurons projecting back to PFC and to other unidentified structures (but not to *nucleus accumbens*) receive monosynaptic inputs from PFC (Carr and Sesack, 2000). Likewise, VTA GABAergic neurons projecting to *nucleus accumbens* are innervated by direct mPFC inputs (Carr and Sesack, 2000). In this manner, mPFC afferents can regulate the activity of the mesocortical DA pathway and the mesolimbic GABAergic pathway, in addition to DA and GABA cells projecting to other structures by monosynaptic excitatory inputs (Carr and Sesack, 2000). *In vitro* recordings in the VTA indicate that these excitatory inputs are important to elicit long-term changes in the activity of DA and GABA cells (Bonci and Malenka, 1999). *In vivo*

recordings indicate that PFC inputs are crucial to evoke burst firing in DA cells (Gariano and Groves, 1988; Overton and Clark, 1997) yet this may involve both direct and indirect pathways (via laterodorsal/pedunculopontine tegmentum) (Grace et al., 2007).

The present data may have several functional implications at the physiological and pathological levels. The ascending dopaminergic and serotonergic systems have been implicated in emotional control, in close relationship with other structures (PFC, cingulate cortex, hippocampus, amygdala, etc.) making up the extended limbic system (Morgane et al., 2005). Dopamine neurons increase their activity to signal rewards or reward-associated stimuli (Schultz 2004, 2007) and increases in raphe activity have also been reported in response to future rewards (Tanaka et al., 2004). On the other hand, both systems are involved in cognitive processes. Among other functions, DA and 5-HT play a role in the maintenance of persistent neuronal activity in dorsolateral PFC during working memory tasks (Williams and Goldman-Rakic, 1995; Williams et al., 2002).

Based on the present results, we suggest that relevant behavioral or emotional stimuli reaching the PFC may evoke concerted changes of the activity of the ascending dopaminergic and serotonergic neurons. This simultaneous control would occur within a very short temporal domain (typically <20 ms) and would concurrently set the dopaminergic and serotonergic tone in various subcortical and cortical areas (including the PFC). These phasic PFC inputs would add to the tonic regulation of 5-HT and DA activity which is strongly dependent on inputs from locus coeruleus (via α_1 -adrenoceptor activation; VanderMaelen and Aghajanian, 1983) and hippocampus (via nucleus accumbens-ventral pallidum inputs) (Grace et al., 2007), respectively.

Likewise, the present observations may have some implications for the pathophysiology and treatment of severe psychiatric disorders such as depression and schizophrenia. Persistent changes in the metabolic activity of the PFC in these disorders have been reported (Catafau et al., 1994; Andreasen et al., 1997; Shergill et al., 2000; Ressler and Mayberg, 2007). These alterations may translate into a malfunction of 5-HT and DA systems that perhaps underlie depressive and psychotic symptoms. Moreover, drugs acting on receptors/transporters highly expressed in the PFC such as antidepressant or atypical antipsychotic drugs may indirectly modulate the serotonergic and dopaminergic activity via actions on PFC targets (Bortolozzi et al.,

2003; Diaz-Mataix et al., 2005). Further work is required to examine whether DR- and or VTA-projecting neurons express antipsychotic-sensitive receptors.

Acknowledgements

Work supported by grants SAF 2007-62378 and SENY Fundació. PVB is recipient of a FPU predoctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education. We also thank Dr. J.L. Lanciego for helpful suggestions in tracer experiments during the course of this work.

References

- Aghajanian GK, Wang RY. 1977. Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique. *Brain Res* 122:229-242.
- Amargos-Bosch M, Adell A, Bortolozzi A, Artigas F. 2003. Stimulation of alpha1-adrenoceptors in the rat medial prefrontal cortex increases the local in vivo 5-hydroxytryptamine release: reversal by antipsychotic drugs. *J Neurochem* 87:831-842.
- Andreasen NC, O'Leary DS, Flaum M, Nopoulos P, Watkins GL, Boles Ponto LL, Hichwa RD. 1997. Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naive patients. *Lancet* 349:1730-1734.
- Arnt J, Skarsfeldt T. 1998. Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. *Neuropsychopharmacology* 18:63-101.
- Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P. 1996. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci* 19:378-383
- Benes FM, Berretta S. 2001. GABAergic interneurons: Implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 25:1-27 25:1-27.
- Bonci A, Malenka RC. 1999. Properties and plasticity of excitatory synapses on dopaminergic and GABAergic cells in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 19:3723-3730.
- Bortolozzi A, Amargos-Bosch M, Adell A, Diaz-Mataix L, Serrats J, Pons S, Artigas F. 2003. In vivo modulation of 5-hydroxytryptamine release in mouse prefrontal cortex by local 5-HT(2A) receptors: effect of antipsychotic drugs. *Eur J Neurosci* 18:1235-1246.
- Bymaster FP, Nelson DL, Delapp NW, Lucaites VL, Wainscott DB, Falcone JF, Eckols K, Foreman MM, Calligaro DO. 1996. The atypical antipsychotic olanzapine is

an antagonist at dopamine, serotonin and muscarinic receptor subtypes. *Schizophr Res.* 18:VIA2.

Carr DB, Sesack SR. 2000. Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J Neurosci* 20:3864-3873.

Catafau AM, Parellada E, Lomena FJ, Bernardo M, Pavia J, Ros D, Setoain J, Gonzalezmonclus E. 1994. Prefrontal and temporal blood-flow in Schizophrenia - Resting and Activation Technetium-99M-HMPAO-SPECT Patterns in Young Neuroleptic-Naive Patients with Acute Disease. *J Nucl Med* 35:935-941.

Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F. 2001. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* 21:9917-9929.

Chen S, Astonjones G. 1995. Evidence that Cholera-toxin-b Subunit (Ctb) Can be avidly taken up and transported by fibers of passage. *Brain Res* 674:107-111.

Clarke HF, Dalley JW, Crofts HS, Robbins TW, Roberts AC. 2004. Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion. *Science* 304:878-880.

Cortés R, Soriano E, Pazos A, Probst A, Palacios JM. 1988. Autoradiography of antidepressant binding sites in the human brain: Localization using [³H]mipramine and [³H]paroxetine. *Neuroscience* 27:473-496.

Dado RJ, Burstein R, Cliffer KD, Giesler GJ. 1990. Evidence That fluorogold can be transported avidly Through Fibers of Passage. *Brain Res* 533:329-333.

Diaz-Mataix L, Scorza MC, Bortolozzi A, Toth M, Celada P, Artigas F. 2005. Involvement of 5-HT_{1A} receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action. *J Neurosci* 25:10831-10843.

Drevets WC. 2001. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol* 11:240-29.

Fuller JH, Schlag JD. 1976. Determination of antidromic excitation by the collision test: problems of interpretation. *Brain Res* 112:283-98.

Fuster JM. 2001. The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. *Neuron* 30:319-333.

Gabbott PLA, Warner TA, Jays PRL, Salway P, Busby SJ. 2005. Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492:145-177.

Gao M, Liu CL, Yang S, Jin GZ, Bunney BS, Shi WX. 2007. Functional coupling between the prefrontal cortex and dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Neurosci* 27:5414-5421.

Gariano RF, Groves PM. 1988. Burst firing induced in midbrain dopamine neurons by stimulation of the medial prefrontal and anterior cingulate cortices. *Brain Res* 462:194-198.

Geisler S, Zahm DS. 2005. Afferents of the ventral tegmental area in the rat--anatomical substratum for integrative functions. *J Comp Neurol* 490:270-294.

Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ. 2007. Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* 30:220-227.

Groenewegen HJ, Uylings HB. 2000. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res* 126:3-28.:3-28.

Hajós M, Sharp T. 1998. Afferent regulation of dorsal raphe 5-HT neurones: possible role of cortical postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Soc Neurosci Abs* 24:1108.

Harrison PJ. 1999. The neuropathology of schizophrenia - A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122:593-624.

Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB. 1991. Efferent projections of the Infralimbic Cortex of the Rat. *J Comp Neurol* 308:249-276.

Jankowski MP, Sesack SR. 2004. Prefrontal cortical projections to the rat dorsal raphe nucleus: ultrastructural features and associations with serotonin and gamma-aminobutyric acid neurons. *J Comp Neurol* 468:518-529.

Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. 2005. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6:312-324.

Manji HK, Drevets WC, Charney DS. 2001. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med* 7:541-7 7:541-57.

Martin-Ruiz R, Puig MV, Celada P, Shapiro DA, Roth BL, Mengod G, Artigas F. 2001. Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. *J Neurosci* 21:9856-9866.

Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, Seminowicz D, Hamani C, Schwab JM, Kennedy SH. 2005. Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron* 45:651-660.

Mengod G, Martinez-Mir MI, Vilaró MT, Palacios JM. 1989. Localization of the mRNA for the dopamine D2 receptor in the rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8560-8564.

Miller EK, Cohen JD. 2001. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24:167-202.

Morgane PJ, Galler JR, Mokler DJ. 2005. A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol* 75:143-160.

Overton PG, Clark D. 1997. Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 25:312-334.

Paxinos G, Watson C. 1986. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney: Academic Press.

Paxinos G, Watson C. 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* (5th ed.). Sydney: Academic Press. (electronic edition).

Peters Y, Barnhardt NE, O'Donnell P. 2004. Prefrontal cortical up states are synchronized with ventral tegmental area activity. *Synapse* 52:143-152.

Peterson P, Peterson J, Finn P. 1990. Inherited predisposition to alcoholism: characteristics of sons of male alcoholics. *J Abnorm Psychol* 99:291-301.

Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH. 1998. Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience* 82:443-468.

Pieribone VA, Aston-Jones G. 1988. The iontophoretic application of fluoro-Gold for the study of afferents to deep brain nuclei. *Brain Res* 475:259-271.

Puig MV, Celada P, Diaz-Mataix L, Artigas F. 2003. In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT_{2A} receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cereb Cortex* 13:870-882.

Ressler KJ, Mayberg HS. 2007. Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. *Nat Neurosci* 10:1116-1124.

Robbins TW, Roberts AC. 2007. Differential regulation of Fronto-Executive function by the Monoamines and acetylcholine. *Cereb Cortex* 17:1151-1160.

Romo R, Salinas E. 2003. Flutter discrimination: Neural codes, perception, memory and decision making. *Nat Rev Neurosci* 4:203-218.

Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F. 2004. Expression of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14:1100-1109.

Schmued LC, Fallon JH. 1986. Fluorogold - A new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* 377:147-154.

Schmued LC, Heimer L. 1990. Iontophoretic injection of fluorogold and other fluorescent tracers. *J Histochem Cytochem* 38:721-723.

Schultz W. 2004. Neural coding of basic reward terms of animal learning theory, game theory, microeconomics and behavioural ecology. *Curr Opin Neurobiol* 14:139-147.

Schultz W. 2007. Multiple dopamine functions at different time courses. *Annual Review of Neuroscience* 30:259-288.

Selemon LD, Goldman-Rakic PS. 1999. The reduced neuropil hypothesis: A circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 45:17-25.

Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS. 1989. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 290:213-242.

Sesack SR, Pickel VM. 1992. Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 320:145-160.

Shergill SS, Brammer MJ, Williams SC, Murray RM, McGuire PK. 2000. Mapping auditory hallucinations in schizophrenia using functional magnetic resonance imaging. *Arch Gen Psychiatry* 57:1033-1038.

Tanaka SC, Doya K, Okada G, Ueda K, Okamoto Y, Yamawaki S. 2004. Prediction of immediate and future rewards differentially recruits cortico-basal ganglia loops. *Nat Neurosci* 7:887-893.

Thierry AM, Chevalier G, Ferron A, Glowinski J. 1983a. Diencephalic and mesencephalic efferents of the medial prefrontal cortex in the rat: electrophysiological evidence for the existence of branched axons. *Exp Brain Res* 50:275-282.

Thierry AM, Deniau JM, Chevalier G, Ferron A, Glowinski J. 1983b. An electrophysiological analysis of some afferent and efferent pathways of the rat prefrontal cortex. *Prog Brain Res* 58:257-61.

Thierry AM, Deniau JM, Feger J. 1979. Effects of Stimulation of the Frontal-Cortex on Identified Output Vmt Cells in the Rat. *Neurosci Lett* 15:103-107.

Tong ZY, Overton PG, Clark D. 1996a. Antagonism of NMDA receptors but not AMPA/kainate receptors blocks bursting in dopaminergic neurons induced by electrical stimulation of the prefrontal cortex. *J Neural Transm* 103:889-904.

Tong ZY, Overton PG, Clark D. 1996b. Stimulation of the prefrontal cortex in the rat induces patterns of activity in midbrain dopaminergic neurons which resemble natural burst events. *Synapse* 22:195-208.

Tong ZY, Overton PG, Martinez-Cue C, Clark D. 1998. Do non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area play a role in the responses elicited in A10 dopaminergic neurons by electrical stimulation of the prefrontal cortex? *Exp Brain Res* 118:466-476.

VanderMaelen CP, Aghajanian GK. 1983. Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res* 19:109-119.

Varga V, Szekely AD, Csillag A, Sharp T, Hajos M. 2001. Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurons. *Neuroscience* 106:783-792.

Weiner DM, Levey AI, Sunahara RK, Niznik HB, O'Dowd BF, Seeman P, Brann MR. 1991. D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:1859-1863.

Williams GV, Goldman-Rakic PS. 1995. Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* 376:572-575.

Williams GV, Rao SG, Goldman-Rakic PS. 2002. The physiological role of 5-HT_{2A} receptors in working memory. *J Neurosci* 22:2843-2854.

Trabajo 2

Pyramidal neurons in rat prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area and dorsal raphe nucleus express 5-HT_{2A} receptors

Pablo Vázquez-Borsetti, Roser Cortés, Francesc Artigas.

En este trabajo se combinaron técnicas de inmunohistoquímica con técnicas de hibridación in situ con oligonucleótidos de ADN, siendo uno de los primeros trabajos conocidos por nosotros donde se hayan podido combinar ambas técnicas. Se determinó que una gran proporción de las neuronas de proyección a los núcleos aminérgicos del ATV y el RD contenían el mensajero del receptor 5-HT_{2A}. En el caso del ATV se observó que los porcentajes para la CPFm oscilaban entre el 43 y el 60% con una media de $52 \pm 5\%$ mientras que para la OFC se encontraron proporciones de 45% y 71% en dos de las ratas inyectadas. En el caso del RD se obtuvieron resultados similares. Para la CPFm la proporción de neuronas de proyección que expresaban el 5-HT_{2A} fue de entre 60% y 67% para la corteza derecha y de entre 59% y 71% para la corteza izquierda. Además se encontraron una gran cantidad de neuronas de proyección en el OFC que también expresaban el mensajero del receptor 5-HT_{2A} 64% a 75% en la corteza derecha y en la izquierda (73% a 81%). Una cuestión que a veces aflora en las discusiones sobre las hibridaciones in situ es si la presencia del mensajero demuestra la presencia de la proteína. En los materiales suplementarios de este trabajo mostramos además una inmunohistoquímica del receptor 5-HT_{2A} donde se ve su presencia en una neurona de proyección doble VTA-DR.

Enviado a la revista **Cerebral Cortex**

Pyramidal neurons in rat prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area and dorsal raphe nucleus express 5-HT_{2A} receptors

Pablo Vázquez-Borsetti¹, Roser Cortés^{1,3}, Francesc Artigas^{1,2}

*¹Department of Neurochemistry and Neuropharmacology,
Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), IDIBAPS*

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)

*³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas
(CIBERNED)*

08036 Barcelona, Spain

Address correspondence to Francesc Artigas, PhD; Department of Neurochemistry, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), IDIBAPS, Rosselló, 161, 6th floor, 08036 Barcelona, Spain. Phone: +3493-363 8315; Fax: +3493-363 8301; e-mail: fapnqi@iibb.csic.es

Running title: *5-HT_{2A} receptors in PFC projections to monoaminergic nuclei*

Abstract

The prefrontal cortex (PFC) is involved in higher brain functions altered in schizophrenia. Classical antipsychotics modulate cortico-limbic circuits mainly through subcortical D2 receptor blockade, whereas second generation (atypical) antipsychotics preferentially target cortical 5-HT receptors. Anatomical and functional evidence supports a PFC-based control of the brainstem monoaminergic nuclei. Using a combination of retrograde tracing experiments and *in situ* hybridization we report that a substantial proportion of PFC pyramidal neurons projecting to the dorsal raphe (DR) and/or ventral tegmental area (VTA) express 5-HT_{2A} receptors. Cholera toxin B application into the DR and the VTA retrogradely labeled projection neurons in the medial PFC (mPFC) and in orbitofrontal cortex (OFC). *In situ* hybridization of 5-HT_{2A} receptor mRNA in the same tissue sections labeled a large neuronal population in mPFC and OFC. The percentage of DR-projecting neurons expressing 5-HT_{2A} receptor mRNA was 59-71% in mPFC and 64-81% in OFC (n = 3 rats). Equivalent values for VTA-projecting neurons were 43-60% in the mPFC and 45-71 % in the ventral OFC. Thus, 5-HT_{2A} receptor activation/blockade in mPFC may have downstream effects on dopaminergic and serotonergic systems via direct descending pathways. This suggests that atypical antipsychotics may distally modulate monoaminergic activity through PFC 5-HT_{2A} receptor blockade.

Key words: antipsychotics; dopamine; pyramidal neurons; schizophrenia; serotonin receptors

The PFC is critically involved in many higher brain functions, including cognitive functions and behavioral control, which are altered in schizophrenic patients (Lewis and Lieberman, 2000; Weinberger et al., 2001; Elvevag and Goldberg, 2000). Autopsy and neuroimaging studies have revealed the existence of a reduced PFC volume, reduced layer thickness, tight packing of pyramidal neurons and reduced neuropil in the brains of schizophrenic patients (Harrison, 1999; Selemon and Goldman-Rakic, 1999; Lewis and Lieberman, 2000). Alterations in key neurotransmitters such as glutamate, GABA and dopamine have also been reported in PFC (Lewis and Lieberman, 2000; Benes and Berretta, 2001; Lewis et al., 2005). Moreover, untreated schizophrenic patients show a reduced energy metabolism in the PFC which has been related with negative symptoms (Andreasen et al., 1997; Potkin et al., 2002) yet psychotic symptoms appear associated with hyperactivity of various cortical areas, including the PFC (Catafau et al., 1994; Dierks et al., 1999; Shergill et al., 2000).

Classical antipsychotic drugs are thought to alleviate schizophrenia symptoms by dampening the overactivity of dopamine (DA) at D2 receptor in ventral striatum. In contrast, second generation (atypical) antipsychotics preferentially target serotonin (5-HT) receptors such as 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} and 5-HT_{1A} receptors (Bymaster et al., 1996; Arnt and Skarsfeldt, 1998; Chou et al., 2003). These receptors are densely expressed in various subfields of the rat PFC, particularly in its medial aspect (Pompeiano et al., 1992; Pompeiano et al., 1994). Recent studies have established their presence in a large proportion of PFC pyramidal and GABAergic neurons. In particular, 50-60% of the pyramidal neurons in layers II/III and V of the medial PFC (mPFC) express 5-HT_{2A} and/or 5-HT_{1A} receptors (Amargós-Bosch et al., 2004; Santana et al., 2004).

Anatomical and electrophysiological studies have established the presence of direct afferents from cingulate, prelimbic and infralimbic areas of the PFC to the brainstem monoaminergic nuclei, including the dorsal raphe nucleus (DR) (Aghajanian and Wang, 1977; Sesack et al., 1989; Hajós et al., 1998; Peyron et al., 1998; Celada et al., 2001) and the ventral tegmental area (VTA) (Thierry et al., 1979; Thierry et al., 1983; Tong et al., 1996; Tong et al., 1998; Carr and Sesack, 2000). These nuclei give rise to the ascending serotonergic and dopaminergic innervation of most cortical and limbic brain regions, involved in numerous physiological functions and

in severe psychiatric conditions such as major depression and schizophrenia (Carlsson, 1988; Jacobs and Azmitia, 1992; Weinberger et al., 1994; Williams and Goldman-Rakic, 1995; Laruelle et al., 1996; Robbins, 2000; Tzschentke and Schmidt, 2000; Schultz, 2004).

Previous studies have reported that the systemic administration of 5-HT_{2A} receptor ligands such as DOI (5-HT_{2A/2C} receptor agonist) or M100907 (selective 5-HT_{2A} receptor antagonist) modulates the DA system (Gobert and Millan, 1999; Ichikawa et al., 2001; Minabe et al., 2001; Pehek et al., 2001; Porras et al., 2002), yet the location of the receptors responsible for these effects was unknown. More recently, it was reported that the local application of DOI in mPFC increased burst firing of DA cells in the VTA and the DA output in the mesocortical DA pathway (Bortolozzi et al., 2005). Similarly, local DOI application in the mPFC enhanced the firing rate of DR 5-HT neurons and 5-HT output in rat mPFC (Martín-Ruiz et al., 2001; Amargós-Bosch et al., 2004). These observations suggested that the activity of the ascending cortical DA and 5-HT systems can be modulated by 5-HT_{2A} receptor activation in pyramidal neurons projecting to midbrain.

In the present study, we provide histological support to this hypothesis by using a combination of tract-tracing techniques and subsequent *in situ* hybridization of 5-HT_{2A} receptor mRNA in PFC sections containing retrogradely-labeled neurons projecting to DR or VTA.

Experimental Procedures

Animals

Male albino Wistar rats (Iffa Credo, Lyon, France) weighing 250-300 g were used in this study. Animals were kept in a controlled environment (12 h light/dark cycle and 22 ± 2°C room temperature) with food and water provided *ad libitum*. All experimental procedures used in this study were in strict compliance with the Spanish legislation and the European Communities Council Directive on 'Protection of Animals Used in Experimental and Other Scientific Purposes' of 24 November 1986 (86/609/EEC). Animal work was carried out in the animal facilities of the School of Medicine of the University of Barcelona and all protocols used were approved by its Ethical

Committee for Animal Research and by the “Departament de Medi Ambient i Habitatge” from the Catalan Government (Generalitat de Catalunya).

Animals were deeply anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg i.p.), and placed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments). Glass capillary tubes were heated and pulled with a Narishige PE-2 pipette puller (Narishige Sci. Inst., Tokyo, Japan), Tips were broken to 30 μ m diameter under microscopic control. The micropipettes were then filled with a solution of cholera toxin B subunit (CTB, 2% in distilled water, List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA). CTB was iontophoretically injected into the DR (AP -7.6 to -7.8; L -3.1 with a vertical 30° angle; DV -6.2 to -6.8; n = 3) or the VTA (AP -5.6 to -6.0; L -0.5; DV -8.2; n = 3). Stereotaxic coordinates were taken from the atlas of Paxinos and Watson (1986). The iontophoretic injections were performed using a 5 μ A positive-pulsed direct current for a total of 5 min (7 s on/off for 10 min). After surgery, rats were housed individually. Ten days after surgery, the animals were anesthetized with an i.p. overdose of sodium pentobarbital and perfused transcardially with 50 mL of calcium-free Tyrode's solution (6.8 g/L NaCl; 0.4 g/L KCl; 0.32 g/L MgCl₂·6H₂O; 0.10 g/L MgSO₄·7H₂O; 0.17 g/L NaH₂PO₄·H₂O; 2.2 g/L NaHCO₃; 1.1 g/L glucose) containing 0.1% heparin at 37°C, followed by 50 mL of warm (37°C) and 300 ml of cold (4°C) fixative (4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.9). After perfusion, the skull was opened and the brain carefully removed and stored for 2 days in a cryoprotective solution (10% sucrose in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4). The brains were then frozen by slow immersion into dry-ice chilled isopentane. Tissue sections, 14 μ m thick, were cut on a microtome-cryostat (Microm HM500 OM, Walldorf, Germany), and thaw-mounted onto glass slides pretreated with Histogrip (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA).

Localization of Injection Sites

Tissue sections taken at the level of the injection sites (VTA or DR) were incubated during 3-4 days in a humid chamber at 4°C with a rabbit antiserum anti-CTB (1:1000; Sigma, St. Louis, MI, USA) alone or in combination with sheep anti-tryptophan hydroxylase (TPH) antiserum (1:100; Chemicon Intl.) or an anti-tyrosine hydroxylase (TH) monoclonal antibody (1:1000; Diasorin, Stillwater, MN, USA). Then the sections were rinsed in 0.1M phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 30 min at

37°C with appropriate combinations of the following antisera (1:500, Molecular Probes, Leiden, NL): Alexa Fluor 546-conjugated goat anti-rabbit (for CTB) and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse (for TH) or Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-rabbit (for CTB) and Alexa Fluor 546-conjugated donkey anti-goat (for TPH). Finally, the sections were washed in PBS and coverslipped using Mowiol (Merck, Darmstadt, Germany). The sections were observed and photographed in an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E1000, Nikon, Tokyo, Japan).

In Situ Hybridization Histochemistry Procedure

Sections through the PFC from rats injected with CTB were hybridized with probes against the 5-HT_{2A} receptor mRNA. We used simultaneously three oligonucleotide probes complementary to bases 128-170, 1380-1427 and 939-987 (GenBank accession no. NM_017254) (Pritchett et al., 1988). These probes were synthesized on a 380 Applied Biosystem DNA synthesizer (Foster City Biosystem, Foster City, CA) and purified on a 20% polyacrylamide/8 M urea preparative sequencing gel. The oligonucleotides (2 pmol each) were labeled at their 3'-end with [³³P]α-dATP (>2500 Ci/mmol; Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) using terminal deoxynucleotidyltransferase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), and then purified by centrifugation using QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

The protocols for *in situ* hybridization were based on previously described procedures (Tomiya et al., 1997). Briefly, frozen tissue sections were first brought to room temperature, fixed for 20 min at 4°C in 4% paraformaldehyde in Dulbecco's phosphate-buffered saline (1x dPBS: 8 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 2.6 mM KCl), washed for 5 min in 3x PBS at room temperature, twice for 5 min each in 1x dPBS and incubated for 2 min at 21°C in a solution of predigested pronase (Calbiochem, San Diego, CA) at a final concentration of 24 U/ml in 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM EDTA. The enzymatic activity was stopped by immersion for 30 s in 2 mg/ml glycine in 1x dPBS. Tissues were finally rinsed in 1x dPBS and dehydrated through a graded series of ethanol. For hybridization, the labeled probes were diluted in a solution containing 50% formamide, 4x SSC (1x SSC: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate), 1x Denhardt's solution (0.02% Ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone, 0.02% bovine serum albumin), 10% dextran sulfate, 1% sarkosyl, 20 mM phosphate

buffer pH 7.0, 250 µg/ml yeast tRNA and 500 µg/ml salmon sperm DNA. Tissue sections were covered with hybridization solution containing the labeled probe, overlaid with Nescofilm coverslips (Bando Chemical Ind., Kobe, Japan) and incubated overnight at 42°C in humid boxes. Sections were then washed four times (45 min each) in washing buffer (0.6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5) at 60°C and once in the same buffer at room temperature for 30 min.

The specificity of the hybridization signal obtained with the probes used has been previously established (Pompeiano et al., 1994). These controls included the following procedures: (i) the thermal stability of the hybrids obtained was checked for every probe, (ii) for a given oligonucleotide probe, the hybridization signal was completely blocked by competition of the labeled probe in the presence of 50-fold excess of the same unlabeled oligonucleotide, and (iii) the distribution of the hybridization signal at the regional and cellular levels obtained with the three probes used independently was identical.

CTB Immunohistochemistry on Hybridized Sections

After the in situ hybridization protocol, tissue sections were kept for 15 minutes in Tris-HCl buffer (0.10 M pH 7.5) containing 1 M NaCl, 2 mM MgCl₂·6H₂O and 2% BSA. This buffer was also used in subsequent incubations and washes unless specified. The sections were first incubated for 4 hr at 37°C with rabbit anti-CTB antiserum (1:1000; Sigma, St. Louis, MI, USA). Subsequently the sections were washed 3 times (5 min each) and then incubated 30 minutes with biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulins (1:100, Vector Laboratories). After three 5-min washes, the sections were incubated for one hour in Vectastain Elite ABC solution (Vector Laboratories) in a low salt buffer (0.6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5). Sections were then washed 3 times and immersed in a solution of 0.5 mg/mL 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich) in Tris-HCl 0.05 M pH 7.5 containing 1 µl/mL H₂O₂ until color development (in all cases less than 10 minutes). The reaction was stopped by two rinses in buffer. CTB staining appeared as brown/orange precipitate in the soma and proximal dendrites of retrogradely-labeled neurons. The sections were then briefly dipped in 70 and 100% ethanol, air-dried and dipped into Ilford K5 nuclear emulsion (Ilford, Mobberly, Cheshire, UK) diluted 1:1 with distilled water. They were exposed in the dark at 4°C for 6 weeks and were finally developed in Kodak D19 (Kodak,

Rochester, NY) for 5 min, fixed in Ilford Hypam fixer (Ilford), washed and coverslipped using Mowiol (Merck).

In some rats, double tracing experiments (CTB and Fluorogold) were performed by applying tracers in the VTA and DR. Visualization of both tracers in combination with 5-HT_{2A} receptor-immunoreactivity is described in [Supplementary methods](#).

Analysis of the Results

Tissue sections processed for in situ hybridization followed by immunohistochemical detection of CTB were examined in a Nikon Eclipse E1000 microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Cell counting was performed manually at the microscope with the help of “analySIS” software (Soft Imaging System GmbH, Germany) in 1-3 coronal sections of each rat corresponding to approximately +3.2 mm from Bregma, according to atlases of the rat brain (Paxinos and Watson, 1986; Swanson, 1999). DAB-labeled cells were considered positive when a dark precipitate was clearly distinguished from background. Only CTB-labeled cells showing great abundance of 5-HT_{2A} receptor mRNA signal (densities of silver grains >3-fold greater than average background) were considered positive for both markers. Since the presence of high densities of autoradiographic silver grains might sometimes mask DAB-labeling, cells in the preparations were systematically examined at different focal planes to see CTB-immunoreactivity at lower planes and hybridization signal at upper planes. Micrography was performed using a digital camera (Color View 12) and the software “analySIS”. Digital images were treated with Adobe Photoshop (Adobe Software, Mountain View, CA, USA) to adjust only brightness, contrast and size to make the final figures.

Results

The data reported here correspond to 6 rats in which CTB was microiontophoretically applied into the VTA or the DR ($n = 3$ for each site). In all cases, the applied CTB was confined within the respective nucleus, as shown by the co-localization of the tracer and the markers for dopaminergic neurons of the VTA (TH) and serotonergic neurons of the DR (TPH). Figure 1 shows representative fluorescence microscope images illustrating the localization of CTB in the VTA (1A) and the DR (1B) of two of the rats used in the study. Schematic drawings in Figure 2 illustrate the location of the different microinjections performed in the VTA and DR.

The application of CTB in the DR or the VTA resulted in the labeling of pyramidal neurons in layer V and superficial aspect of layer VI in the medial PFC, including the cingulate (Cg), prelimbic (PL) and infralimbic (IL) subdivisions. CTB-labeled neurons were also found in the OFC. These cells were located mainly in the ventral OFC of VTA-injected rats whereas they extended more laterally, reaching the agranular insular cortex in rats injected with CTB in the DR. Tracer application in the DR resulted in the labeling of PFC neurons in both hemispheres, whereas the application in the VTA labeled almost exclusively neurons in the ipsilateral hemisphere. Figure 3 shows the schematic location of CTB-retrogradely labeled neurons in the PFC of two rats (V2 and D2 in tables 1 and 2, respectively) injected with the tracer in the VTA (V2, Fig. 3A) and in the DR (D2, Fig. 3B), respectively. Each dot corresponds to 3 CTB-labeled pyramidal neurons.

Figure 4 shows 5-HT_{2A} receptor mRNA labeling in VTA-projecting neurons in the mPFC. The presence of the 5-HT_{2A} receptor mRNA was established by dense clusters of silver grains, clearly distinguishable from background. As previously observed (Amargós-Bosch et al., 2004; Santana et al., 2004), a large proportion of cells in the cingulate, prelimbic and infralimbic subdivisions of the PFC were found that contained the 5-HT_{2A} receptor transcript, mainly in layers II/III and V. No 5-HT_{2A} receptor-positive cells were found in layer I and a lower abundance of 5-HT_{2A} receptor-positive cells was observed in layer VI compared to layers III-V. In occasions, the density of silver grains made difficult the detection of CTB-immunoreactivity. In these cases, and since CTB-immunoreactivity and silver grains are localized at different depths of the tissue preparation, a careful inspection of

individual cells was performed by examining different planes of the preparation, which contain the CTB signal (lower plane) and the emulsion for *in situ* hybridization (upper plane). Table 1 shows the number of CTB-positive cells and the percentage of double-labeled cells in the mPFC and ventral OFC of the three rats injected with CTB in the VTA. The percentage of CTB-positive cells that expressed 5-HT_{2A} receptors in the mPFC was rather high and homogenous (43-60%; 52 ± 5% on average). Two of the rats also exhibited a moderate-high (45-71%) percentage of CTB-positive neurons expressing the 5-HT_{2A} receptor in the ventral OFC. No unambiguous CTB-positive cells could be detected in the third animal. It is likely that these individual differences depend on the size and precise site of injection of CTB within the VTA. Representative examples of single-labeled (CTB- or 5-HT_{2A} receptor mRNA- positive) and double-labeled (CTB- and 5-HT_{2A} receptor mRNA positive) cells are shown at a high magnification in Fig. 4 C-E.

A large proportion of CTB-positive pyramidal neurons in the mPFC and OFC of both hemispheres as labeled by tracer application in the DR also contained 5-HT_{2A} receptor transcripts (Fig. 5, 6 and Table 2). The percentage of CTB-positive cells that expressed 5-HT_{2A} receptors was also high and showed little variability in the three rats examined. Representative examples of single-labeled (CTB- or 5-HT_{2A} receptor mRNA- positive) and double-labeled (CTB- and 5-HT_{2A} receptor mRNA-positive) cells are shown at a high magnification in Fig. 5 (C-E) and Fig. 6 (C-E).

In a recent study (see preliminary report in Vazquez-Borsetti et al., 2006), we report on the presence of an abundant number of pyramidal neurons in the mPFC that exhibit simultaneous projections to the DR and the VTA, as assessed by electrophysiological (antidromic potential and collision tests) and tract-tracing methods, using CTB and fluorogold (FG). The present results indicate that VTA- and DR-projecting pyramidal cells in the mPFC express 5-HT_{2A} receptors, raising the possibility that such receptors are expressed in dual-projecting neurons. We performed pilot experiments to examine this possibility in rats injected with CTB in the DR and fluorogold in the VTA. In this case, triple labeling was conducted using 5-HT_{2A} receptor-like immunoreactivity. Double labeling (5-HT_{2A} receptor-IR and CTB- or FG-IR) was observed in mPFC neurons and occasional triple labeling was observed as in the example shown in [Supplementary material 1](#).

Table 1. 5-HT_{2A} receptor expression in PFC neurons projecting to VTA

Rat	PFC region	CTB+	CTB + / 5HT _{2A} +	% double-labeled cells
V1	mPFC	24	10	43%
	OFC (ventral)	21	10	45%
V2	mPFC	17	10	53%
	OFC (ventral)	14	9	71%
V3	mPFC	90	54	60%
	OFC (ventral)	0	0	--

Values are numbers of CTB-positive neurons in each structure (1-2 sections/rat), as determined by CTB-immunoreactivity (CTB+). CTB-positive neurons that are also positive for the 5-HT_{2A} receptor transcript (CTB + / 5HT_{2A} +), were identified by the presence of the two markers (see Methods). Only neurons with unambiguous labeling for both markers were considered positive, as in the examples shown in panel B of figure 3.

Table 2. 5-HT_{2A} receptor expression in PFC neurons projecting to DR

Rat	PFC region	CTB+	CTB + / 5HT _{2A} +	% double-labeled cells
D1	mPFC, ipsilateral*	8 ± 3	5 ± 2	60%
	OFC, ipsilateral*	16 ± 3	12 ± 1	75%
	mPFC contralateral*	13 ± 6	9 ± 4	67%
	OFC contralateral*	18 ± 6	14 ± 5	81%
D2	mPFC, ipsilateral	21 ± 11	14 ± 8	67%
	OFC, ipsilateral	25 ± 13	20 ± 10	79%
	mPFC contralateral	16 ± 8	10 ± 5	59%
	OFC contralateral	24 ± 6	17 ± 5	73%
D3	mPFC, ipsilateral	16 ± 3	10 ± 2	60%
	OFC, ipsilateral	40 ± 4	25 ± 1	64%
	mPFC contralateral	6 ± 3	4 ± 2	71%
	OFC contralateral	23 ± 12	17 ± 15	75%

Values are the numbers of CTB-positive neurons in each structure (mean ± SEM, 3 sections/rat), as determined by CTB-immunoreactivity (CTB+). CTB-positive neurons that are also positive for the 5-HT_{2A} receptor transcript (CTB + / 5HT_{2A} +), were identified by the presence of the two markers (see Methods). Only neurons with unambiguous labeling for both markers were considered positive, as in the examples shown in panel B of figures 4 and 5.

*CTB application was aimed at the midline in the DR. However, the micropipette entered the brain with an angle of 30° to avoid the sinus. Thus, we use the term ipsilateral to refer to the brain hemisphere where the micropipette first entered the midbrain.

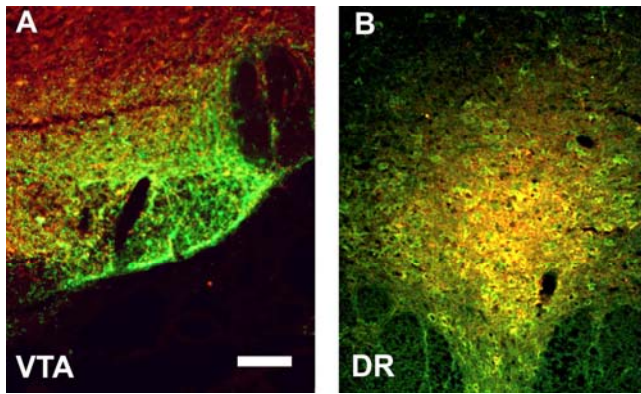


Figure 1. Double immunolabeling showing the localization of CTB injection sites. (A) TH (red) and CTB (green) in the VTA. (B) TPH (red) and CTB (green) in the DR. The images were taken at the fluorescence microscope and were merged using the software “analySIS”. Scale bar: 100µm.

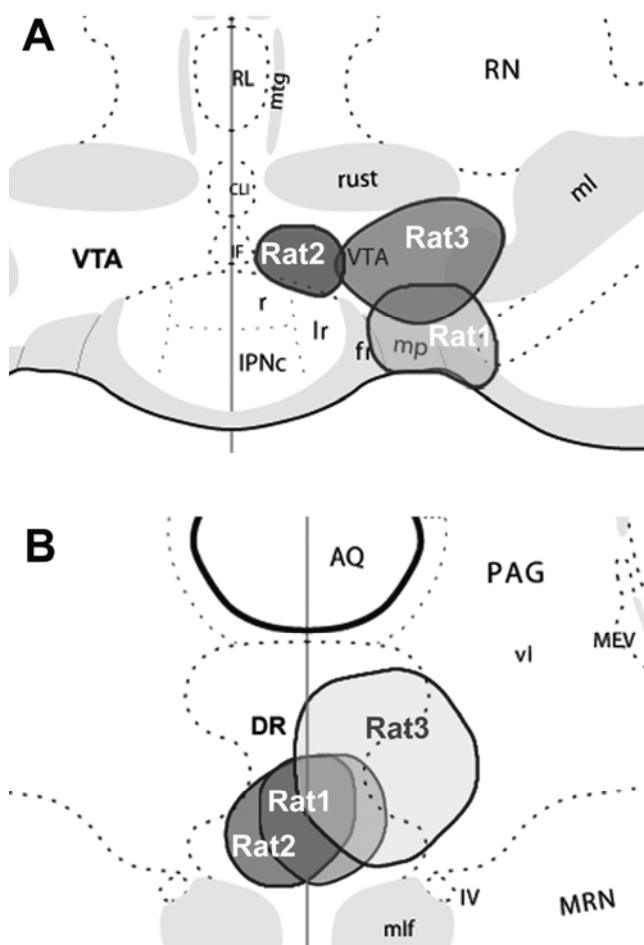


Figure 2. Schematic drawings of coronal sections through the VTA (A) and the DR (B) illustrate the precise location of CTB injections (shaded areas) in the different rats used in this study, as assessed by CTB immunolabeling, as in Figure 1. Drawings were taken from Swanson (1999).

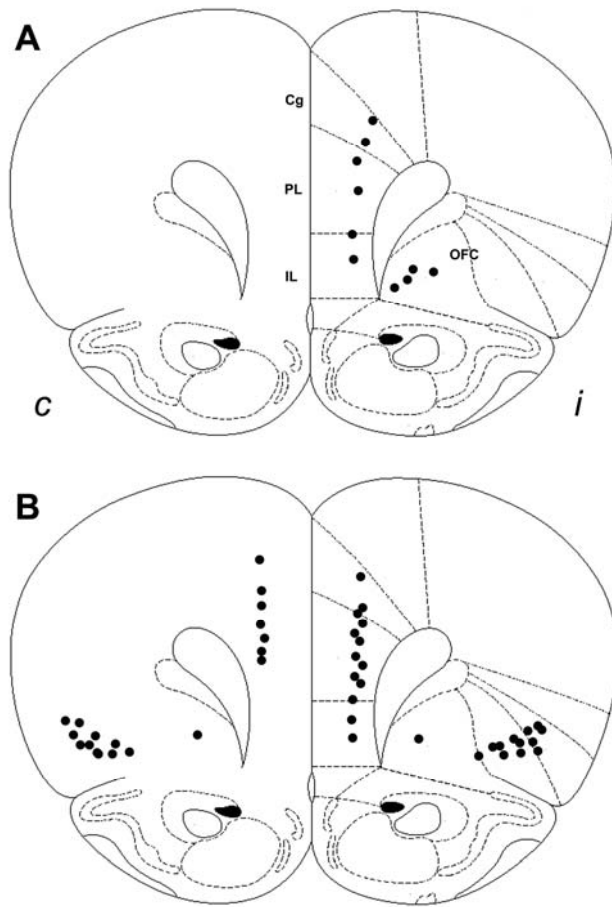


Figure 3. Schematic drawings of coronal sections through the PFC illustrating the localization of CTB-retrogradely labeled cells after tracer injections in the VTA of rat V2 (A) and the DR of rat D2 (B). Every dot represents 3 labeled cell bodies. (A) CTB injections in the VTA only labeled cell bodies in the ipsilateral (i) mPFC (including Cg, PL and IL) and medial (ventral) part of the OFC. (B) CTB injections in the DR labeled cell in the mPFC and OFC of both ipsilateral and contralateral (c) hemispheres. Abbreviations used: Cg, cingulate cortex; IL, infralimbic cortex; OFC, orbitofrontal cortex; PL, prelimbic cortex. Drawings were taken from Paxinos and Watson (1986)

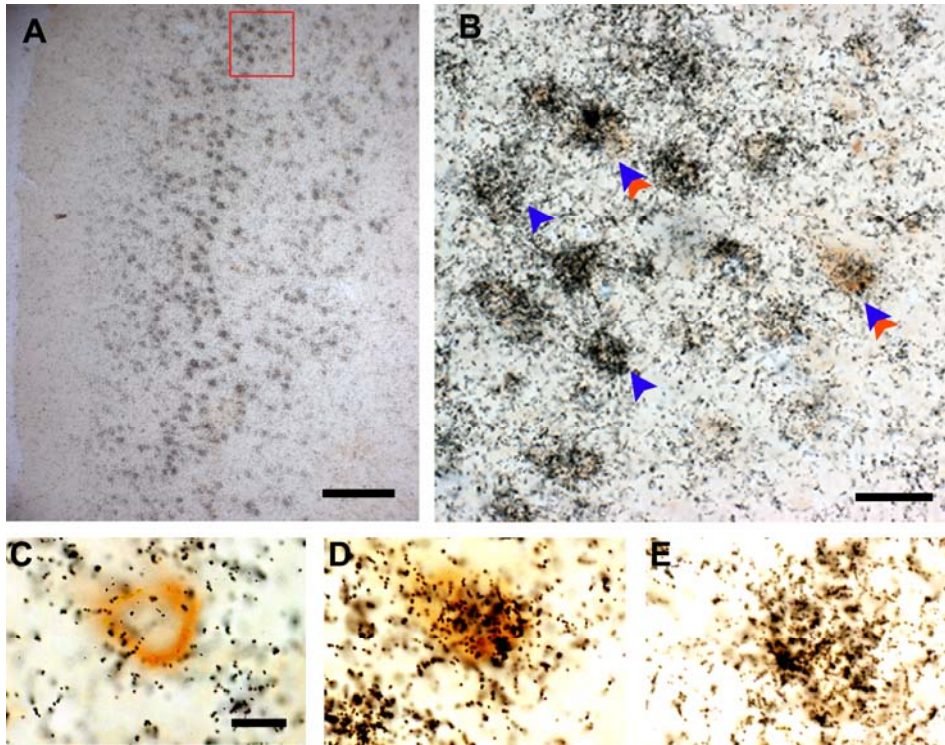


Figure 4. Colocalization of 5-HT_{2A} receptor mRNA hybridization signal and CTB-immunoreactivity in the mPFC after injection of the tracer in the VTA. (A) Clusters of autoradiographic grains corresponding to 5-HT_{2A} receptor mRNA-containing cells are clearly visible in layers II-VI at a low magnification; the strongest signal is found in layer V neurons. The boxed area is shown in panel B at a higher magnification. (B) CTB-immunoreactivity (brown precipitate) can be seen in some cells under the hybridization signal (red-blue double arrowheads), whereas other cells display only 5-HT_{2A} receptor mRNA signal (blue arrowheads). (C) Detail of a CTB-immunoreactive neuron which lacks the hybridization signal. (D) Detail of a double-labeled neuron containing CTB-immunoreactivity and a strong 5-HT_{2A} receptor mRNA hybridization signal. (E) Detail of a cell profile showing 5-HT_{2A} receptor mRNA signal without CTB-immunoreactivity. Bars: 200 μm (A), 30 μm (B), 10 μm (C-E).

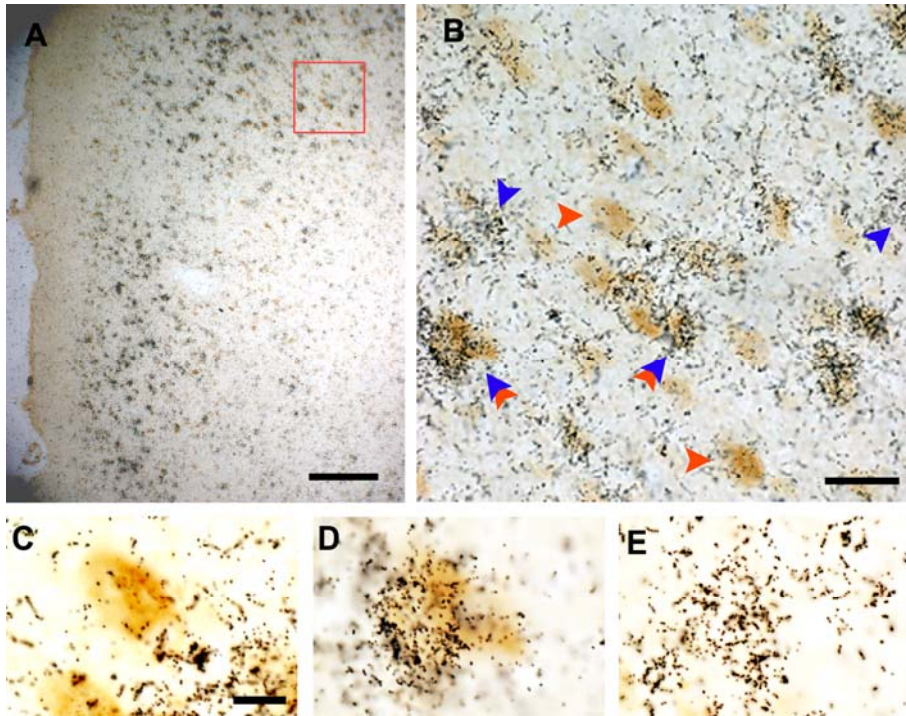


Figure 5. Colocalization of 5-HT_{2A} receptor mRNA hybridization signal and CTB-immunoreactivity in the mPFC after injection of the tracer in the DR. (A) Clusters of autoradiographic grains corresponding to 5-HT_{2A} receptor mRNA-containing cells are clearly visible in layers II-VI at a low magnification. The boxed area is shown in panel B at a higher magnification. (B) CTB-immunoreactivity (brown precipitate) can be seen in some cells under the hybridization signal (red-blue double arrowheads) and in cells lacking hybridization signal (red arrowheads), whereas other cells display only 5-HT_{2A} receptor mRNA signal (blue arrowheads). (C) Detail of a CTB-immunoreactive neuron which lacks the hybridization signal. (D) Detail of a double-labeled neuron containing CTB-immunoreactivity and a strong 5-HT_{2A} receptor mRNA hybridization signal. (E) Detail of a cell profile showing 5-HT_{2A} receptor mRNA signal without CTB-immunoreactivity. Bars: 200 μm (A), 30 μm (B), 10 μm (C-E).

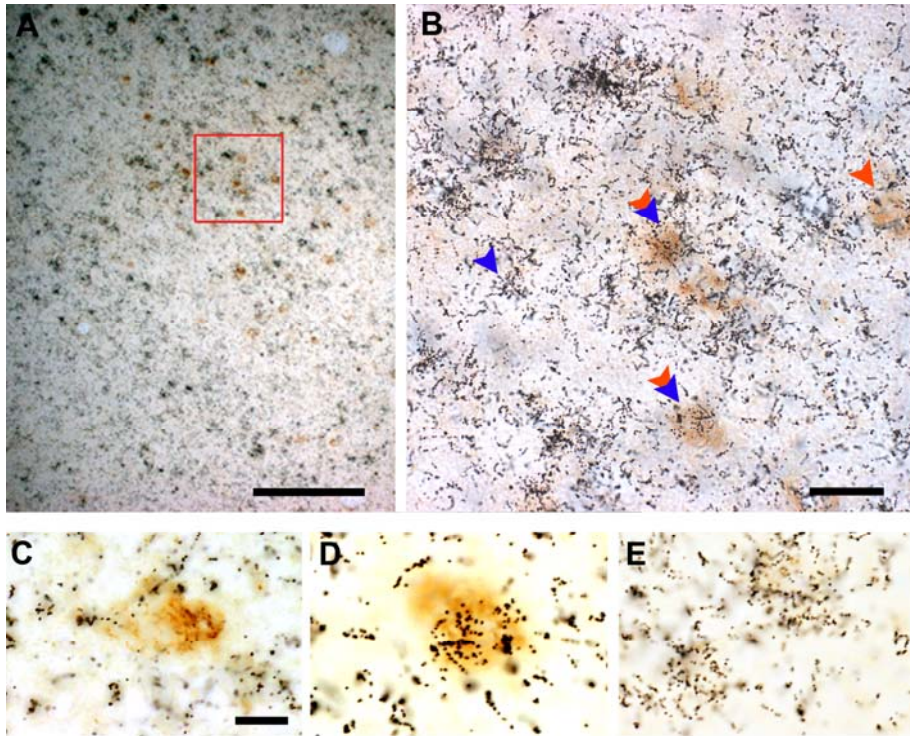


Figure 6. Colocalization of 5-HT_{2A} receptor mRNA hybridization signal and CTB-immunoreactivity in the OFC after injection of the tracer in the DR. (A) Clusters of autoradiographic grains corresponding to 5-HT_{2A} receptor mRNA-containing cells are clearly visible at a low magnification. The boxed area is shown in panel B at a higher magnification. (B) CTB-immunoreactivity (brown precipitate) can be seen in some cells under the hybridization signal (red-blue double arrowheads) and in cells lacking hybridization signal (red arrowheads), whereas other cells display only 5-HT_{2A} receptor mRNA signal (blue arrowheads). (C) Detail of a CTB-immunoreactive neuron which lacks of hybridization signal. (D) Detail of a double-labeled neuron containing CTB-immunoreactivity and 5-HT_{2A} receptor mRNA hybridization signal. (E) Detail of a cell profile showing 5-HT_{2A} receptor mRNA signal without CTB-immunoreactivity. Bars: 200 μm (A), 30 μm (B), 10 μm (C-E).

Discussion

The present results indicate that a substantial proportion (>50% on average) of pyramidal neurons in the PFC projecting to the midbrain monoaminergic nuclei (DR and/or VTA) contain the 5-HT_{2A} receptor transcript. These results provide anatomical evidence for the existence of a PFC-based, 5-HT_{2A} receptor-mediated distal control of the activity of the ascending dopaminergic and serotonergic systems. From a psychopharmacological perspective, the present data suggest that atypical antipsychotics may modulate the activity of the ascending dopaminergic and serotonergic systems by interacting with PFC 5-HT_{2A} receptors, thus altering the excitatory PFC input onto selected neuronal populations within the DR and the VTA.

Methodological Considerations

5-HT_{2A} receptors are expressed in high densities in PFC (Pazos et al., 1985; Pompeiano et al., 1994). More recent data using double *in situ* hybridization indicate that ~50-60% pyramidal neurons and ~20-30% GABAergic neurons in layers II-V of the mPFC contain the 5-HT_{2A} receptor mRNA (Santana et al., 2004). Our results are consistent with these previous observations and show the presence of a high number of 5-HT_{2A} receptor mRNA-expressing cells in the cingulate, prelimbic and infralimbic subdivisions of the PFC, mainly in layers II-V and a lower abundance in layer VI, as observed previously (Pompeiano et al., 1994; Amargós-Bosch et al., 2004; Santana et al., 2004). This demonstrates that the *in situ* hybridization procedure reliably labeled 5-HT_{2A} receptor-expressing cells in the present experimental conditions, i.e., when the hybridization procedure was followed by immunostaining of CTB in the same tissue sections. The present methodology has also been used to determine the presence of 5-HT₄ receptors in PFC neurons projecting to VTA (Peñas et al., manuscript in preparation). Recent reports have used riboprobes in combination with tract tracers (Hur and Zaborszky, 2005; Perez-Manso et al., 2006; Yokota et al., 2007; Barroso-Chinea et al., 2008). The present study indicates that, similarly to riboprobes, oligonucleotides can be reliably combined with tracer immunohistochemistry to identify proteins expressed in relatively low levels, such as monoamine receptors, in projection neurons.

CTB-immunoreactive cells were clearly detected in tissue sections previously treated for *in situ* hybridization. In the PFC, these cells were exclusively located in the medial and orbital divisions. This distribution agrees well with that reported previously using electrophysiological and tract-tracing methods for DR- and VTA-projecting neurons (Aghajanian and Wang, 1977; Thierry et al., 1979; Thierry et al., 1983; Sesack et al., 1989; Peyron et al., 1998; Jankowski and Sesack, 2004; Gabbott et al., 2005; Geisler and Zahm, 2005). One possible limitation of the use of CTB is the uptake by damaged fibers of passage close to the application site. This might be a potential confounding factor, particularly for the identification of VTA-projecting neurons, given the proximity of the VTA to the medial forebrain bundle. CTB has been reported to be taken up by fibers of passage (Chen and Aston-Jones, 1995). However, this potential limitation can be minimized by the microiontophoretic application of the tracer, as used herein. This procedure resulted in a tracer distribution within the boundaries of the DR and VTA as observed by the coincidence of the tracer with the TPH and TH immunoreactivity used to label 5-HT and DA neurons, respectively. Non-specific uptake by damaged fibers of the medial forebrain bundle during CTB application in the VTA would have resulted in labeling of pyramidal neurons in other PFC areas, particularly in the primary and secondary motor areas, that contain the largest proportion of corticospinal fibers of all PFC subdivisions (Gabbott et al., 2005). Such labeling was not observed in any of the rats, which further supports the specificity of the labeling procedure. Only in one rat (D1), CTB labeled a neighboring area in addition to the DR itself, yet the percentage of double labeled cells in the PFC was similar to the rest.

The number of CTB-immunoreactive neurons in the mPFC was lower when the CTB immunohistochemistry was conducted in sections previously subjected to *in situ* hybridization (data not shown). This difference may be attributed to the previous tissue exposure to the hybridizing conditions and/or the high salt concentration used in the immunohistochemical procedure. However, this limitation is unlikely to affect the conclusions of the present study, since we calculated the proportion of 5-HT_{2A} receptor mRNA-positive neurons by reference to the total number of CTB-positive neurons visualized and not viceversa.

Functional Implications

A large body of data in the literature indicates that the activation of 5-HT_{2A} receptors by 5-HT results in neuronal depolarization, reduction of the afterhyperpolarization and increase of excitatory postsynaptic currents and of the discharge rate in pyramidal neurons of the PFC (Araneda and Andrade, 1991; Tanaka and North, 1993; Aghajanian and Marek, 1997; Aghajanian and Marek, 1999; Amargós-Bosch et al., 2004; Puig et al., 2005; Villalobos et al., 2005). 5-HT can also activate 5-HT_{2A} receptors in GABA interneurons to increase a synaptic GABA input onto pyramidal neurons (Tanaka and North, 1993; Zhou and Hablitz, 1999). Hallucinogens such as DOI, DOB or LSD also modify membrane properties of pyramidal neurons and evoke marked cellular and network changes in PFC *in vivo* and *in vitro* through the activation of 5-HT_{2A} receptors (Aghajanian and Marek, 1997; Aghajanian and Marek, 1999; Puig et al., 2003; Villalobos et al., 2005; Gonzalez-Maeso et al., 2007; Lambe and Aghajanian, 2007; Celada et al., 2008).

The present histological data, together with these functional observations suggest that activation of 5-HT_{2A} receptors in mPFC pyramidal neurons may increase excitatory inputs onto DA and 5-HT neurons in the VTA and DR, respectively, as well as on GABAergic neurons in both nuclei. This is consistent with the existence of monosynaptic pathways from the PFC to monoaminergic and GABAergic neurons of the VTA and the DR (Aghajanian and Wang, 1977; Thierry et al., 1979; Thierry et al., 1983; Sesack et al., 1989; Tong et al., 1996; Tong et al., 1998; Hajós et al., 1998; Peyron et al., 1998; Celada et al., 2001; Jankowski and Sesack, 2004; Gabbott et al., 2005; Geisler and Zahm, 2005). It is also consistent with the presence of a high density of layer V pyramidal neurons expressing 5-HT_{2A} receptors (Santana et al., 2004) some of which project to DR and/or VTA, as shown herein. Hence, the systemic administration of 5-HT_{2A} receptor agonists/antagonists can distally modulate the activity of the ascending serotonergic and dopaminergic pathways originated in the DR and VTA, respectively, via PFC 5-HT_{2A} receptors. In support of this view is also the fact that local application of the preferential 5-HT_{2A} receptor agonist DOI in rat mPFC increased the firing rate of a subpopulation of DR 5-HT neurons, increased burst firing of DA neurons in the VTA and elevated the release of both monoamines in PFC (Martín-Ruiz et al., 2001; Bortolozzi et al., 2005). Notwithstanding the

existence of this direct pathway between the PFC and the VTA involving 5-HT_{2A} receptors, indirect pathways controlling the activity of VTA neurons cannot be excluded. Thus, the electrical stimulation of the mPFC evokes monosynaptic excitatory responses as well as GABA_A- and 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibitory responses in DR 5-HT neurons, indicating that most PFC-driven control of 5-HT neurons occurs via mono- and bisynaptic inputs (Hajós et al., 1998; Celada et al., 2001; Jankowski and Sesack, 2004)). However, this is not the case for DA neurons in the VTA, which in addition to short, monosynaptic excitations consistent with direct inputs from mPFC (Thierry et al., 1979) show complex biphasic responses to mPFC stimulation (Tong et al., 1996). Among these various inputs, a) the PFC → laterodorsal/pedunculopontine tegmental nuclei → VTA, and b) the PFC → nucleus accumbens → ventral pallidum → VTA pathways, may also be accountable for an indirect 5-HT_{2A} receptor-mediated control of DA neurons. Both pathways have been shown to modulate DA neuron activity via phasic and tonic inputs, respectively (Floresco et al., 2003).

The present results may have functional implications in terms of the interaction between both neurotransmitter systems (e.g., indirect, PFC-mediated vs. direct DR-VTA interactions mediated by 5-HT_{2A} receptors in the VTA; Nocjar et al., 2002). They may also be relevant for the mechanism of action of atypical antipsychotic drugs. Most agents of this therapeutic group show greater affinity for 5-HT_{2A} receptors than for dopamine D2 receptors and produce a greater occupancy of cortical 5-HT₂ than of subcortical D2 receptors at therapeutic doses (Nyberg et al., 1998; Meltzer, 1999). Clozapine, the prototypical representative of this group, does not reach –even at very high doses- the 70% of D2 receptor occupancy considered for classical antipsychotics to be the threshold for therapeutic efficacy (Nordstrom et al., 1998; Nyberg et al., 1999; Kapur et al., 1999). It is thus unclear how 5-HT_{2A} receptor blockade may contribute to the therapeutic action of atypical antipsychotics. Taken together, the present and previous data suggest that the blockade of 5-HT_{2A} receptors in PFC may attenuate excitatory inputs from PFC to selected neuronal groups in the VTA, thus modulating dopaminergic activity. According to the known connectivity between mPFC and DA and GABA neurons in the VTA (Carr and Sesack, 2000), this should primarily affect dopaminergic neurons projecting back to the mPFC and to limbic areas other than the nucleus accumbens as well as GABA

neurons projecting to the latter nucleus. However, the fact that the 5-HT_{2A} receptor agonist DOI potentiates the amphetamine-induced release of DA in the *nucleus accumbens* (Kuroki et al., 2003) suggests a more general effect. The recent demonstration of marked differential functional properties of mesocortical vs. mesolimbic DA VTA neurons (Lammel et al., 2008) and the fact that VTA GABA neurons may indirectly affect DA neuronal activity makes difficult to predict the extent of the 5-HT_{2A} receptor-mediated excitatory inputs on mesolimbic DA neurons in the VTA. Indeed, previous evidence from this laboratory indicated a widespread effect of the local (in mPFC) and systemic application of DOI in a proportion of VTA DA neurons that exceeded by and large the low abundance of mesocortical neurons (Bortolozzi et al., 2005).

In summary, the combined application of *in situ* hybridization and retrograde tract tracing enabled to show the presence of 5-HT_{2A} receptor mRNA in pyramidal neurons of the medial and orbital divisions of the rat PFC that project to monoaminergic cell groups of the midbrain. This provides anatomical support for previous observations indicating a 5-HT_{2A} receptor-mediated control of DA and 5-HT neurons and raises the possibility that atypical antipsychotic drugs may partly act by reducing excitatory PFC inputs onto subcortical structures, including the midbrain monoaminergic nuclei.

Acknowledgements

Work supported by grants SAF 2004-05525 and 2007-62378. Financial support from SENY Fundació is also acknowledged. PVB is recipient of a FPU pre-doctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education. We thank Rocío Martín for skillful technical assistance with *in situ* hybridization experiments. We also thank the personnel from “Serveis Científicotècnics” (SCT) of the Universitat de Barcelona (UB) for their technical assistance in confocal microscopy.

References

- Aghajanian GK, Marek GJ (1997) Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. *Neuropharmacology* 36: 589-599.
- Aghajanian GK, Marek GJ (1999) Serotonin, via 5-HT_{2A} receptors, increases EPSCs in layer v pyramidal cells of prefrontal cortex by an asynchronous mode of glutamate release. *Brain Res* 825: 161-171.
- Aghajanian GK, Wang RY (1977) Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique. *Brain Res* 122: 229-242.
- Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G, Artigas F (2004) Co-expression and in vivo interaction of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14: 281-299.
- Andreasen NC, O'Leary DS, Flaum M, Nopoulos P, Watkins GL, Boles Ponto LL, Hichwa RD (1997) Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naive patients. *Lancet* 349: 1730-1734.
- Araneda R, Andrade R (1991) 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 40: 399-412.
- Arnt J, Skarsfeldt T (1998) Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. *Neuropsychopharmacology* 18: 63-101.
- Barroso-Chinea P, Castle M, Aymerich MS, Lanciego JL (2008) Expression of vesicular glutamate transporters 1 and 2 in the cells of origin of the rat thalamostriatal pathway. *J Chem Neuroanat* 35: 101-107.
- Benes FM, Berretta S (2001) GABAergic interneurons: Implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 25: 1-27.

Bortolozzi A, Díaz-Mataix L, Scorza MC, Celada P, Artigas F (2005) Activation of 5-HT_{2A} receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. *J Neurochem* 95:1597-1607

Bymaster FP, Hemrick-Luecke SK, Perry KW, Fuller RW (1996) Neurochemical evidence for antagonism by olanzapine of dopamine, serotonin, alpha 1-adrenergic and muscarinic receptors in vivo in rats. *Psychopharmacology* 124: 87-94.

Carlsson A (1988) The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1: 179-186.

Carr DB, Sesack SR (2000) Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J Neurosci* 20: 3864-3873.

Catafau AM, Parellada E, Lomena FJ, Bernardo M, Pavia J, Ros D, Setoain J, Gonzalez-Monclús E (1994) Prefrontal and Temporal blood-flow in schizophrenia - resting and activation technetium-99M-Hmpao spect patterns in young neuroleptic-naive patients with acute disease. *J Nucl Med* 35: 935-941.

Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F (2001) Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* 21: 9917-9929.

Celada P, Puig MV, Díaz-Mataix L, Artigas F (2008) The hallucinogen DOI reduces low frequency oscillations in rat prefrontal cortex. Reversal by antipsychotic drugs. *Biol Psychiatry* (epub ahead of print) PMID: 18436196

Chen S, Aston-Jones G (1995) Evidence that Cholera-Toxin-B subunit (Ctb) can be avidly taken up and transported by fibers of passage. *Brain Res* 674: 107-111.

Chou YH, Halldin C, Farde L (2003) Occupancy of 5-HT_{1A} receptors by clozapine in the primate brain: a PET study. *Psychopharmacology (Berl)* 166: 234-240.

Dierks T, Linden DE, Jandl M, Formisano E, Goebel R, Lanfermann H, Singer W (1999) Activation of Heschl's gyrus during auditory hallucinations. *Neuron* 22: 615-621.

Elvevag B, Goldberg TE (2000) Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Crit Rev Neurobiol* 14: 1-21.

Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, Grace AA (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* 6: 968-973.

Gabbott PLA, Warner TA, Jays PRL, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492: 145-177.

Geisler S, Zahm DS (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J Comp Neurol* 490: 270-294.

Gobert A, Millan MJ (1999) Serotonin (5-HT)_{2A} receptor activation enhances dialysate levels of dopamine and noradrenaline, but not 5-HT, in the frontal cortex of freely-moving rats. *Neuropharmacology* 38: 315-317.

Gonzalez-Maeso J, Weisstaub NV, Zhou M, Chan P, Ivic L, Ang R, Lira A, Bradley-Moore M, Ge Y, Zhou Q, Sealfon SC, Gingrich JA (2007) Hallucinogens recruit specific cortical 5-HT_{2A} receptor-mediated signaling pathways to affect behavior. *Neuron* 53: 439-452.

Hajós M, Richards CD, Szekely AD, Sharp T (1998) An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neuroscience* 87: 95-108.

Harrison PJ (1999) The neuropathology of schizophrenia - A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122: 593-624.

Hur EE, Zaborszky L (2005) Vglut2 afferents to the medial prefrontal and primary somatosensory cortices: a combined retrograde tracing in situ hybridization study [corrected]. *J Comp Neurol* 483: 351-373.

Ichikawa J, Dai J, Meltzer HY (2001) DOI, a 5-HT_{2A/2C} receptor agonist, attenuates clozapine-induced cortical dopamine release. *Brain Res* 907: 151-155.

Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72: 165-229.

Jankowski MP, Sesack SR (2004) Prefrontal cortical projections to the rat dorsal raphe nucleus: ultrastructural features and associations with serotonin and gamma-aminobutyric acid neurons. *J Comp Neurol* 468: 518-529.

Kapur S, Zipursky RB, Remington G (1999) Clinical and theoretical implications of 5-HT₂ and D₂ receptor occupancy of clozapine, risperidone, and olanzapine in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 156: 286-293.

Kuroki T, Meltzer HY, Ichikawa J (2003) 5-HT_{2A} receptor stimulation by DOI, a 5-HT_{2A/2C} receptor agonist, potentiates amphetamine-induced dopamine release in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Brain Res* 972: 216-221.

Lambe EK, Aghajanian GK (2007) Prefrontal cortical network activity: Opposite effects of psychedelic hallucinogens and D₁/D₅ dopamine receptor activation. *Neuroscience* 145: 900-910.

Lammel S, Hetzel A, Hackel O, Jones I, Liss B, Roeper J (2008) Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 57: 760-773.

Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, D'Souza CD, Erdos J, McCance E, Rosenblatt W, Fingado C, Zoghbi SS, Baldwin RM, Seibyl JP, Krystal JH, Charney DS, Innis RB (1996) Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9235-9240.

Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW (2005) Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6: 312-324.

Lewis DA, Lieberman JA (2000) Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28: 325-334.

Martín-Ruiz R, Puig MV, Celada P, Shapiro DA, Roth BL, Mengod G, Artigas F (2001) Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. *J Neurosci* 21: 9856-9866.

Meltzer HY (1999) The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* 21: S106-S115.

Minabe Y, Hashimoto K, Watanabe KI, Ashby CR, Jr. (2001) Acute and repeated administration of the selective 5-HT_{2A} receptor antagonist M100907 significantly alters the activity of midbrain dopamine neurons: an in vivo electrophysiological study. *Synapse* 40: 102-112.

Nocjar C, Roth BL, Pehek EA (2002) Localization of 5-HT_{2A} receptors on dopamine cells in subnuclei of the midbrain A10 cell group. *Neuroscience* 111: 163-176.

Nordstrom AL, Nyberg S, Olsson H, Farde L (1998) Positron emission tomography finding of a high striatal D2 receptor occupancy in olanzapine-treated patients. *Arch Gen Psychiatry* 55: 283-284.

Nyberg S, Eriksson B, Oxenstierna G, Halldin C, Farde L (1999) Suggested minimal effective dose of risperidone based on PET-measured D2 and 5-HT_{2A} receptor occupancy in schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 156: 869-875.

Nyberg S, Nilsson U, Okubo Y, Halldin C, Farde L (1998) Implications of brain imaging for the management of schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol* 13 Suppl 3: S15-S20.

Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney: Academic Press.

Pazos A, Cortés R, Palacios JM (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res* 346: 231-249.

Pehek EA, McFarlane HG, Maguschak K, Price B, Pluto CP (2001) M100,907, a selective 5-HT_{2A} antagonist, attenuates dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. *Brain Res* 888: 51-59.

Perez-Manso M, Barroso-Chinea P, Aymerich MS, Lanciego JL (2006) 'Functional' neuroanatomical tract tracing: analysis of changes in gene expression of brain circuits of interest. *Brain Res* 1072: 91-98.

Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH (1998) Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience* 82: 443-468.

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G (1992) Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 12: 440-453.

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G (1994) Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Mol Brain Res* 23: 163-178.

Porras G, Di M, V, Fracasso C, Lucas G, De Deurwaerdere P, Caccia S, Esposito E, Spampinato U (2002) 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C/2B} receptor subtypes modulate dopamine release induced in vivo by amphetamine and morphine in both the rat nucleus accumbens and striatum. *Neuropsychopharmacology* 26: 311-324.

Potkin SG, Alva G, Fleming K, Anand R, Keator D, Carreon D, Doo M, Jin Y, Wu JC, Fallon JH (2002) A PET study of the pathophysiology of negative symptoms in schizophrenia. Positron emission tomography. *Am J Psychiatry* 159: 227-237.

Pritchett DB, Bach AW, Wozny M, Taleb O, Dal Toso R, Shih JC, Seeburg PH (1988) Structure and functional expression of cloned rat serotonin 5HT-2 receptor. *EMBO J*. 20; 7: 4135-4140.

Puig MV, Artigas F, Celada P (2005) Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA. *Cereb Cortex* 15: 1-14.

Puig MV, Celada P, Diaz-Mataix L, Artigas F (2003) In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT_{2A} receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cereb Cortex* 13: 870-882.

Robbins TW (2000) Chemical neuromodulation of frontal-executive functions in humans and other animals. *Exp Brain Res* 133: 130-138.

Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F (2004) Expression of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14: 1100-1109.

Schultz W (2004) Neural coding of basic reward terms of animal learning theory, game theory, microeconomics and behavioural ecology. *Curr Opin Neurobiol* 14: 139-147.

Selemon LD, Goldman-Rakic PS (1999) The reduced neuropil hypothesis: A circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 45: 17-25.

Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (1989) Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 290: 213-242.

Shergill SS, Brammer MJ, Williams SC, Murray RM, McGuire PK (2000) Mapping auditory hallucinations in schizophrenia using functional magnetic resonance imaging. *Arch Gen Psychiatry* 57: 1033-1038.

Swanson LW (1999) *Structure of the Rat Brain*. Elsevier, Amsterdam.

Tanaka E, North RA (1993) Actions of 5 hydroxytryptamine on neurons of the rat cingulate cortex. *J Neurophysiol* 69: 1749-1757.

Thierry AM, Deniau JM, Chevalier G, Ferron A, Glowinski J (1983) An electrophysiological analysis of some afferent and efferent pathways of the rat prefrontal cortex. *Prog Brain Res* 58: 257-61.

Thierry AM, Deniau JM, Feger J (1979) Effects of stimulation of the frontal-cortex on identified output VMT cells in the rat. *Neurosci Lett* 15: 103-107.

Tomiyama M, Palacios JM, Cortes R, Vilaro MT, Mengod G (1997) Distribution of AMPA receptor subunit mRNAs in the human basal ganglia: an in situ hybridization study. *Mol Brain Res* 46: 281-289.

Tong ZY, Overton PG, Clark D (1996) Stimulation of the prefrontal cortex in the rat induces patterns of activity in midbrain dopaminergic neurons which resemble natural burst events. *Synapse* 22: 195-208.

Tong ZY, Overton PG, Martinez-Cue C, Clark D (1998) Do non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area play a role in the responses elicited in A10 dopaminergic neurons by electrical stimulation of the prefrontal cortex? *Exp Brain Res* 118: 466-476.

Tzschentke TM, Schmidt WJ (2000) Functional relationship among medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in locomotion and reward. *Crit Rev Neurobiol* 14: 131-142.

Vazquez-Borsetti, P. E., Celada, P., Cortés, R., and Artigas, F (2006) Evidence of a simultaneous control of serotonergic and dopaminergic neurons by the medial prefrontal cortex. *Eur Neuropsychopharmacol.* 16: S49.

Villalobos C, Béique JC, Gingrich JA, Andrade R (2005). Serotonergic regulation of calcium-activated potassium currents in rodent prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 22: 1120-1126.

Weinberger DR, Aloia MS, Goldberg TE, Berman KF (1994) The frontal lobes and schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 6: 419-427.

Weinberger DR, Egan MF, Bertolino A, Callicott JH, Mattay VS, Lipska BK, Berman KF, Goldberg TE (2001) Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 50: 825-844.

Williams GV, Goldman-Rakic PS (1995) Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* 376: 572-575.

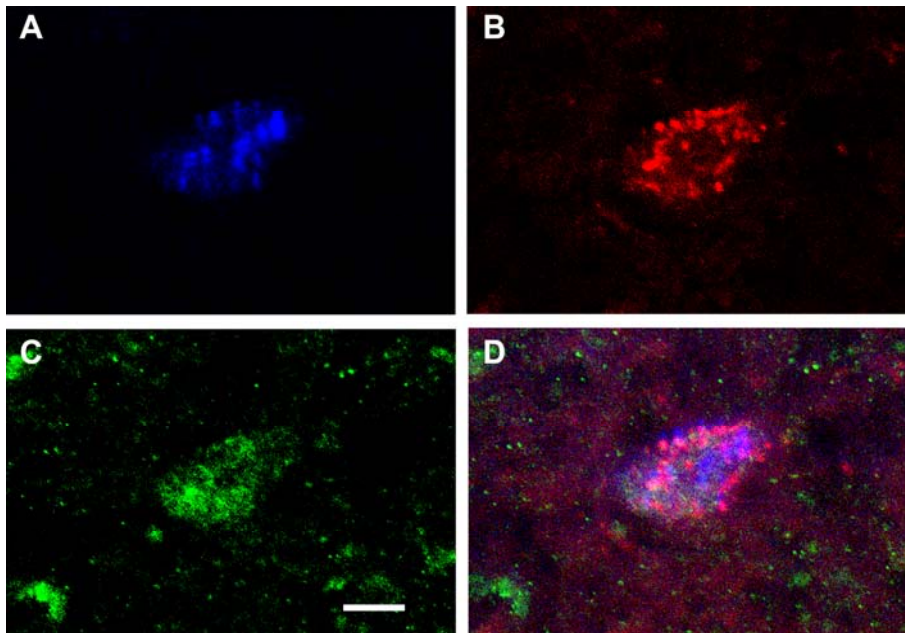
Yokota S, Oka T, Tsumori T, Nakamura S, Yasui Y (2007) Glutamatergic neurons in the Kolliker-Fuse nucleus project to the rostral ventral respiratory group and phrenic

nucleus: a combined retrograde tracing and in situ hybridization study in the rat. *Neurosci Res* 59: 341-346.

Zhou FM, Hablitz JJ (1999) Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. *J Neurophysiol* 82: 2989-2999.

Supplementary results

As a pilot study, we investigated the presence of 5-HT_{2A} receptor-immunoreactivity in neurons of the PFC of a rat that received FG in the VTA and CTB in the DR. Sections were processed for immunohistochemistry to label CTB and the 5-HT_{2A} receptor protein using secondary fluorescent antibodies. Examination at the confocal microscope revealed the presence 5-HT_{2A} receptor-immunoreactivity in cell bodies displaying also CTB-immunoreactivity and FG fluorescence, as illustrated in the [Supplementary figure](#), which shows high magnification confocal images showing a PFC neuron from a rat that received CTB in the DR and FG in the VTA, after incubation with anti-5HT_{2A} receptor and anti-CTB-antibodies. The images are montages of 10 consecutive optical sections colorized and merged with the confocal software from a single neuronal cell body containing FG-fluorescence (A), CTB-immunoreactivity (B), and 5HT_{2A} receptor immunoreactivity (C). Pannel (D) illustrates the overlay of the three images revealing the presence of FG (blue), CTB (red) and 5-HT_{2A} receptor (green) signal. Bar=5 μ m.



Supplementary methods

Some of the rats injected with CTB in the DR received in the same surgical session a subsequent iontophoretic injection of fluorogold (FG, Fluorochrome LLC, Englewood, CO, USA; 2% in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3) into the VTA. The correct placement of FG injections was confirmed in sections stained with anti-TH antibodies as described above. For the visualization of FG no further treatments were necessary and it was directly visualized by its own fluorescence at the fluorescence microscope.

Triple detection of 5-HT_{2A} receptor- and CTB-immunostaining and FG labeling

Prefrontal cortex sections from rats injected with CTB in the DR and FG in the VTA were incubated during 3-4 days in a humid chamber at 4°C with a 5-HT_{2A} monoclonal antibody (1:100; Pharmingen™) alone or in combination with rabbit anti-CTB (1:1000; Sigma, St. Louis, MI, USA) in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 2% albumin and 0.3% Triton X-100. Then the sections were rinsed in PBS and incubated for 30 min at 37°C with Alexa Fluor 546-conjugated goat anti-rabbit (for CTB) and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse (for 5-HT_{2A}) antisera (1:500, Molecular Probes, Leiden, NL) in PBS. Finally, the sections were washed (3 times 5 min) in PBS and coverslipped using Mowiol (Merck, Darmstadt, Germany). The sections were observed in a spectral confocal microscope (Leica SP2; Leica, Wezlar, Germany) with the 100x objective and with 2x software increase. FG was directly visualized by its own fluorescence. For each marker, digital photographs were obtained from the superposition of 10 focal planes using the protocol “maximize intensity”. Neuronal labeling was considered positive only when the signal was present in the majority of planes.

Trabajo 3

Differential expression of AMPA receptor subunits in serotonergic and dopaminergic neurons of the dorsal raphe and ventral tegmental area of the rat.

Pablo Vázquez-Borsetti¹, Roser Cortés^{1,3}, Francesc Artigas^{1,2}

No se observó una distribución homogénea del receptor GluR1 en los núcleos aminérgicos. En el RD este receptor fue hallado en células GABAérgicas pero no células serotoninérgicas. Se evaluó también su posible presencia en células dopaminérgicas encontrándose un nivel de marcaje muy tenue muy inferior al observado para el mismo tipo celular en el ATV a pesar de haberse realizado los experimentos en simultaneo. Un punto importante a aclarar es que se encontraron células GluR1 positivas en el RD que no eran GABAérgicas. Al realizarse la inmunohistoquímica del receptor GluR2 se observó que este sí estaba presente en neuronas serotoninérgicas. También se evaluó la presencia presináptica de ambos receptores en fibras serotoninérgicas y del GluR1 en fibras dopaminérgicas. En la CPFm no se encontró la presencia de ninguna de estas subunidades a nivel presináptico en los axones estudiados.

En proceso de envío a la revista **European Neuropsychopharmacology**

Differential expression of AMPA receptor subunits in serotonergic and dopaminergic neurons of the dorsal raphe and ventral tegmental area of the rat

Pablo Vázquez-Borsetti¹, Roser Cortés^{1,3}, Francesc Artigas^{1,2}

*¹Department of Neurochemistry and Neuropharmacology,
Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), IDIBAPS*

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)

³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED)

08036 Barcelona, Spain

Corresponding author:

Francesc Artigas, PhD;

Dept. of Neurochemistry and Neuropharmacology,

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), IDIBAPS

Rosselló, 161, 6th floor, 08036 Barcelona, Spain.

Phone: +3493-363 8315;

Fax: +3493-363 8301;

e-mail: fapnqi@iibb.csic.es

Running title: *GluR subunits in monoaminergic nuclei*

Abstract

Midbrain monoaminergic systems are important in the pathophysiology and treatment of major depression and schizophrenia. The activity of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area (VTA) and of raphe serotonergic neurons is controlled by excitatory afferents from the prefrontal cortex, which evoke AMPA- and NMDA-mediated excitations of monoaminergic neurons. Using immunohistochemistry, we examined the presence of AMPA-selective GluR1 and GluR2/3 glutamate receptor subunits in monoaminergic and GABAergic neurons in these midbrain nuclei. Serotonergic and dopaminergic neurons were identified with tryptophan hydroxylase and tyrosine hydroxylase immunolabeling, respectively. GABAergic neurons were identified by glutamate acid decarboxylase (GAD67) immunolabeling. The results indicate that serotonergic neurons express GluR2/3 (but not GluR1) subunits whereas GABAergic and dopaminergic neurons express GluR1 subunits. Given the differential cationic gating of AMPA receptors containing GluR1 and GluR2/3 serotonergic and dopaminergic activity may be differentially regulated by descending excitatory inputs and by exogenous agents with potential therapeutic activity (e.g., AMPAkinases).

Key words: AMPA receptors, dopamine; dorsal raphe, serotonin, ventral tegmental area, prefrontal cortex, glutamate, .

1. Introduction

Serotonergic (5-HT) neurons of the dorsal and median raphe nuclei (DR and MnR) and dopaminergic (DA) neurons of the ventral tegmental area (VTA) play a fundamental role in many physiological functions by modulating the activity of a large number of cortical and subcortical structures to which these systems project to. Hence, the mesocortical and mesolimbic dopaminergic pathways are involved in motivation, attention, reward and cognition (Graybiel et al., 1994; Williams and Goldman-Rakic, 1995; Schultz, 1998; Koob and Le Moal, 2001a; Dalley et al., 2004; Grace et al., 2007c; Iversen and Iversen, 2007). Derangements of these DA pathways are suspected in severe psychiatric conditions such as schizophrenia, depression, attention deficit-hyperactivity disorder and in drug addiction (Grace, 1991; Willner et al., 1992; Everitt and Robbins, 2000; Koob and Le Moal, 2001b; Castellanos and Tannock, 2002). On the other hand, the ascending serotonergic pathways have been related to mood and impulsivity control, reward, learning and memory, as well as with sexual drive, temperature, sleep-wake cycle and food intake (Barnes and Sharp, 1999; Jacobs and Azmitia, 1992; Portas et al., 2000; Hull et al., 2004; Cools et al., 2008). Of particular interest is the presumed involvement of 5-HT in psychiatric conditions such as depression, anxiety or suicidal behaviour (Graeff et al., 1996; Blier and de Montigny, 1994; Mann, 2003). Indeed, drugs targeting one or other systems (or both) are the treatment of choice for severe psychiatric illnesses such as depression and schizophrenia (Hyttel, 1994; Bymaster et al., 1996; Artigas et al., 1996; Arnt and Skarsfeldt, 1998).

The activity of ascending 5-HT and DA neurons is controlled by afferents to the DR/MnR and the VTA, respectively (Jacobs and Azmitia, 1992; Meltzer et al., 1997; Tzschentke and Schmidt, 2000; Adell et al., 2002; Floresco et al., 2003; Adell and Artigas, 2004). Among the various afferent areas employing glutamate as a neurotransmitter, the medial prefrontal cortex (mPFC) plays a major role in the control of the activity of these neuronal groups (Aghajanian and Wang, 1977; Thierry et al., 1979; Tong et al., 1996b; Hajós and Sharp, 1998; Peyron et al., 1998; Carr and Sesack, 2000; Celada et al., 2001). Likewise, the lateral habenula projects to and controls the activity of DR and VTA neurons (Bunney and Aghajanian, 1976; Aghajanian and Wang, 1977; Peyron et al., 1998; Ji and Shepard, 2007). Moreover, glutamatergic excitatory afferents to the VTA also originate in the laterodorsal/pedunculopontine tegmentum

(LDT/PPTg) (Tzschentke and Schmidt, 2000; Omelchenko and Sesack, 2005) and the bed nucleus of stria terminalis (Georges and Aston-Jones, 2002).

Immunohistochemical and in situ hybridization studies have revealed the presence of AMPA/kainate receptors in DA and 5-HT neurons (Martin et al., 1993b; Sato et al., 1993; Wisden and Seeburg, 1993; Hall and Bahr, 1994; Sato et al., 1995; Paquet et al., 1997). These observations are consistent with the occurrence of excitatory responses in DA and 5-HT neurons evoked *in vitro* or *in vivo* through the activation of AMPA/kainate receptors (Suaud-Chagny et al., 1992; Pan and Williams, 1989; Wang and French, 1993; Meltzer et al., 1997; Celada et al., 2001; Gartside et al., 2007). However, the expression of the various glutamate receptor (GluR) subunits in monoaminergic and GABAergic cells of these nuclei is not precisely known. Using immunohistochemical procedures, here we report on a differential expression of GluR1 and GluR2/3 subunits in DA and 5-HT neurons in rat brain.

2. Experimental procedures

Animals

Male albino Wistar rats (Iffa Credo, Lyon, France) weighing 250-300 g were used in this study. Animals were kept in a controlled environment (12 h light/dark cycle and $22 \pm 2^\circ\text{C}$ room temperature) with food and water provided ad libitum. All experimental procedures used in this study were in strict compliance with the Spanish legislation and the European Communities Council directive 86/609/EEC on 'Protection of Animals Used in Experimental and Other Scientific Purposes' of 24 November 1986 (O.J. of E.C. L358, 18/12/1986). Animal work was carried out in the animal facilities of the School of Medicine of the University of Barcelona and all protocols used were approved by its Ethical Committee for Animal Research and by the "Departament de Medi Ambient i Habitatge" from the Catalan Government (Generalitat de Catalunya).

The animals were anesthetized with an i.p. overdose of sodium pentobarbital and perfused transcardially with 50 mL of calcium-free Tyrode's solution (6.8 g/L NaCl; 0.4 g/L KCl; 0.32 g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 0.10 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.17 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 2.2 g/L NaHCO_3 ; 1.1 g/L glucose) containing 0.1% heparin at 37°C , followed by 50 mL of warm (37°C) and 300 ml of cold (4°C) fixative (4%

paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.9). After perfusion, the skull was opened and the brain carefully removed and stored for 3 days in a cryoprotective solution (30% sucrose in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4). The brains were then frozen by slow immersion into dry-ice chilled isopentane and were stored at -20°C until use.

Coronal sections 30- μ m-thick were obtained with a microtome-cryostat (Microm HM500 OM, Walldorf, Germany), and stored in 0.1M phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% sodium azide. Double immunostaining experiments were performed following protocols based on (Rabbath et al., 2002; Luppi et al., 1995) with some modifications. Briefly, free-floating sections were pre-incubated in 1% normal swine serum in 0.01 M PBS for 1 h at room temperature. Then the sections were incubated with primary antibodies (see detailed information in table 1) for 3 to 4 days at 4°C in PBS containing 1% normal swine serum, 0.3% Triton X-100 and 0.1% sodium azide. The primary antibodies were used either alone or in the following combinations: anti-GluR1 with anti-TH, anti-TPH, anti-GAD67, and anti-SERT, and anti-GluR2/3 with anti-TPH and anti-SERT. Then the sections were rinsed in 0.1M PBS and incubated for 30 min at 37°C with appropriate combinations of the Alexa fluor-conjugated fluorescent antisera listed in Table 2 (1:500, Molecular Probes, Leiden, NL). Controls in the absence of primary antibodies were routinely run to ensure the absence of nonspecific single or dual immunostaining in the tissue sections.

Finally, the sections were washed in PBS, mounted, and coverslipped using Mowiol (Merck, Darmstadt, Germany). The sections were observed and digitalized in a confocal spectral microscope (Leica SP2; Leica, Wezlar, Germany). The images captured were the result of the average intensity superposition of 10 focal planes. Neuronal labeling was considered positive only when immunoreactivity was present in the majority of the planes. Resolution, brightness and contrast of the images were optimized using the Adobe Photoshop CS2 software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA).

Table 1. Primary antibodies.

Antigen	Host	Origin	Working dilution	References
TH	Mouse (Monoclonal)	Diasorin ref. 22941	1:3000	(Benavides-Piccione and DeFelipe, 2003)
TPH	Sheep	Chemicon Intl. ref. AB1541	1:300	(Benarroch et al., 2002)
GAD67	Mouse (Monoclonal)	Chemicon Intl. ref. MAB5406	1:250	(Fong et al., 2005)
GluR1	Rabbit	Chemicon Intl. ref. AB1504	1:200	(Kim et al., 2005)
GluR 2/3	Rabbit	Chemicon Intl. ref. AB1506	1:200	(Rabbath et al., 2002)

Table 2. Secondary antibodies.

Antigen	Host	Origin	fluorophore
Rabbit IgG	Goat	Molecular Probes,	Alexa Fluor 546 (red)
Rabbit IgG	Donkey	Molecular Probes	Alexa Fluor 488 (green)
Mouse IgG	Goat	Molecular Probes	Alexa Fluor 488 (green)
Mouse IgG	Donkey	Molecular Probes	Alexa Fluor 488 (green)
Sheep IgG	Donkey	Molecular Probes	Alexa Fluor 546 (red)
Sheep IgG	Donkey	Molecular Probes	Alexa Fluor 488 (green)

3. Results

GluR1-like immunoreactivity (LI) was found in cell bodies within the DR and surrounding structures, including the trochlear nucleus (Fig. 1A). In double-staining experiments we did not observe GluR1-LI in serotonergic cell bodies as stained for TPH (Fig. 1). In contrast, most –but not all– GluR1-immunoreactive (IR) neurons in the DR exhibited GAD67-LI (Fig. 2). All GAD67-positive neurons displayed GluR1-LI.

Anti-TH antibodies were used to stain dopaminergic neurons in the raphe nuclei and the VTA. Dopaminergic neurons in the DR were aligned in the midline of the nucleus, extending laterally beneath the aqueduct. Only weak GluR1-LI was detected in TH-positive neurons in the DR and median raphe (MR), whereas in sections incubated in parallel all TH-IR neurons found in the VTA were strongly immunoreactive for GluR1 (Fig. 3).

Analysis of AMPA subunits revealed the presence of GluR2/3-LI in all serotonergic neurons found in the DR, as identified by TPH-immunostaining (Fig. 4). GluR2/3-LI was also present in many TPH-negative cells, mainly in the MR.

In addition to immunoreactive cell bodies and processes, a punctate staining was observed with anti-GluR1 and anti-GluR2/3 antisera over the DR, the VTA and the PFC areas examined. These puncta were usually found in a single focal plane and occasionally in two planes, but never beyond that (distance between focal planes: 2 μm), and might correspond in part to specific staining of the corresponding receptor subunits, since in control sections (where the primary antibody was omitted) some puncta were also evident but in much lower densities (see Figs. 1-3).

The putative presence of GluR1- and GluR2/3-LI in serotonergic and dopaminergic fibers of the prefrontal cortex was examined using anti-SERT and anti-TH antibodies, respectively. Both GluR1- and GluR2/3-LI could be observed on cell bodies and dendrites, whereas labeling corresponding to SERT or TH was found in networks of varicose fibers. In double-stained sections, receptor subunits GluR1 and GluR2/3 could not be identified over processes stained for TH or SERT, respectively (Figures 5 and 6).

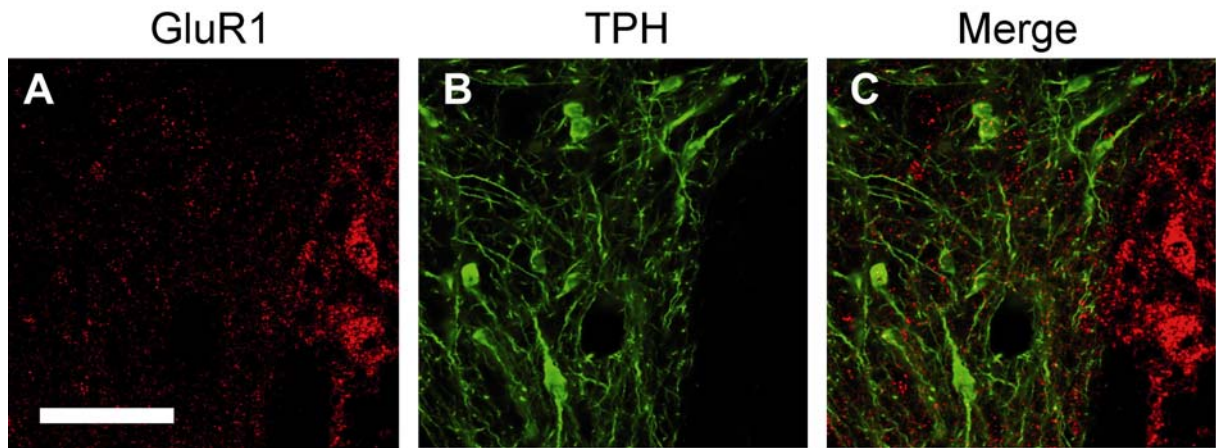


Figure 1. Confocal microscopy laser scanning showing double immunofluorescence for GluR1(A) and TPH (B) in the DR, the merge(C) show no double labeled neurons. Bar = 100 μ m.

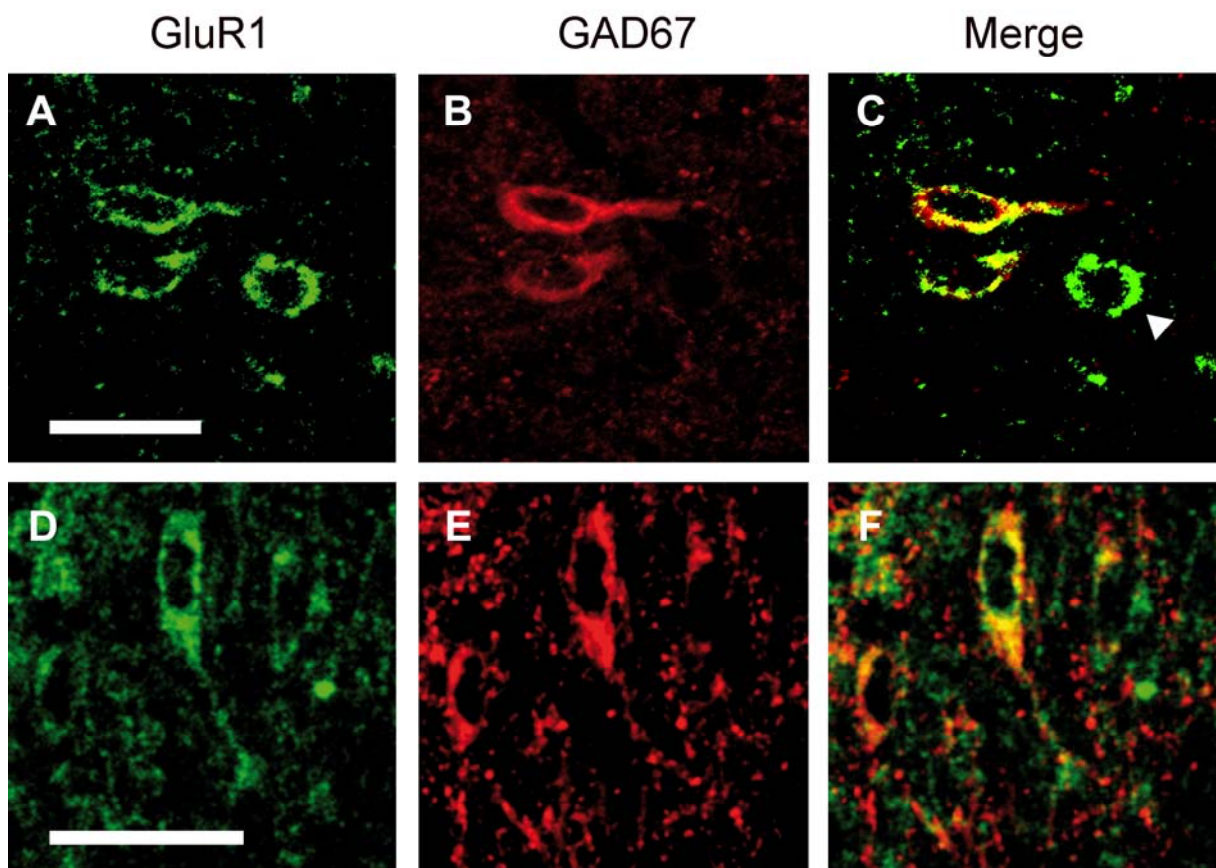


Figure 2. Confocal microscopy laser scanning showing double immunofluorescence for GluR1(A) and GAD67 (B) in the DR, the merge panel(C) show some double labeled neuron and one GluR1 positive that is not for GAD67, indicated with a white arrow. Bar = 30 μ m.

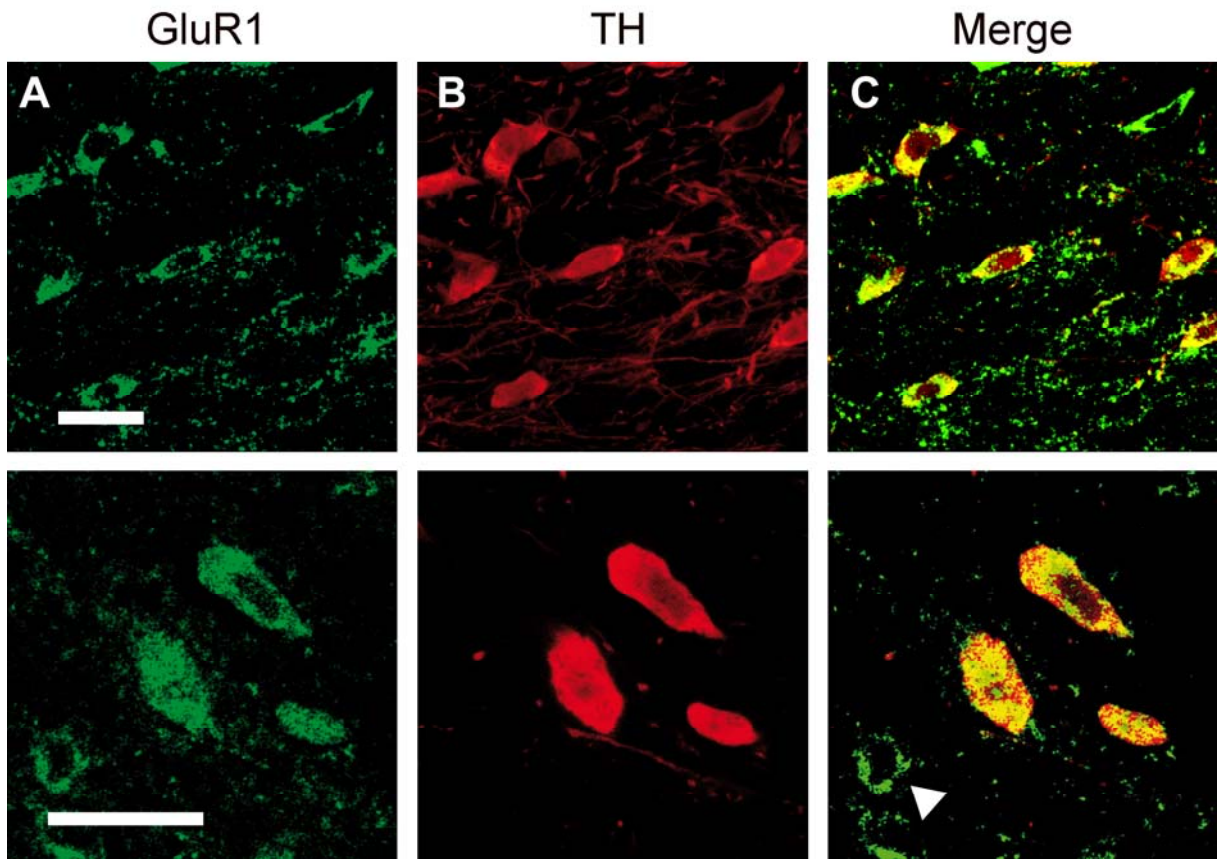


Figure 3. Confocal microscopy laser scanning showing double immunofluorescence for GluR1(A) and TH (B) in the VTA, the merge panel(C) show some double labeled neuron and one GluR1 positive that is not for TH, indicated with a white arrow. Bar = 50 μ m.

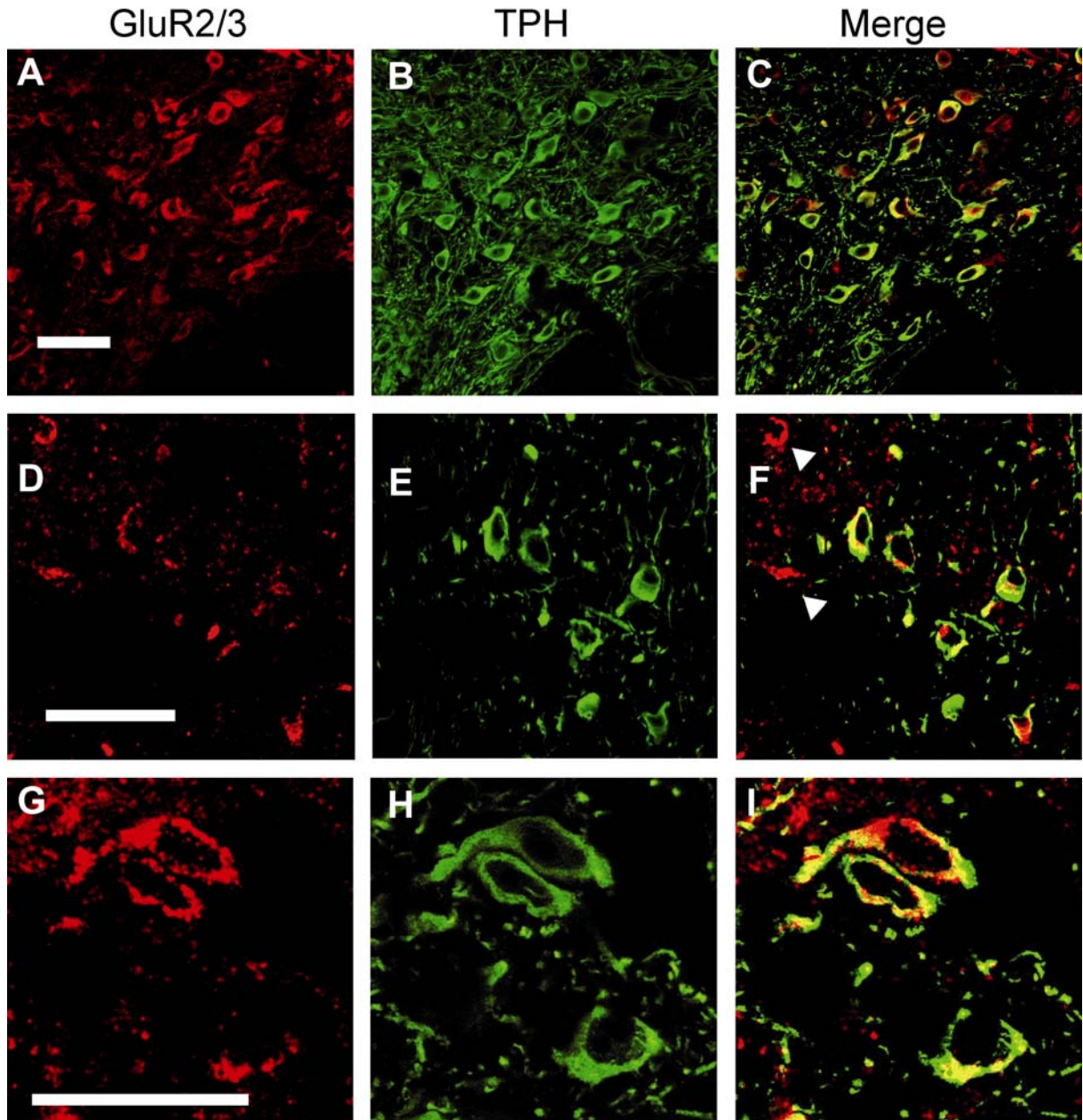


Figure 4. Confocal microscopy laser scanning showing double immunofluorescence for GluR2/3(A) and TPH (B) in the DR and in the MnR (second row), the merge panel(C) show a big amount of double labeled neurons and some GluR2/3 positive that is not for TPH, indicated with a white arrow. Bar = 50 μ m.

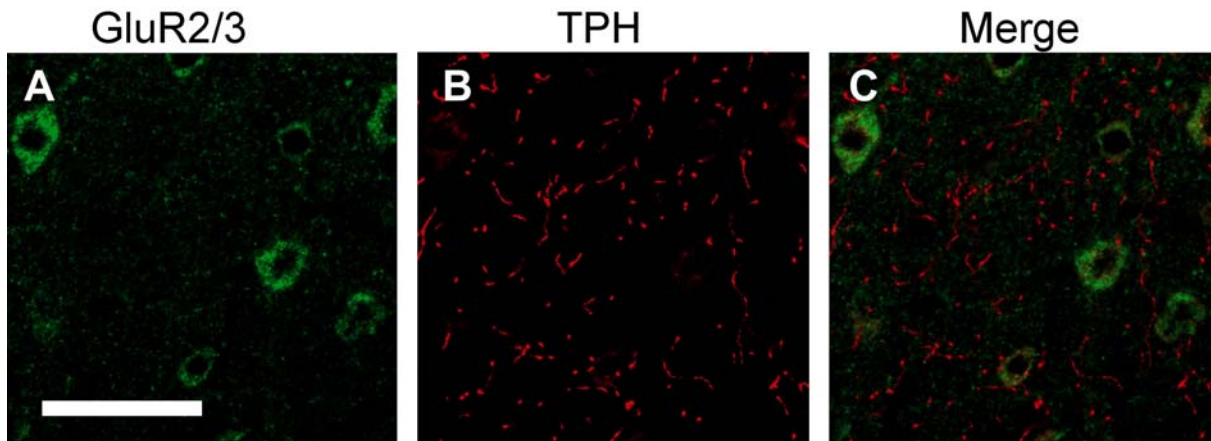


Figure 5. Confocal microscopy laser scanning showing double immunofluorescence for GluR2/3(A) and SERT (B) in the mPFC, the merge panel(C) show no double labeling in serotonergic fibers. Bar = 50 μ m

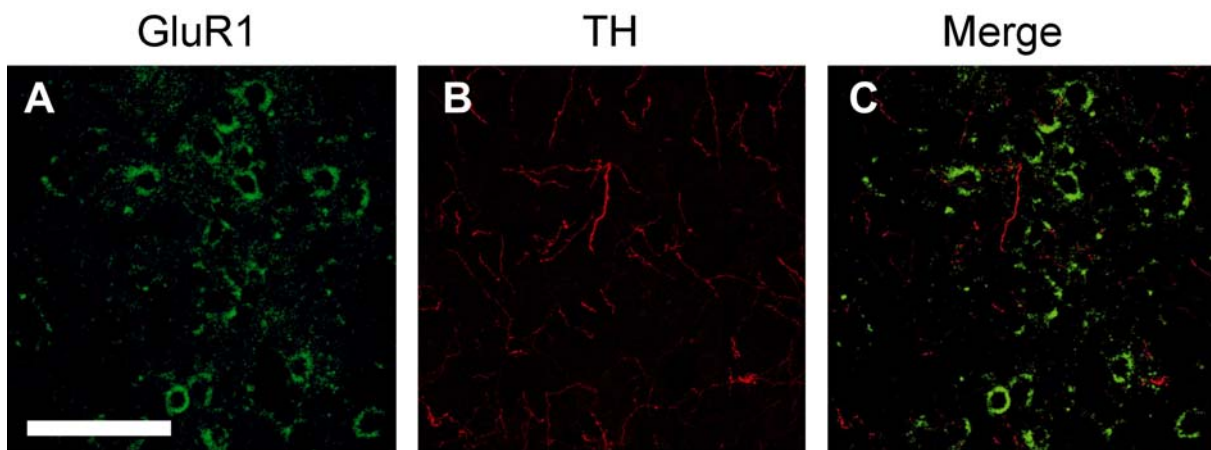


Figure 6. Confocal microscopy laser scanning showing double immunofluorescence for GluR1(A) and TH (B) in the mPFC, the merge panel(C) show no double labeling in dopaminergic fibers. Bar = 50 μ m Bar = 50 μ m

4. Discussion

Ionotropic glutamate receptors of the AMPA subtype mediate most excitatory neurotransmission in the CNS. They are composed of four subunits, GluR1–R4 that assemble into a tetrameric complex to form a functional ion channel that mainly permeates monovalent ions (for reviews see (Wisden and Seeburg, 1993; Hollmann and Heinemann, 1994; Dingledine et al., 1999; Mayer and Armstrong, 2004). Previous studies have examined the differential distribution of these receptor subunits in rat brain using immunohistochemistry and *in situ* hybridization (Rogers et al., 1991; Petralia and Wenthold, 1992; Sato et al., 1993; Wenthold et al., 1996; Martin et al., 1993a; Petralia et al., 1997). The functional properties of the receptor, in terms of their ionic permeability, are determined by the subunit composition. Hence, the presence of GluR2 subunits confers a low permeability to Ca^{2+} ions by native receptors and by those expressed in cellular systems (Jonas et al., 1994; Geiger et al., 1995; Pellegrini-Giampietro et al., 1991; Tanaka et al., 2000).

Here we report that raphe 5-HT neurons express GluR2/3 (but not GluR1) AMPA subunits and VTA DA neurons express GluR1 (but not GluR2/3) subunits. Also, consistent with previous observations on cortical GABAergic interneurons (Jonas et al., 1994); GABAergic neurons in the DR and its vicinity express the Ca^{2+} -permeable GluR1 subunit. The expression of different AMPA receptor subunits in serotonergic and dopaminergic neurons may be physiologically relevant in order to understand the fine regulation of the activity of these neuronal groups by excitatory inputs. Also, these differences may have therapeutic implications since the development of agents selective for GluR1 and GluR2/3 subunits may help to differentially enhance or suppress the activity of the ascending DA and 5-HT systems. In support of this contention, AMPA enhancers such as LY392098 may mediate antidepressant effects by acting preferentially at GluR2 subunits (Gates et al., 2001; Xia and Arai, 2005; Li et al., 2003).

Methodological aspects

Earlier studies have documented the differential expression of GluR1 and GluR2/3 AMPA receptor subunits in rat brain (Rogers et al., 1991; Petralia et al., 1997; Sato et

al., 1993; Wenthold et al., 1996; Martin et al., 1993a). Likewise, the presence of GluR1 subunits in the VTA has been previously documented by *in situ* hybridization and immunohistochemistry in rodent and monkey brain (Paquet et al., 1997; Brene et al., 1998; Chen et al., 2001). Although we did not perform a systematic quantitative study, the present results basically agree with data reported by Chen et al. (2001). However, these authors reported that a substantial population of TH-IR neurons in the *substantia nigra pars compacta* (area A9) and VTA-*raphe linearis* (area 10) did not express GluR1 subunits, whereas we found that most TH-IR profiles in the VTA were GluR1-positive. These discrepancies might be attributed to the fact that we considered separately the VTA and the *raphe linearis*. In addition, these authors quantified immunoreactive neurons under epifluorescence, whereas we used a spectral confocal microscope which provides a greater sensitivity and efficiency.

Functional implications

AMPA-mediated control of serotonergic and dopaminergic neurons

5-HT neuronal activity is modulated by a number of different inputs. These include, among others, excitatory α_1 -adrenoceptor and glutamate-mediated excitatory inputs and 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibitions (see for review Jacobs and Azmitia, 1992; Adell et al., 2002). While the α_1 -adrenoceptors are involved in the tonic maintenance of firing activity, phasic stimuli affect 5-HT neurons by increasing glutamatergic transmission (VanderMaelen and Aghajanian, 1983; Levine and Jacobs, 1992). Electrophysiological studies have revealed that 5-HT neurons are excited through AMPA and NMDA receptors *in vitro* and *in vivo* (Pan and Williams, 1989; Johnson, 1994a; Jolas and Aghajanian, 1997b; Celada et al., 2001; Liu et al., 2002; Gartside et al., 2007). Interestingly, there is a temporal domain for these different inputs. Hence, AMPA receptor-mediated excitatory currents are faster than NMDA receptor-mediated currents (Pan and Williams, 1989; Johnson, 1994b) and both occur before the slow 5-HT_{1A} receptor-mediated hyperpolarization (Johnson, 1994a) which probably occurs after local 5-HT release in response to glutamate-triggered excitations. Thus AMPA inputs are of primary importance in 5-HT neurons to evoke a depolarization that renders them sensitive to further entry of Ca²⁺ ions through NMDA receptors.

The medial prefrontal cortex (mPFC) and the lateral habenula are two main excitatory sources to the raphe nuclei as revealed by track-tracing and electrophysiological studies (Aghajanian and Wang, 1977; Hajós and Sharp, 1998; Peyron et al., 1998; Celada et al., 2001; Behzadi et al., 1990). In addition to exogenous excitatory sources, 5-HT neurons may be also experience self-excitatory AMPA- and NMDA-mediated currents through autaptic contacts. These have been reported in cultured 5-HT cells (Johnson, 1994a) yet it is unknown whether they also occur *in vivo*, a possibility supported by the presence of the vesicular glutamate transporter 3 (vGluT3) in 5-HT neurons and in synaptic contacts in forebrain and the DR itself (Gras et al., 2002; Schafer et al., 2002).

In particular, electrical stimulation of the mPFC at low frequency evokes both inhibitory and excitatory responses in DR 5-HT neurons (Hajós and Sharp, 1998; Celada et al., 2001). Monosynaptic (latency <20 ms, duration ~20 ms) excitatory responses evoked in DR 5-HT neurons are sensitive to AMPA and NMDA receptor blockade, indicating the involvement of both ionotropic glutamate receptors in the PFC-mediated excitations (Celada et al., 2001). Inhibitory responses of 5-HT triggered by mPFC stimulation are GABA_A- and 5-HT_{1A} receptor-mediated (Celada et al., 2001; Varga et al., 2001). The former are consistent with the presence of PFC inputs to GABA neurons in the DR (Jankowski and Sesack, 2004). Also, 5-HT_{1A}-receptor mediated inhibitions are consistent with the well-known role of 5-HT_{1A} autoreceptors in the control of 5-HT cell firing (Blier and de Montigny, 1987; Sprouse and Aghajanian, 1987). The present results indicate that most –if not all- of these excitatory inputs are mediated by AMPA receptors containing GluR2/3 subunits, i.e., those with low Ca²⁺ permeability (Jonas et al., 1994; Geiger et al., 1995).

In contrast, GABA neurons in the DR and its vicinity express the GluR1 subunit. This is consistent with the greater expression of this subunit in GABA interneurons in forebrain (compared to pyramidal neurons) (Jonas et al., 1994; Geiger et al., 1995). The presence of GluR1 subunits determines a greater Ca²⁺ permeability and faster kinetics of AMPA receptors in GABA interneurons (Jonas et al., 1994; Geiger et al., 1995). These properties may perhaps be involved in the predominant inhibitory responses elicited by excitatory afferent pathways to the DR, such as the lateral habenula or the mPFC which synapse on 5-HT cells but also on

GABA cells (Hajós and Sharp, 1998; Celada et al., 2001; Varga et al., 2001; Jankowski and Sesack, 2004).

The activity of the mesocortical and mesolímbic dopaminergic systems is also modulated by several neurotransmitters, including glutamate (see for review (Meltzer et al., 1997; Adell and Artigas, 2004; Grace et al., 2007b). Additionally, DA neurons express vGluT2 and may release glutamate under certain conditions (Descarries et al., 2007). In particular, the activity of DA neurons is controlled by AMPA and NMDA receptors (Johnson et al., 1992; Wang and French, 1993). Burst firing is characteristic of VTA DA neurons in response to behaviourally salient stimuli which imply greater DA release (see for review (Grace et al., 2007a; Schultz, 2007). Therefore, the switch from the regular or tonic firing mode to the burst firing mode (phasic, transient) is of utmost importance in the control of the ascending mesocortical and mesolímbic systems. Hence, the Ca^{2+} -dependent increase in burst firing of DA neurons (Grace and Bunney, 1984) appears to be mediated by the activation of NMDA receptors (Johnson et al., 1992; Overton and Clark, 1992; Chergui et al., 1993; Tong et al., 1996a). The PFC appears to be primarily involved in the switch from tonic to firing mode since the removal of excitatory inputs from PFC to the VTA reduces DA burst firing (Svensson and Tung, 1989; Tong et al., 1996b; Diaz-Mataix et al., 2005). More recent data suggest that a nicotinic input from the laterodorsal and pedunculo pontine tegmentum may play a permissive role in the appearance of burst firing (Lodge and Grace, 2006).

However, AMPA receptor activation may also evoke burst firing in DA neurons, perhaps due to the opening of voltage-sensitive Ca^{2+} channels following the neuronal depolarization induced by Na^+ entry, as observed in other brain areas (see for review Meltzer et al., 1997). This view is supported by the demonstration that L-type calcium channel also mediate burst firing in DA neurons (Johnson and Wu, 2004). Furthermore, the presence of GluR1 subunits in DA neurons may be an additional source of Ca^{2+} entry, absent in 5-HT neurons.

The apparent absence of GluR1- and GluR2/3-Li in DA and 5-HT axons suggests that glutamate does not regulate the local release of both monoamines in PFC. Previous microdialysis data indicated that the selective stimulation of AMPA receptors in PFC by exogenous S-AMPA application or increased endogenous glutamate can evoke a local release of 5-HT (Martin-Ruiz et al., 2001; Amargós-

Bosch et al., 2007) and DA (Bortolozzi et al., unpublished observations). This raised the possibility that the increased monoamine release might be triggered by the stimulation of terminal AMPA receptors, similar to those regulating glutamate and GABA release in various CNS areas (Satake et al., 2000; Patel et al., 2001; Schenk et al., 2003; Schenk et al., 2005). The present data do not support this view and indicate that, if presynaptic AMPA (or kainate) receptors are present on 5-HT and DA axons, these are not composed of the same units than those in the somatodendritic region. More likely, the above microdialysis results can be explained by the activation of AMPA receptors on descending pathways to the DR and VTA which subsequently result in an increased terminal release of both monoamines.

Differential AMPA receptor-mediated modulation of DA and 5-HT systems

Despite sharing some commonalities, the ascending DA and 5-HT neuronal differ in many respects. Thus, regular firing of DA neurons depends on intrinsic ionic mechanisms (Grace and Bunney, 1984) whereas that of 5-HT neurons depends on extrinsic influences, such as α_1 -adrenoceptor activation (VanderMaelen and Aghajanian, 1983). Moreover, unlike DA neurons, 5-HT neurons do not display overt burst firing, although they can occasionally fire two or more action potentials (Hajos et al., 1995).

Using electrophysiological and track-tracing techniques, we observed that ~50% of the pyramidal neurons in PFC projecting to the VTA also project to the DR (and viceversa) (Vazquez-Borsetti et al., 2007). This suggests that the PFC may simultaneously control the activity of DA and 5-HT neurons via descending excitatory monosynaptic (to principal neurons) and disynaptic pathways (via local GABA interneurons). The present observations add a further element to the characterization of this descending parallel pathway to VTA and DR. The differential expression of GluR1 and GluR2/3 subunits suggests that glutamate may evoke different ionic conductances in DA and 5-HT neurons which may partly explain the observed differences in the PFC-mediated control of both neuronal groups (see above).. Moreover, the presence of GluR1 subunits in GABAergic neurons in the DR and its vicinity as well as in DA neurons of the VTA (while not in raphe 5-HT neurons) suggests that an increased activity of pyramidal cells projecting simultaneously to both nuclei would increase the activity of DA cells in the VTA while concurrently

decreasing that of raphe 5-HT cells by increasing local GABA inputs, as shown for other receptors expressed by GABA neurons in this area (Jolas and Aghajanian, 1997a; Abellán et al., 2000; Liu et al., 2000).

From a therapeutic perspective, AMPA receptor modulators or ampakines are potentially useful compounds for the treatment of neurological and psychiatric disorders, including cognitive deficits in schizophrenia (Lynch and Gall, 2006; Tuominen et al., 2006; O'Neill and Witkin, 2007). These agents potentiate AMPA receptor-mediated neurotransmission by increasing the opening time of the MAP channel (Lynch and Gall, 2006). No major differences appear to exist in the modulating actions of these agents depending on subunit composition (Arai et al., 2000) although compounds that selectively target GluR2 subunits may have antidepressant properties (see above). Ampakines are thought to exert their action by modulating cortical and hippocampal networks. However, given the presence of GluR1 and GluR2/3 subunits in DA and 5-HT neurons, their effect may also involve an action on monoamine neuronal groups. Indeed, DA and 5-HT have been reported to be involved in cognitive processes known to be altered in psychiatric disorders such as working memory or cognitive flexibility (Williams and Goldman-Rakic, 1995; Williams et al., 2002; Clarke et al., 2004).

In summary, the different AMPA subunit expression in VTA DA neurons and raphe 5-HT neurons adds a further element to characterize excitatory inputs to these neurotransmitter systems that may be related to the differential basal and evoked firing characteristics of both neuronal groups. The development of pharmacological agents with selectivity for these GluR subunits may be a new tool to selectively modulate the activity of these monoaminergic cell groups.

Acknowledgements

Work supported by grants SAF 2004-05525 and 2007-62378. PVB is recipient of a FPU pre-doctoral fellowship from the Spanish Ministry of Education. We also thank the personnel from "Serveis Científicotècnics" (SCT) of the Universitat de Barcelona (UB) for their technical assistance in confocal microscopy.

Reference List

1. Abellán MT, Adell A, Honrubia MA, Mengod G, Artigas F (2000) GABAB-RI receptors in serotonergic neurons: effects of baclofen on 5-HT output in rat brain. *Neuropharm and neurotoxicol* 11: 941-945.
2. Adell A, Artigas F (2004) The somatodendritic release of dopamine in the ventral tegmental area and its regulation by afferent transmitter systems. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 415-431.
3. Adell A, Celada P, Abellan MT, Artigas F (2002) Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Brain Res Rev* 39: 154-180.
4. Aghajanian GK, Wang RY (1977) Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique. *Brain Res* 122: 229-242.
5. Amargos-Bosch M, Adell A, Artigas F (2007) Antipsychotic drugs reverse the AMPA receptor-stimulated release of 5-HT in the medial prefrontal cortex. *J Neurochem* 102: 550-561.
6. Arai AC, Kessler M, Rogers G, Lynch G (2000) Effects of the potent ampakine CX614 on hippocampal and recombinant AMPA receptors: interactions with cyclothiazide and GYKI 52466. *Mol Pharmacol* 58: 802-813.
7. Arnt J, Skarsfeldt T (1998) Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. *Neuropsychopharmacology* 18: 63-101.
8. Artigas F, Bel N, Casanovas JM, Romero L (1996) Adaptative changes of the serotonergic system after antidepressant treatments. *Adv Exp Med Biol* 398: 51-59.
9. Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38: 1083-1152.
10. Behzadi G, Kalén P, Parvopassu F, Wiklund L (1990) Afferents to the Median Raphe Nucleus of the rat: retrograde Cholera Toxin and wheat germ conjugated Horseradish Peroxidase tracing, and selective D-(3H)aspartate labelling of possible excitatory amino acid inputs. *Neuroscience* 37: 77-100.
11. Benarroch EE, Schmeichel AM, Parisi JE (2002) Depletion of mesopontine cholinergic and sparing of raphe neurons in multiple system atrophy. *Neurology* 59: 944-946.

12. Benavides-Piccione R, DeFelipe J (2003) Different populations of tyrosine-hydroxylase-immunoreactive neurons defined by differential expression of nitric oxide synthase in the human temporal cortex. *Cereb Cortex* 13: 297-307.
13. Blier P, de Montigny C (1987) Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT_{1A} agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain. *Synapse* 1: 470-480.
14. Blier P, de Montigny C (1994) Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci* 15: 220-226.
15. Brene S, Messer C, Nestler EJ (1998) Expression of messenger RNAs encoding ionotropic glutamate receptors in rat brain: regulation by haloperidol. *Neuroscience* 84: 813-823.
16. Bunney BS, Aghajanian GK (1976) The precise localization of nigral afferents in the rat as determined by a retrograde tracing technique. *Brain Res* 117: 423-435.
17. Bymaster FP, Hemrick-Luecke SK, Perry KW, Fuller RW (1996) Neurochemical evidence for antagonism by olanzapine of dopamine, serotonin, alpha 1-adrenergic and muscarinic receptors in vivo in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 124: 87-94.
18. Carr DB, Sesack SR (2000) Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J Neurosci* 20: 3864-3873.
19. Castellanos FX, Tannock R (2002) Neuroscience of attention-deficit/hyperactivity disorder: the search for endophenotypes. *Nat Rev Neurosci* 3: 617-628.
20. Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F (2001) Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* 21: 9917-9929.
21. Chen LW, Wei LC, Lang B, Ju G, Chan YS (2001) Differential expression of AMPA receptor subunits in dopamine neurons of the rat brain: a double immunocytochemical study. *Neuroscience* 106: 149-160.
22. Chergui K, Charley PJ, Akaoka H, Saunier CF, Brunet JL, Buda M, Svensson TH, Chouvet G (1993) Tonic activation of NMDA receptors causes spontaneous burst discharge of rat midbrain dopamine neurons in vivo. *Eur J Neurosci* 5: 137-144.
23. Clarke HF, Dalley JW, Crofts HS, Robbins TW, Roberts AC (2004) Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion. *Science* 304: 878-880.
24. Cools R, Roberts AC, Robbins TW (2008) Serotonergic regulation of emotional and behavioural control processes. *Trends Cogn Sci* 12: 31-40.

25. Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 771-784.
26. Descarries L, Berube-Carriere N, Riad M, Bo GD, Mendez JA, Trudeau LE (2007) Glutamate in dopamine neurons: Synaptic versus diffuse transmission. *Brain Res Rev*.
27. Diaz-Mataix L, Scorza MC, Bortolozzi A, Toth M, Celada P, Artigas F (2005) Involvement of 5-HT_{1A} receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action. *J Neurosci* 25: 10831-10843.
28. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51: 7-61.
29. Everitt BJ, Robbins TW (2000) Second-order schedules of drug reinforcement in rats and monkeys: measurement of reinforcing efficacy and drug-seeking behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* 153: 17-30.
30. Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, Grace AA (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* 6: 968-973.
31. Fong AY, Stornetta RL, Foley CM, Potts JT (2005) Immunohistochemical localization of GAD67-expressing neurons and processes in the rat brainstem: subregional distribution in the nucleus tractus solitarius. *J Comp Neurol* 493: 274-290.
32. Gartside SE, Cole AJ, Williams AP, McQuade R, Judge SJ (2007) AMPA and NMDA receptor regulation of firing activity in 5-HT neurons of the dorsal and median raphe nuclei. *Eur J Neurosci* 25: 3001-3008.
33. Gates M, Ogden A, Bleakman D (2001) Pharmacological effects of AMPA receptor potentiators LY392098 and LY404187 on rat neuronal AMPA receptors in vitro. *Neuropharmacology* 40: 984-991.
34. Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15: 193-204.
35. Georges F, Aston-Jones G (2002) Activation of ventral tegmental area cells by the bed nucleus of the stria terminalis: a novel excitatory amino acid input to midbrain dopamine neurons. *J Neurosci* 22: 5173-5187.
36. Grace AA (1991) Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 41: 1-24.

37. Grace AA, Bunney BS (1984) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* 4: 2877-2890.
38. Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ (2007a) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* 30: 220-227.
39. Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ (2007b) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* 30: 220-227.
40. Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ (2007c) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* 30: 220-227.
41. Graeff FG, Guimaraes FS, De Andrade TG, Deakin JF (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 54: 129-41.
42. Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M, Gasnier B, Giros B, El Mestikawy S (2002) A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 22: 5442-5451.
43. Graybiel AM, Aosaki T, Flaherty AW, Kimura M (1994) The basal ganglia and adaptive motor control. *Science* 265: 1826-1831.
44. Hajos M, Gartside SE, Villa AEP, Sharp T (1995) Evidence for a repetitive (burst) firing pattern in a sub-population of 5-hydroxytryptamine neurons in the dorsal and median raphe nuclei of the rat. *Neuroscience* 69: 189-197.
45. Hajós M, Sharp T (1998) Afferent regulation of dorsal raphe 5-HT neurones: possible role of cortical postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Soc Neurosci Abs* 24: 1108.
46. Hall RA, Bahr BA (1994) AMPA receptor development in rat telencephalon: [3H]AMPA binding and western blot studies. *J Neurochem* 63: 1658-1665.
47. Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17: 31-108.
48. Hull EM, Muschamp JW, Sato S (2004) Dopamine and serotonin: influences on male sexual behavior. *Physiol Behav* 83: 291-307.
49. Hyttel J (1994) Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Int Clin Psychopharmacol* 9: 19-26.
50. Iversen SD, Iversen LL (2007) Dopamine: 50 years in perspective. *Trends Neurosci* 30: 188-193.
51. Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72: 165-229.

52. Jankowski MP, Sesack SR (2004) Prefrontal cortical projections to the rat dorsal raphe nucleus: ultrastructural features and associations with serotonin and gamma-aminobutyric acid neurons. *J Comp Neurol* 468: 518-529.
53. Ji H, Shepard PD (2007) Lateral habenula stimulation inhibits rat midbrain dopamine neurons through a GABA(A) receptor-mediated mechanism. *J Neurosci* 27: 6923-6930.
54. Johnson MD (1994a) Electrophysiological and histochemical properties of postnatal rat serotonergic neurons in dissociated cell culture. *Neuroscience* 63: 775-787.
55. Johnson MD (1994b) Synaptic Glutamate Release by Postnatal Rat Serotonergic Neurons in Microculture. *Neuron* 12: 433-442.
56. Johnson SW, Seutin V, North RA (1992) Burst firing in dopamine neurons induced by N-methyl-D-aspartate: role of electrogenic sodium pump. *Science* 258: 665-667.
57. Johnson SW, Wu YN (2004) Multiple mechanisms underlie burst firing in rat midbrain dopamine neurons in vitro. *Brain Res* 1019: 293-296.
58. Jolas T, Aghajanian GK (1997a) Neurotensin and the serotonergic system. *Prog Neurobiol* 52: 455-468.
59. Jolas T, Aghajanian GK (1997b) Opioids suppress spontaneous and NMDA-induced inhibitory postsynaptic currents in the dorsal raphe nucleus of the rat in vitro. *Brain Res* 755: 229-245.
60. Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H (1994) Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron* 12: 1281-1289.
61. Kim I, Wilson RE, Wellman CL (2005) Aging and cholinergic deafferentation alter GluR1 expression in rat frontal cortex. *Neurobiol Aging* 26: 1073-1081.
62. Koob GF, Le Moal M (2001a) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24: 97-129.
63. Koob GF, Le Moal M (2001b) Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* 24: 97-129.
64. Levine ES, Jacobs BL (1992) Neurochemical afferents controlling the activity of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus: microiontophoretic studies in the awake cat. *J Neurosci* 12: 4037-4044.
65. Li X, Witkin JM, Need AB, Skolnick P (2003) Enhancement of antidepressant potency by a potentiator of AMPA receptors. *Cell Mol Neurobiol* 23: 419-430.

66. Liu R, Ding Y, Aghajanian GK (2002) Neurokinins activate local glutamatergic inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* 27: 329-340.
67. Liu R, Jolas T, Aghajanian G (2000) Serotonin 5-HT₂ receptors activate local GABA inhibitory inputs to serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus. *Brain Res* 873: 34-45.
68. Lodge DJ, Grace AA (2006) The laterodorsal tegmentum is essential for burst firing of ventral tegmental area dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 5167-5172.
69. Luppi PH, Aston-Jones G, Akaoka H, Chouvet G, Jouvet M (1995) Afferent projections to the rat locus coeruleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing with cholera-toxin B subunit and phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *Neuroscience* 65: 119-160.
70. Lynch G, Gall CM (2006) Ampakines and the threefold path to cognitive enhancement. *Trends Neurosci* 29: 554-562.
71. Mann JJ (2003) Neurobiology of suicidal behaviour. *Nat Rev Neurosci* 4: 819-828.
72. Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, Haganir RL, Price DL (1993a) AMPA glutamate receptor subunits are differentially distributed in rat brain. *Neuroscience* 53: 327-358.
73. Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, Haganir RL, Price DL (1993b) Ampa Glutamate Receptor Subunits Are Differentially Distributed in Rat-Brain. *Neuroscience* 53: 327-358.
74. Martin-Ruiz R, Ugedo L, Honrubia MA, Mengod G, Artigas F (2001) Control of serotonergic neurons in rat brain by dopaminergic receptors outside the dorsal raphe nucleus. *J Neurochem* 77: 762-775.
75. Mayer ML, Armstrong N (2004) Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol* 66: 161-181.
76. Meltzer LT, Christoffersen CL, Serpa KA (1997) Modulation of dopamine neuronal activity by glutamate receptor subtypes. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 511-518.
77. O'Neill MJ, Witkin JM (2007) AMPA receptor potentiators: application for depression and Parkinson's disease. *Curr Drug Targets* 8: 603-620.
78. Omelchenko N, Sesack SR (2005) Laterodorsal tegmental projections to identified cell populations in the rat ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 483: 217-235.

79. Overton P, Clark D (1992) Iontophoretically administered drugs acting at the N-methyl-D-aspartate receptor modulate burst firing in A9 dopamine neurons in the rat. *Synapse* 10: 131-140.
80. Pan ZZ, Williams JT (1989) GABA- and glutamate-mediated synaptic potentials in rat dorsal raphe neurons in vitro. *J Neurophysiol* 61: 719-726.
81. Paquet M, Tremblay M, Soghomonian JJ, Smith Y (1997) AMPA and NMDA glutamate receptor subunits in midbrain dopaminergic neurons in the squirrel monkey: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J Neurosci* 17: 1377-1396.
82. Patel DR, Young AM, Croucher MJ (2001) Presynaptic alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor-mediated stimulation of glutamate and GABA release in the rat striatum in vivo: a dual-label microdialysis study. *Neuroscience* 102: 101-111.
83. Pellegrini-Giampietro DE, Bennett MV, Zukin RS (1991) Differential expression of three glutamate receptor genes in developing rat brain: an in situ hybridization study. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4157-4161.
84. Petralia RS, Wang YX, Mayat E, Wenthold RJ (1997) Glutamate receptor subunit 2-selective antibody shows a differential distribution of calcium-impermeable AMPA receptors among populations of neurons. *J Comp Neurol* 385: 456-476.
85. Petralia RS, Wenthold RJ (1992) Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J Comp Neurol* 318: 329-354.
86. Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH (1998) Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience* 82: 443-468.
87. Portas CM, Bjorvant B, Ursin R (2000) Serotonin and the sleep/wake cycle: special emphasis on microdialysis studies. *Prog Neurobiol* 60: 13-35.
88. Rabbath G, Vassias I, Vidal PP, de Waele C (2002) GluR2-R4 AMPA subunit study in rat vestibular nuclei after unilateral labyrinthectomy: an in situ and immunohistochemical study. *Neuroscience* 111: 189-206.
89. Rogers SW, Hughes TE, Hollmann M, Gasic GP, Deneris ES, Heinemann S (1991) The characterization and localization of the glutamate receptor subunit GluR1 in the rat brain. *J Neurosci* 11: 2713-2724.
90. Satake S, Saitow F, Yamada J, Konishi S (2000) Synaptic activation of AMPA receptors inhibits GABA release from cerebellar interneurons. *Nat Neurosci* 2000 JUN;3(6):551-558 3: 551-558.
91. Sato K, Kiyama H, Park HT, Tohyama M (1993) AMPA, KA and NMDA receptors are expressed in the rat DRG neurones. *Neuroreport* 4: 1263-1265.

92. Sato K, Morimoto K, Yamada N, Kuroda S, Hayabara T (1995) NBQX, a selective antagonist of the AMPA receptor, affects neither field potentials nor long-term potentiation in vivo. *Brain Res* 683: 279-282.
93. Schafer MK, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD (2002) Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem* 277: 50734-50748.
94. Schenk U, Menna E, Kim T, Passafaro M, Chang S, De Camilli P, Matteoli M (2005) A novel pathway for presynaptic mitogen-activated kinase activation via AMPA receptors. *J Neurosci* 25: 1654-1663.
95. Schenk U, Verderio C, Benfenati F, Matteoli M (2003) Regulated delivery of AMPA receptor subunits to the presynaptic membrane. *EMBO J* 22: 558-568.
96. Schultz W (2007) Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci* 30: 259-288.
97. Schultz W (1998) Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80: 1-27.
98. Sprouse JS, Aghajanian GK (1987) Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse* 1: 3-9.
99. Suaud-Chagny MF, Brun P, Buda M, Gonon F (1992) Fast in vivo monitoring of electrically evoked dopamine release by differential pulse amperometry with untreated carbon fibre electrodes. *J Neurosci Methods* 45: 183-190.
100. Svensson TH, Tung CS (1989) Local cooling of pre-frontal cortex induces pacemaker-like firing of dopamine neurons in rat ventral tegmental area in vivo. *Acta Physiol Scand* 136: 135-136.
101. Tanaka H, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS (2000) The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage. *Brain Res* 886: 190-207.
102. Thierry AM, Deniau JM, Feger J (1979) Effects of Stimulation of the Frontal-Cortex on Identified Output Vmt Cells in the Rat. *Neurosci Lett* 15: 103-107.
103. Tong ZY, Overton PG, Clark D (1996a) Antagonism of NMDA receptors but not AMPA/kainate receptors blocks bursting in dopaminergic neurons induced by electrical stimulation of the prefrontal cortex. *J Neural Transm* 103: 889-904.
104. Tong ZY, Overton PG, Clark D (1996b) Stimulation of the prefrontal cortex in the rat induces patterns of activity in midbrain dopaminergic neurons which resemble natural burst events. *Synapse* 22: 195-208.
105. Tuominen HJ, Tiihonen J, Wahlbeck K (2006) Glutamatergic drugs for schizophrenia. *Cochrane Database Syst Rev* CD003730.

Trabajo 3

106. Tzschentke TM, Schmidt WJ (2000) Functional relationship among medial prefrontal cortex, nucleus accumbens, and ventral tegmental area in locomotion and reward. *Crit Rev Neurobiol* 14: 131-142.
107. VanderMaelen CP, Aghajanian GK (1983) Electrophysiological and pharmacological characterization of serotonergic dorsal raphe neurons recorded extracellularly and intracellularly in rat brain slices. *Brain Res* 289: 109-119.
108. Varga V, Szekely AD, Csillag A, Sharp T, Hajos M (2001) Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. *Neuroscience* 106: 783-792.
109. Vazquez-Borsetti, P. E., Celada, P., Cortés, R., and Artigas, F. Proyecciones simultáneas de neuronas piramidales de corteza prefrontal al área tegmental ventral y al rafe dorsal. XII Congreso de la Sociedad Española de Neurociencia . 5-9-2007. Ref Type: Abstract
110. Wang T, French ED (1993) Electrophysiological evidence for the existence of NMDA and non-NMDA receptors on rat ventral tegmental dopamine neurons. *Synapse* 13: 270-277.
111. Wenthold RJ, Petralia RS, Blahos J, II, Niedzielski AS (1996) Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons. *J Neurosci* 16: 1982-1989.
112. Williams GV, Goldman-Rakic PS (1995a) Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* 376: 572-575.
113. Williams GV, Rao SG, Goldman-Rakic PS (2002) The physiological role of 5-HT_{2A} receptors in working memory. *J Neurosci* 22: 2843-2854.
114. Willner P, Muscat R, Papp M (1992) Chronic mild stress-induced anhedonia: a realistic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev* 16: 525-534.
115. Wisden W, Seeburg PH (1993) A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci* 13: 3582-3598.
116. Xia YF, Arai AC (2005) AMPA receptor modulators have different impact on hippocampal pyramidal cells and interneurons. *Neuroscience* 135: 555-567.

DISCUSIÓN

1.1 Discusión general.

Los trabajos de la presente tesis se enmarcan en la búsqueda de una mayor comprensión de los circuitos mesocorticales que controlan núcleos monoaminérgicos del mesencéfalo.

La existencia de una subpoblación de neuronas que proyecte simultáneamente desde la CPF al ATV y al RD (trabajo 1), indica la presencia de una coordinación de ambas estructuras generada por la corteza. La importancia de esta coordinación queda evidenciada por el hecho de que estas neuronas son mayoría (60%) con respecto a las que proyectan a una sola de las estructuras, según se desprende de los resultados del análisis del potencial antidrómico. La confirmación mediante técnicas de histología mostró resultados similares a los obtenidos por electrofisiología. Así el 63% de las neuronas que proyectan al rafe dorsal también proyectan al ATV. Los resultados obtenidos para el ATV son algo menores (42%) probablemente debido a un mayor número de neuronas que proyectan a la estructura.

Los resultados del trabajo número 2 indican que la mayoría de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal, que proyectan a los anteriores núcleos monoaminérgicos, expresan el receptor 5HT_{2A}. Un corolario de estas observaciones es que la 5-HT liberada en la CPFm por neuronas procedentes del RD/RM estaría controlando indirectamente la propia actividad del RD y la del ATV. Por lo tanto, la activación de este receptor excitador podría aumentar la entrada glutamatérgica de la CPF a distintas estructuras subcorticales, incluyendo los núcleos monoaminérgicos del mesencéfalo. Por otro lado el antagonismo de este receptor inducido por los antipsicóticos atípicos disminuiría la entrada glutamatérgica a estos núcleos.

La estimulación eléctrica de la mPFC genera excitaciones e inhibiciones en el RD. Las excitaciones son de carácter glutamatérgico e implican receptores AMPA y NMDA (Celada et al., 2001). Los receptores AMPA, formados por distintas subunidades (GluR1 a GluR4) constituyen

canales permeables a iones monovalentes y divalentes. En particular, la presencia de la subunidad GluR2 confiere una baja permeabilidad a calcio (Tanaka et al., 2001). Por otra parte, la subunidad GluR1 parece ser esencial para diversos mecanismos de plasticidad sináptica, como la LTP o potenciación a largo plazo y su ausencia ocasiona importantes déficits cognitivos (Sanderson et al., 2008). Los resultados obtenidos en el trabajo 3 indican que las neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas del RD y ATV expresan, respectivamente, subunidades GluR2/3 y GluR1. Esta última está presente en el RD pero se encuentra en otros tipos celulares tales como neuronas GABAérgicas, dopaminérgicas y en otras células de fenotipo neuroquímico desconocido. Un punto interesante de estos resultados es el hecho de que la distribución del GluR1 sea tan diferente entre los tipos celulares dopaminérgico y serotoninérgico a pesar de que usualmente estos sistemas tienen muchos puntos en común. Por otro lado también es sugestivo el hecho de que las neuronas dopaminérgicas del rafe parezcan tener una menor cantidad de receptor GluR1 que sus pares del ATV. La presencia de distintas subunidades GluR en neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas podría explicar diferencias funcionales entre ambos tipos de neuronas, como se discutirá más adelante.

1.2 Consideraciones funcionales

La gran importancia del control que realiza la CPFm sobre la actividad de las neuronas serotoninérgicas queda de manifiesto en el hecho de que más del 80% de las neuronas del RD pueden ser estimuladas por la activación eléctrica de la CPFm (Hajós and Sharp, 1998; Celada et al., 2001). Estos mismos autores encontraron diferencias topográficas en la respuesta generada en el RD por la estimulación de la CPFm. La estimulación de la zona infralímbica produce un mayor número de inhibiciones no mediadas por el receptor 5-HT_{1A} que las encontradas en zonas más dorsales, quizás debido a un mayor número de sinapsis sobre

células GABAérgicas por parte de las neuronas provenientes de la corteza infralímbica. Esto fue confirmado posteriormente mediante técnicas de trazado, donde se encontró que las neuronas más ventrales de la CPF solían hacer sinapsis sobre células GABAérgicas, mientras que la estimulación más dorsal podía generar respuestas tanto excitatorias como inhibitorias (Varga et al., 2001; Jankowski and Sesack, 2004). Las excitaciones parecerían estar mediadas por una interacción directa de las neuronas piramidales sobre las células serotoninérgicas, mientras que las inhibiciones son obviamente indirectas a través de células GABAérgicas (vía receptores GABA_A) u otras células serotoninérgicas (vía receptores 5-HT_{1A}) (Celada et al., 2001). En este sentido, es indistinto si la estimulación es eléctrica o química: ambas producen un aumento en la actividad y en la liberación de 5-HT como se ha visto en diversos trabajos donde se estimuló de ambas formas la CPFm (Celada, 2001; Amargós-Bosch, 2003).

En el caso del ATV, se sabe por datos tanto anatómicos como electrofisiológicos que la CPF constituye la mayor entrada excitatoria de la estructura (Thierry et al., 1979; Thierry et al., 1983b; Tong et al., 1998; Gabbott et al., 2005; Geisler and Zahm, 2005; Hurley et al., 1991; Sesack and Pickel, 1992; Carr and Sesack, 2000b). Estas vías descendentes realizan sinapsis tanto en células GABAérgicas como en células dopaminérgicas. Tal como se indica en la introducción, existe un bucle cerrado entre la CPFm y las neuronas mesocorticales del ATV. Por otra parte, neuronas dopaminérgicas que proyectan a otras áreas distintas del núcleo accumbens reciben también aferencias directas de la CPFm, de manera que una activación de la misma puede modular la liberación de DA en la propia CPF y en otras áreas del sistema límbico, así como la actividad de las neuronas GABAérgicas del ATV que proyectan al núcleo accumbens. Las neuronas dopaminérgicas que reciben aferencias de la CPFm no proyectan al núcleo accumbens (Carr y Sesack, 2000). Por lo cual el receptor 5HT_{2A} presente en las neuronas piramidales de proyección no

afectaría (por lo menos en forma directa) los niveles de dopamina liberados en el núcleo accumbens. En resumen, las neuronas de la CPFm pueden regular la actividad de la vía dopaminérgica mesocortical y también la vía GABAérgica mesolímbica, así como la actividad de neuronas dopaminérgicas que no proyectan a este núcleo.

Las entradas excitatorias en el ATV son importantes a la hora de producir cambios a largo plazo sobre la actividad de las neuronas dopaminérgicas y GABAérgicas por participar en fenómenos de plasticidad sináptica entre otros (Bonci y Malenka, 1999). Por otro lado, los registros *in vivo* demuestran que la entrada desde la CPFm es crucial para evocar descargas en ráfaga (Overton and Clark, 1997; Gariano and Groves, 1988).

Una pregunta derivada del presente trabajo es en qué condiciones podría estar involucrada y para qué sería necesaria la coordinación de las actividades del RD y el ATV por parte de la CPF. Un buen punto de partida para empezar a responder esta pregunta es atribuirle a dicha coordinación relevancia a nivel cognitivo y emocional, ya que involucra las vías dopaminérgicas y serotoninérgicas ascendentes del sistema límbico y también a las que actúan sobre áreas esenciales para la memoria operativa y la generación de estrategias. Las neuronas dopaminérgicas incrementan su actividad en respuesta a estímulos que actúen como recompensa (Schultz, 2004; 2007); por otro lado, también se ha visto un incremento en la actividad del rafe en respuesta a estímulos que indican una recompensa futura (Tanaka et al., 2004). Basados en estos resultados sugerimos que estímulos comportamentales que involucren la CPF pueden producir un cambio concertado en la actividad de los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico. Puesto que solamente implica conexiones monosinápticas, este control debería ocurrir en una corta ventana temporal casi siempre inferior a 20 ms, modificando e incrementando, en la mayoría de casos, los niveles de ambos neurotransmisores tanto a nivel subcortical como cortical, incluyendo en esta última a la propia CPF.

Los receptores metabotrópicos como el 5-HT_{2A}, regulan el nivel de polarización de la célula, en este caso

excitando y facilitando que otras entradas excitadoras alcancen el potencial de acción (Araneda and Andrade, 1991; Tanaka and North, 1993; Aghajanian and Marek, 1999; Amargós-Bosch et al., 2004; Villalobos C, 2005). En base a esto la primera implicación funcional del segundo trabajo que podemos sugerir es que la activación de este receptor aumentaría la entrada glutamatérgica al ATV y al RD.

Cuando esta actividad es mediada por la 5-HT endógena se genera un patrón complejo que involucra excitaciones pero también inhibiciones en las neuronas de proyección de la CPFm, probablemente debido a la acción de la 5-HT sobre otros receptores o tal vez sobre el propio 5-HT_{2A} localizado en células GABAérgicas (Puig et al., 2005; Tanaka and North, 1993; Zhou and Hablitz, 1999). Los alucinógenos que median su acción a través del receptor 5-HT_{2A}, como por ejemplo el DOI, el DOB o el LSD, afectan notablemente el número de potenciales de acción en neuronas de proyección de la CPFm, usualmente generando activaciones (Puig et al., 2003).

Se sabe que tanto la aplicación sistémica como la aplicación local en la CPF de agonistas o antagonistas de receptor 5-HT_{2A}, puede modular la actividad de vías dopaminérgicas y serotoninérgicas ascendentes. Por ejemplo, la aplicación local de DOI en la corteza genera un aumento del número de descargas en ráfaga de las neuronas del ATV y la liberación terminal de DA (Bortolozzi et al., 2005) así como de la actividad de neuronas del RD y de la liberación terminal de 5-HT (Martín-Ruiz et al., 2001).

Por otro lado, la interacción entre el RD y el ATV no ocurre solo por vías indirectas, al analizar los cortes del RD de las ratas inyectadas con FG en el ATV, se observó un abundante número de células marcadas (datos no mostrados). Esto es coherente con la existencia de conexiones entre ambos núcleos, que ya han sido descritas con anterioridad por otros autores (ver Jacobs and Azmitia, 1992). La 5-HT que llega a las neuronas dopaminérgicas puede activar una pequeña proporción de receptores 5-HT_{2A} presente en estas neuronas (Nocjar et al., 2002) así como receptores 5-HT_{2C} presentes en

neuronas GABAérgicas del ATV (Prisco et al., 1994). La administración de un agonista 5-HT_{2A} por vía sistémica actuaría de ambas formas, directa e indirecta, despolarizando las neuronas dopaminérgicas y facilitando la generación de potenciales de acción evocados por la entrada glutamatérgica de corteza, que a su vez ya habría sido facilitada por el efecto del fármaco sobre el receptor 5-HT_{2A} de las neuronas piramidales de proyección al ATV. El aumento de ráfagas generado por el DOI sistémico (Bortolozzi et al., 2005) podría estar relacionado con este mecanismo.

El control indirecto de la actividad serotoninérgica por parte de la CPF es mediado en parte por la activación de interneuronas GABAérgicas (Celada et al., 2001; Varga et al., 2001). Es posible que la presencia de la subunidad GluR1 en las neuronas GABAérgicas del RD y áreas adyacentes esté vinculado con una respuesta mayor y más rápida a la entrada glutamatérgica (Jonas et al., 1994; Geiger et al., 1995). Esta característica de la subunidad GluR1 también debería afectar a las neuronas dopaminérgicas, sobre todo a las del ATV donde hemos visto una notable abundancia de neuronas que expresan esta subunidad. Los disparos en ráfaga son característicos de esta estructura y de este tipo celular y se producen en respuesta a estímulos que implican una recompensa (Grace et al., 2007; Schultz, 2007). Este tipo de descargas suelen ser controlados por la CPFm (Svensson and Tung, 1989; Tong et al., 1996b) y están mediadas por la activación de receptores NMDA, aunque otros mecanismos de entrada de iones calcio (entre los que podría contarse la presencia de receptores AMPA que expresen la subunidad GluR1 y canales de calcio de tipo L) participan también de la descarga en ráfaga (Grace and Bunney, 1984; Tong et al., 1996a; Johnson and Wu, 2004).

A pesar de las muchas coincidencias que existen entre ambos sistemas monoaminérgicos, las neuronas serotoninérgicas no producen verdaderas descargas en ráfagas (Hajos et al., 1995), lo que podría estar relacionado con la distinta expresión de la subunidad GluR1 en ambos tipos neuronales.

1.3 Consideraciones metodológicas.

Las hipótesis sostenidas en los dos primeros trabajos tienen la particularidad de haber sido demostradas mediante distintos abordajes experimentales, lo cual refuerza la validez de las conclusiones. Algunas de las técnicas utilizadas en estos trabajos no eran de uso rutinario en el laboratorio, por lo que debieron ser puestas a punto y generaron dificultades que merecen ser discutidas (ver más abajo).

Por lo que respecta a la técnica del potencial antidrómico, trabajos anteriores del grupo habían puesto de manifiesto la existencia de neuronas de la CPFm que se activaban tras estimulación en el ATV y en el RD en animales con dos electrodos implantados (Puig et al., 2003). Estudios previos habían descrito la existencia de coproyecciones de la CPF a diversas áreas subcorticales (Thierry et al., 1983a). En el presente trabajo se ha realizado un abordaje sistemático para demostrar la existencia de bifurcaciones axonales en las neuronas de proyección de la CPF, en este caso al RD y al ATV. Con respecto a las mediciones de las latencias y las velocidades encontradas en este trabajo, cabe aclarar que están en el rango de las publicadas tanto por Thierry como por otros autores (Peterson et al., 1990; Celada et al., 2001; Puig et al., 2003).

Se encontraron diferencias significativas en cuanto a las latencias observadas desde el ATV y el RD, siendo la primera menor que la segunda. Esto puede ser debido a que la distancia que separa la ATV de la CPFm es menor que la que existe entre el RD y la CPFm. Sin embargo, la diferencia de latencias es superior a la diferencia de distancias, lo que implica una diferencia en la velocidad de propagación de I potencial. En particular, esta es mayor para el ATV que para RD. La velocidad de propagación está determinada esencialmente por la presencia de vainas de mielina y el grosor de los axones. Las terminales sinápticas están desprovistas de mielina y son de un tamaño mucho menor al de los axones primarios. Además, el

tamaño de los axones suele depender del grado de ramificación, por lo cual es posible que los axones que alcanzan el RD presenten un mayor grado de ramificación que a la altura del ATV lo que justificaría la mayor velocidad para alcanzar esta última área.

El segundo abordaje experimental, que consiste en el trazado de vías mediante trazadores retrógrados, aportó resultados análogos a los obtenidos mediante electrofisiología. Las neuronas de proyección a ambas estructuras mostraron una distribución semejante en la CPFm, ubicándose fundamentalmente en capas V y VI superficial. Estos resultados cuadran con trabajos previos donde se observaban neuronas de proyección desde la CPFm hacia estructuras del mesencéfalo, tanto por técnicas electrofisiológicas como de trazadores (Aghajanian and Wang, 1977; Thierry et al., 1979; Thierry et al., 1983b; Sesack et al., 1989; Tong et al., 1996b; Tong et al., 1998; Hajós and Sharp, 1998; Peyron et al., 1998; Celada et al., 2001; Jankowski and Sesack, 2004; Gabbott et al., 2005; Geisler and Zahm, 2005).

En este trabajo también se han encontrado un mayor número de neuronas que proyectan desde la CPFo hacia el RD que hacia el ATV, encontrándose en ese área muy pocas o ninguna neurona que coproyectaría. En este área los resultados también cuadran con lo observado en trabajos anteriores (Peyron et al., 1998; Gabbott et al., 2005; Geisler and Zahm, 2005).

Una de las posibles limitaciones de los estudios de trazado neuronal es la captación de los trazadores por fibras de paso que proyectaran al RD cuando el trazador se aplica en el ATV, dada su proximidad al haz medial prosencefálico. Sin embargo, esta posibilidad parece remota ya que por un lado, ambos trazadores FG y CTB fueron inyectados en el ATV observándose distribuciones similares. El mecanismo por el cual ambos trazadores ingresan en la célula es diferente y hay acuerdo acerca de que ninguno de los dos es captado por fibras de paso que no estén dañadas (Schmued and Fallon, 1986; Pieribone and Aston Jones, 1988; Schmued and Heimer, 1990) excepto

por unos pocos trabajos donde si encuentran captación por fibras de paso (Dado et al., 1990). Sin duda, la aplicación microiontoforética del trazador minimiza esta posible captación por fibras de paso al producir un menor daño de los axones y las vainas de mielina.

Por otra parte, se observa que la CPFm es en la única zona de la CPF donde se ve un patrón similar en las células que proyectan al ATV y al RD. Si el trazador hubiera sido captado por axones de paso, como por ejemplo los axones del nervio intracraneal del cerebro medio, se debería observar una distribución más amplia en otras zonas como la corteza motora primaria y secundaria (Gabbott et al., 2005), lo que no ocurrió en ninguno de los experimentos realizados.

Así pues, los resultados obtenidos mediante técnicas de trazado poseen una notable coincidencia con los obtenidos mediante la técnica del potencial antidrómico, indicando ambas la existencia de una elevada proporción de neuronas de proyección simultánea al RD y al ATV, aunque estos resultados varían ligeramente entre ambas técnicas. Estas diferencias pueden ser debidas a diversas razones, entre las que destacan los distintos tamaños de la zona de estimulación eléctrica vs. la zona de aplicación microiontoforética, así como diferencias de muestreo debidas al azar en las coordenadas de aplicación/estimulación.

La combinación de técnicas de inmunohistoquímica junto con técnicas de hibridación *in situ* usada en el segundo trabajo aporta una valiosa información sobre la expresión de receptores 5-HT_{2A} en neuronas de proyección de la CPF. Sin embargo, la puesta a punto de dicha técnica combinada no ha estado exenta de dificultades, entre ellas las derivadas del distinto nivel de salinidad requerido por la hibridación *in situ* y el marcaje inmunohistoquímico. Estas se han solucionado gracias a un aumento de la penetrancia, mediante la incubación del anticuerpo primario durante 4 horas a 37° y la utilización de técnicas alternativas a la alta concentración salina (como por ejemplo un PH alto) para mantener la astringencia

en algunos pasos clave de la reacción colorimétrica.

Mediante inmunohistoquímica se encontró un gran número de células marcadas con CTB en los tejidos donde se había realizado previamente la hibridación. Estas células se ubicaron esencialmente en las áreas orbitales y mediales de la CPF al igual que ocurría en los tejidos a los que se les realizó la inmunohistoquímica "convencional". No obstante el número de células marcadas mediante la inmunohistoquímica convencional fue mayor que el obtenido mediante inmunohistoquímica combinada con hibridación *in situ*. Sin embargo, este hecho no altera los resultados obtenidos ya que el muestreo se realizó en función de las células CTB positivas (y no al revés), y no habría porqué esperar una distribución diferencial del mensajero en las células que, proyectando a las áreas de interés, tuvieran mayor o menor marcaje de CTB.

La distribución del mRNA del receptor 5-HT_{2A} fue similar a la observada en trabajos previos usando autorradiografía e hibridación *in situ* (Pazos et al., 1985; Pompeiano et al., 1994), incluyendo un trabajo más reciente que empleaba la hibridación *in situ* (Santana et al., 2004b) que indica que este receptor se expresa en una elevada proporción (50-60%) de neuronas piramidales de la CPF. Todo esto apoya los presentes resultados obtenidos mediante hibridación *in situ* y concuerda con los datos obtenidos en este laboratorio por Fumiaki Mori, quien observó que la inmunohistoquímica por el método ABC no interfiere con la hibridación *in situ*, por lo menos si se realiza en este orden y no así si se hace en orden inverso.

La literatura apunta a la utilización de ribosondas para su combinación con trazadores (Hur and Zaborszky, 2005; Perez-Manso et al., 2006; Yokota et al., 2007; Barroso-Chinea et al., 2008). Sin embargo los trabajos de la presente tesis y otros trabajos no publicados (Peñas y Vilaró) demuestran que también se pueden realizar estudios de trazado combinados con estudios de expresión de receptores utilizando oligonucleótidos como sondas, los cuales presentan algunas ventajas sobre las ribosondas. Entre las que se

destacan que los péptidos son más fáciles de obtener y que son más específicos ya que permiten encontrar diferencias de un solo nucleótido

1.4 Esquizofrenia y antipsicóticos

Queda por discutir cuál es la importancia de los resultados obtenidos en esta tesis en distintas patologías psiquiátricas. A tal fin se harán extrapolaciones de los resultados obtenidos en la rata a los humanos bajo la suposición de que en ambos ocurre algo similar. Las tres estructuras involucradas en este circuito -CPF, RD y ATV- están relacionadas tanto con la depresión como con la esquizofrenia. En particular la disminución en la actividad metabólica de la CPF observada en estas patologías (Catafau et al., 1994; Andreasen et al., 1997; Shergill et al., 2000; Drevets, 2001; Ressler and Mayberg, 2007) podría producir una disminución de la actividad de las neuronas serotoninérgicas y dopaminérgicas, o por lo menos una desregulación de su actividad. Entonces, basados en los resultados de coproyecciones, se puede suponer que esto también arrearía una pérdida de coordinación entre el RD y el ATV.

Por otro lado, los antipsicóticos atípicos y los antidepresivos pueden actuar en la CPF regulando su actividad y contribuyendo así a restaurar la regulación y la coordinación de los núcleos aminérgicos (Bortolozzi et al., 2003; Diaz-Mataix et al., 2005). También se discutirán las implicaciones funcionales del efecto de los antagonistas 5-HT_{2A}, los cuales despiertan especial interés ya que parte del efecto terapéutico de los antipsicóticos atípicos puede estar mediado por el antagonismo sobre este receptor (Nyberg et al., 1998; Meltzer, 1999a).

Tomando a la clozapina como ejemplo de antipsicótico atípico y analizando la ocupación de los receptores dopaminérgicos, vemos que ésta no alcanza el 70% en el caso del receptor D2, lo cual es considerado el límite de eficacia terapéutica que deben superar los antipsicóticos clásicos (Nordstrom et al.,

1998; Kapur et al., 1999; Nyberg et al., 1999). La pregunta que se plantea entonces es cómo el antagonismo sobre el receptor 5-HT_{2A} puede contribuir al efecto terapéutico. En este sentido nosotros sugerimos que el antagonismo del receptor 5-HT_{2A} cortical podría disminuir el caudal de información que sale de la CPFm, disminuyendo por lo tanto la entrada excitadora en el ATV y la liberación de dopamina en distintas áreas de cerebro, incluyendo al propio ATV. De esta forma se generaría indirectamente un efecto similar al antagonismo D2 que afectaría mayormente los sistemas cognitivos y límbicos sin afectar tanto los motores y por lo tanto reduciría los síntomas extrapiramidales. En este sentido es interesante el que la entrada glutamatérgica al RD también se vea reducida por el antagonismo 5-HT_{2A} (Martín-Ruiz et al., 2001), un factor que quizás contribuiría a este fenómeno tanto a nivel cortical como a nivel del ATV.

Ya se ha mencionado en esta tesis una de las hipótesis sobre la etiología de la esquizofrenia, la llamada hipótesis hipoglutamatérgica. Uno de los aspectos que apoya esta hipótesis es que se observa una marcada disminución del número de espinas dendríticas en la CPF de pacientes con la enfermedad (Glantz LA y Lewis DA 2000). Por otro lado, se ha descrito que los antagonistas NMDA como el PCP agravan los síntomas de los pacientes que padecen la enfermedad (Krystal et al., 2002). Desde un punto de vista fisiológico, estas drogas generan un aumento paradójico de la actividad cortical y un aumento de la transmisión glutamatérgica desde la CPFm a los núcleos aminérgicos, entre otros (Kargieman et al., 2007; Jackson et al., 2004). En este sentido es destacable que se ha encontrado un fenómeno similar en ratones knock out de la subunidad epsilon1 del receptor NMDA (Miyamoto et al., 2001).

Un dato a tener en cuenta es que existen muchos compuestos/fármacos excitadores de la corteza y, si bien algunos son "psicoticomiméticos", la mayoría tienen pobres propiedades alucinógenas, obviamente exceptuando a los agonistas 5HT_{2A}.

El receptor 5-HT_{2A} está presente en la CPF. Los agonistas de este receptor excitador son alucinógenos y también generan un aumento de la salida glutamatergica hacia los núcleos aminérgicos, como ya se ha mencionado en las consideraciones funcionales.

Hoy en día sigue siendo un misterio cuál es el área del cerebro donde actúan los antipsicóticos. Los receptores D2 corticales podrían mediar una parte o hasta la totalidad del efecto terapéutico (Lidow et al., 1998b). Sin embargo, otra área candidata a mediar el efecto terapéutico de los antipsicóticos es el núcleo accumbens (Grace, 2000; Nordstrom et al., 1998). Si esto fuera así la discusión anterior perdería peso, ya que las neuronas dopaminérgicas del ATV que reciben innervación desde la CPFm, no proyectan al núcleo accumbens. Sólo las neuronas GABAérgicas de proyección del ATV al núcleo accumbens reciben innervación desde CPFm (Carr and Sesack, 2000b), es más, la disminución de la entrada glutamatergica procedente de corteza podría resultar en un aumento de la liberación de dopamina en accumbens, y quizás también en otras áreas, por un mecanismo mediado por los autoreceptores D2 de la propio ATV (Lammel et al., 2008). Por otro lado, si en verdad fuera el núcleo accumbens el núcleo diana de los antipsicóticos, sería interesante la posibilidad de que una disminución de la entrada GABAérgica desde el ATV actúe en concordancia con un antagonismo de un receptor inhibitorio como es el D2.

Para volver aun más complicado el panorama, también hay que recalcar que si bien los antipsicóticos atípicos tienen una alta afinidad por el receptor 5HT_{2A}, los antagonistas puros de este receptor no tienen propiedades antipsicóticas. Suponiendo que un aumento del caudal de información que sale de la corteza pudiera formar parte de la fisiología de las alucinaciones, ya sean originadas por drogas o por psicosis, los resultados mostrados en el trabajo 2 permiten suponer que agonistas 5HT_{2A} actuaran directamente sobre las células de proyección aumentando esta salida de información. Los antipsicóticos atípicos disminuirían esta salida también por un mecanismo que

involucraría a los mismos receptores 5HT_{2A} presentes en estas neuronas. Sin embargo, este efecto no es suficiente para mediar un efecto antipsicótico total y es necesario el clásico componente antagonista D2. Si relacionamos esto con el trabajo 1 y otros trabajos (Martín-Ruiz et al., 2001) donde se analiza el control de la CPF sobre la liberación de 5-HT y dopamina podríamos sugerir que el antagonismo del receptor 5HT_{2A} disminuiría la liberación de dopamina (por lo menos en algunas estructuras clave), actuando en la misma dirección que un antagonismo dopaminérgico y, a su vez, también disminuiría la liberación de 5-HT actuando en la misma dirección que el propio antagonismo serotoninérgico que media el efecto.

Se puede especular acerca de que la generación de alucinaciones no es producida por cualquier excitador de la corteza, sino sólo por los fármacos que afectan la actividad de las neuronas de proyección. Lo cual podría tener su contraparte en que los depresores de la actividad cortical no tuvieron porqué funcionar como antipsicóticos, a menos que pudieran actuar en el sentido de aumentar el filtrado de la información que sale de la corteza. En todo caso, los resultados de esta tesis no permiten ni siquiera especular acerca del mecanismo por el cual el antagonismo D2 actúa como antipsicótico, a menos que el receptor D2 involucrado sea el que se encuentra en las neuronas GABAérgicas de la capa V de la CPFm (Santana et al., 2004) o el que se encuentra en neuronas de piramidales proyección (Gaspar et al., 1995).

La CPFm realiza una coordinación entre el RD y el ATV. En menor medida esta coordinación también existe entre el RD y el LC (Lee et al., 2005). No obstante, se observa un desfase temporal marcado entre el control de una estructura y el de la otra, un desfase que no se puede explicar solamente por la distancia que existe entre los núcleos y que coincide en afectar más tardíamente a la estructura cuya transmisión sináptica es más lenta (Azmitia and Gannon, 1983), lo cual abre la puerta a preguntarse si esa diferencia de velocidad no tendría algún tipo de valor fisiológico.

Otra diferencia con respecto a la entrada glutamatérgica desde la corteza a estos núcleos viene dada por los receptores que median la respuesta. El subtipo de receptor AMPA GluR1 media una parte de la respuesta de las células dopaminérgicas del ATV mientras que en el caso de RD esta respuesta no es mediada por el GluR1, sino por las subunidades GluR2 y/o GluR3. En el caso de RD la subunidad GluR1 media la respuesta a la entrada glutamatérgica a neuronas GABAérgicas.

Nuestros resultados sobre la presencia de subunidades GluR1 y GluR2/3 en neuronas del RD y el ATV pueden tener implicaciones terapéuticas. Los potenciadores de los receptores AMPA son compuestos con potencial en el tratamiento de distintas enfermedades psiquiátricas que incluyen la depresión y la esquizofrenia (Lynch and Gall, 2006; O'Neill and Witkin, 2007). Estos compuestos actúan aumentando el tiempo de apertura del canal (Lynch and Gall, 2006). De acuerdo con nuestros datos, un potenciador AMPA que aumentara la entrada excitatoria a través del receptor GluR2 tendría una incidencia relativa mayor sobre neuronas

serotoninérgicas que uno que actúe preferentemente sobre el receptor GluR1, esto puede explicar el mejor efecto antidepressivo de los potenciadores AMPA LY392098 y LY404187 que se unen preferentemente a la subunidad GluR2 (Gates et al., 2001; Xia and Arai, 2005; Li et al., 2003).

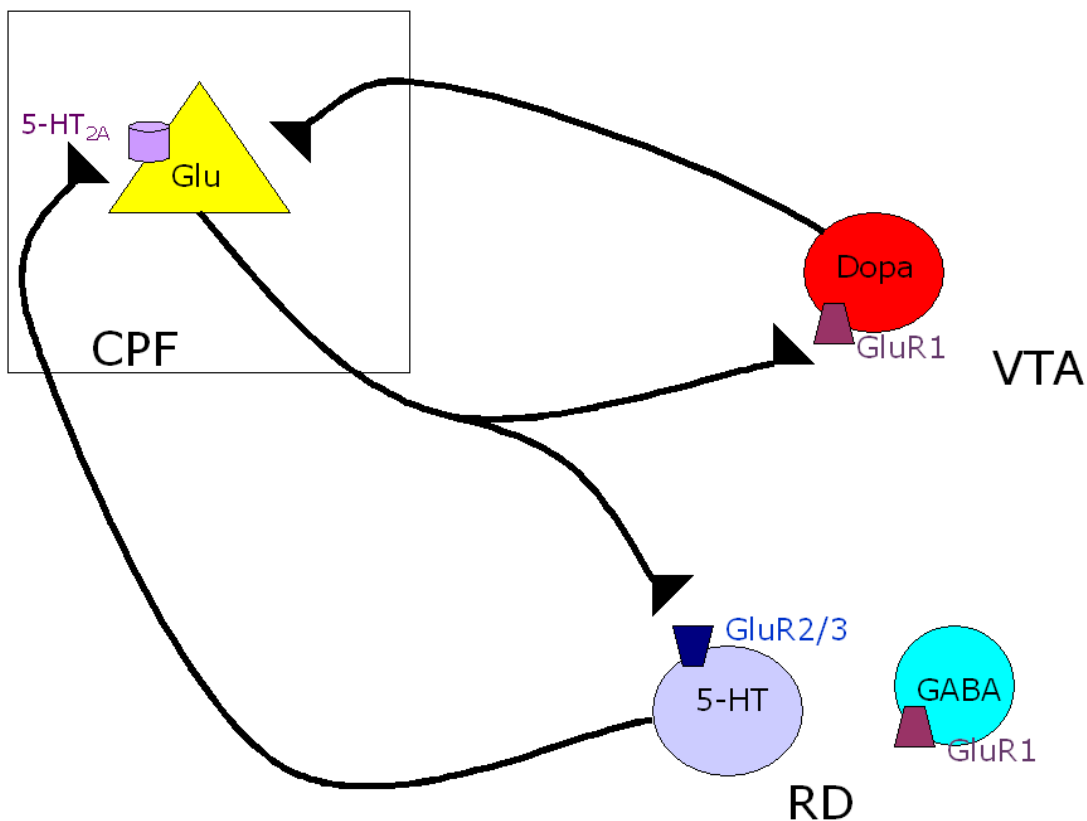
La esquizofrenia es una patología que involucra el deterioro de múltiples funciones cerebrales. Por ende, cualquier intento de cura de esta enfermedad debería estar orientado a restaurar estas funciones, por lo menos en algunas estructuras clave como los núcleos aminérgicos o la CPF. Quizás los potenciadores AMPA tengan algún rol que jugar en este sentido.

En resumen, los contenidos de esta tesis aportan un soporte anatómico a las observaciones funcionales previas que indican un control del receptor 5-HT_{2A} sobre la actividad de neuronas dopaminérgicas y serotoninérgicas. Este control puede estar implicado en el efecto terapéutico de los antipsicóticos atípicos, que reducirían la entrada excitatoria de la CPF en estructuras subcorticales incluyendo los núcleos monoaminérgicos del mesencéfalo.

CONCLUSIONES

Conclusiones:

1. Existe una población de neuronas en la CPFm que bifurca sus axones proyectando tanto al ATV como al RD sugiriendo coordinación en la modulación cortical de estas dos áreas.
2. Aproximadamente el % 50 de las neuronas de la CPF que proyectan al ATV expresan el receptor $5HT_{2A}$. Y aproximadamente el % 70 de las neuronas de la CPF que proyectan al DR expresan el receptor $5HT_{2A}$. Esto da una base anatómica a las observaciones previas que sugieren un control distal de estos sistemas por parte del receptor $5-HT_{2A}$, lo cual puede estar relacionado con el efecto terapéutico de los antipsicóticos atípicos.
3. Se encontró un patrón distintivo entre el RD y el ATV con respecto a la presencia de los subtipos de receptor AMPA. El subtipo GluR1 se encontró mayoritariamente en neuronas GABAérgicas del RD y en neuronas dopaminérgicas del ATV pero no en neuronas serotoninérgicas del RD, las cuales dieron positivas para anticuerpos contra el GluR2/3. Todo esto sugiere un control diferencial de ambos sistemas monoaminérgicos por aferencias excitatorias.



BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

1. Aghajanian GK, Marek GJ (1999) Serotonin, via 5-HT_{2A} receptors, increases EPSCs in layer v pyramidal cells of prefrontal cortex by an asynchronous mode of glutamate release. *Brain Res* 825: 161-171.
2. Aghajanian GK, Wang RY (1977) Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique. *Brain Res* 122: 229-242.
3. Amargos-Bosch M, Adell A, Bortolozzi A, Artigas F (2003) Stimulation of alpha1-adrenoceptors in the rat medial prefrontal cortex increases the local in vivo 5-hydroxytryptamine release: reversal by antipsychotic drugs. *J Neurochem* 87: 831-842.
4. Amargos-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G, Artigas F (2004) Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14: 281-299.
5. Amodio DM, Frith CD (2006) Meeting of minds: the medial frontal cortex and social cognition. *Nat Rev Neurosci* 7: 268-277.
6. Andreasen NC, O'Leary DS, Flaum M, Nopoulos P, Watkins GL, Boles Ponto LL, Hichwa RD (1997) Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naive patients. *Lancet* 349: 1730-1734.
7. Antonova E, Sharma T, Morris R, Kumari V (2004) The relationship between brain structure and neurocognition in schizophrenia: a selective review. *Schizophrenia Research* 70: 117-145.
8. Araneda R, Andrade R (1991) 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 40: 399-412.
9. Aycicegi A, Dinn WM, Harris CL, Erkmen H (2003) Neuropsychological function in obsessive-compulsive disorder: effects of comorbid conditions on task performance. *Eur Psychiatry* 18: 241-248.
10. Azmitia E, Gannon P (1983) The Ultrastructural-Localization of Serotonin Immunoreactivity in Myelinated and Unmyelinated Axons Within the Medial Forebrain-Bundle of Rat and Monkey. *J of Neurosci* 3: 2083-2090.
11. Barbas H, Blatt GJ (1995) Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus* 5: 511-533.
12. Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38: 1083-1152.
13. Barroso-Chinea P, Castle M, Aymerich MS, Lanciego JL (2008) Expression of vesicular glutamate transporters 1 and 2 in the cells of origin of the rat thalamostriatal pathway. *J Chem Neuroanat* 35: 101-107.
14. Berendse HW, Groenewegen HJ (1991) Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat. *Neuroscience* 42: 73-102.

15. Björklund A, Lindvall O (1984) Dopamine-containing systems in the CNS. In: Handbook of Chemical Neuroanatomy. Vol 2, Part 1: Classical Transmitters in the brain (Björklund A, Hokfelt T, eds), pp 55-122. Amsterdam: Elsevier.
16. Bonci A, Malenka RC (1999) Properties and plasticity of excitatory synapses on dopaminergic and GABAergic cells in the ventral tegmental area. *J of Neurosci* 19: 3723-3730.
17. Bortolozzi A, Amargos-Bosch M, Adell A, Diaz-Mataix L, Serrats J, Pons S, Artigas F (2003) In vivo modulation of 5-hydroxytryptamine release in mouse prefrontal cortex by local 5-HT(2A) receptors: effect of antipsychotic drugs. *Eur J Neurosci* 18: 1235-1246.
18. Bortolozzi A, Diaz-Mataix L, Scorza MC, Celada P, Artigas F (2005) The activation of 5-HT receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. *J Neurochem* 95: 1597-1607.
19. Brodmann K (1903) Articles on the histological localisation of the cerebral cortex - Second Announcement The calcarina species. *Journal fur Psychologie und Neurologie* 2: 133-159.
20. Brown VJ, Bowman EM (2002) Rodent models of prefrontal cortical function. *Trends Neurosci* 25: 340-343.
21. Brozoski TJ, Brown RM, Rosvold HE, Goldman PS (1979) Cognitive Deficit Caused by Regional Depletion of Dopamine in Prefrontal Cortex of Rhesus-Monkey. *Science* 205: 929-932.
22. Buhot MC (1997) Serotonin receptors in cognitive behaviors. *Current Opinion in Neurobiology* 7: 243-254.
23. Campbell JJ, Duffy JD, Salloway SP (1994) Treatment Strategies for Patients with Dysexecutive Syndromes. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 6: 411-418.
24. Canavan AGM, Janota I, Schurr PH (1985) Lurias Frontal-Lobe Syndrome - Psychological and Anatomical Considerations. *Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry* 48: 1049-1053.
25. Carlsson A, Waters N, HolmWaters S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML (2001) Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: New evidence. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 237-260.
26. Carr DB, Sesack SR (2000a) GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse* 38: 114-123.
27. Carr DB, Sesack SR (2000b) Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J Neurosci* 20: 3864-3873.
28. Catafau AM, Parellada E, Lomena FJ, Bernardo M, Pavia J, Ros D, Setoain J, Gonzalezmonclus E (1994) Prefrontal and Temporal blood-flow in schizophrenia - resting and activation technetium-99M-Hmpao spect patterns in young neuroleptic-naive patients with acute disease. *J Nucl Med* 35: 935-941.

29. Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F (2001) Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* 21: 9917-9929.
30. Civelli O, Bunzow JR, Grandy DK (1993) Molecular Diversity of the Dopamine-Receptors. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 33: 281-307.
31. Coccaro EF, Astill JL, Szezeley PJ, Malkowicz DE (1990) Serotonin in personality disorder. *Psychiatric Annals* 20(10): 587-592.
32. Coons AH (1958) Fluorescent antibody methods. *Gen Cytochem Methods* 1: 399-422.
33. Cortes R, Camps M, Gueye B, Probst A, Palacios JM (1989) Dopamine receptors in human brain: autoradiographic distribution of D1 and D2 sites in Parkinson syndrome of different etiology. *Brain Res* 483: 30-38
34. Cortes R, Mengod G, Celada P, Artigas F (1993) p-chlorophenylalanine increases tryptophan-5-hydroxylase mRNA levels in the rat dorsal raphe: a time course study using in situ hybridization. *J Neurochem* 60: 761-764.
35. Dado RJ, Burstein R, Cliffer KD, Giesler GJ (1990) Evidence That Fluorogold Can be Transported Avidly Through Fibers of Passage. *Brain Res* 533: 329-333.
36. Dahlström A, Fuxe K (1964) Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I Demonstration of monoamines in cell bodies of brain neurons. *Acta Physiol Scand* 62, Suppl.232: 1-55.
37. Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004) Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 28: 771-784.
38. Davis KL, Kahn RS, Ko G, Davidson M (1991) Dopamine in Schizophrenia - A Review and Reconceptualization. *American Journal of Psychiatry* 148: 1474-1486.
39. Del Arco A, Mora F (2001) Dopamine release in the prefrontal cortex during stress is reduced by the local activation of glutamate receptors. *Brain Res Bull* 56: 125-130.
40. Delatour B, Gisquet-Verrier P (1999) Lesions of the prelimbic-infralimbic cortices in rats do not disrupt response selection processes but induce delay-dependent deficits: evidence for a role in working memory? *Behav Neurosci* 113: 941-955.
41. Delatour B, Gisquet-Verrier P (2000) Functional role of rat prelimbic-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility. *Behavioural Brain Research* 109: 113-128.
42. Deutch AY, Moghaddam B, Innis RB, Krystal JH, Aghajanian GK, Bunney BS, Charney DS (1991) Mechanisms of action of atypical antipsychotic drugs. Implications for novel therapeutic strategies for schizophrenia. *Schizophr Res* 4: 121-156.
43. Devinsky O, Morrell MJ, Vogt BA (1995) Contributions of Anterior Cingulate Cortex to Behavior. *Brain* 118: 279-306.

44. Diaz-Mataix L, Scorza MC, Bortolozzi A, Toth M, Celada P, Artigas F (2005) Involvement of 5-HT_{1A} receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action. *J Neurosci* 25: 10831-10843.
45. Dimitrov M, Granetz J, Peterson M, Hollnagel C, Alexander G, Grafman J (1999) Associative learning impairments in patients with frontal lobe damage. *Brain and Cognition* 41: 213-230.
46. Domenech T, Beleta J, Fernandez AG, Gristwood RW, Sanchez FC, Tolosa E, Palacios JM (1994) Identification and Characterization of Serotonin 5-Ht₄ Receptor Binding Sites in Human Brain - Comparison with Other Mammalian Species. *Mol Brain Res* 21: 176-180.
47. Drevets WC (2001) Functional anatomical abnormalities in limbic and prefrontal cortical structures in major depression. *Prog Brain Res* 2000;126:413-31 126: 413-31.
48. Duan X, Chang JH, Ge S, Faulkner RL, Kim JY, Kitabatake Y, Liu XB, Yang CH, Jordan JD, Ma DK, Liu CY, Ganesan S, Cheng HJ, Ming GL, Lu B, Song H (2007) Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell* 130: 1146-1158.
49. Egan MF, Cheng J, Kolachana BS, Straub RE, Kleinman JE, Weinberger DR (2004) COMT: Evidence that val158met is the functional variant affecting risk for schizophrenia. *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics* 130B: 140.
50. Eison AS, Mullins UL (1995) Regulation of central 5-HT_{2A} receptors: A review of in vivo studies. *Behav Brain Res* 73: 177-181.
51. Floresco SB, West AR, Ash B, Moore H, Grace AA (2003) Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. *Nat Neurosci* 6: 968-973.
52. Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R (2001) Orbitomedial prefrontal cortical projections to hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol* 432: 307-328.
53. Frerking M, Nicoll RA (2000) Synaptic kainate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 10: 342-351.
54. Fuller JH, Schlag JD (1976) Determination of antidromic excitation by the collision test: problems of interpretation. *Brain Res* 112: 283-98.
55. Funahashi K (1989) On the Approximate Realization of Continuous-Mappings by Neural Networks. *Neural Networks* 2: 183-192.
56. Fuster JM (1997) *The Prefrontal Cortex. Anatomy, Physiology and Neuropsychology of the Frontal Lobe.* Philadelphia-New York: Lipincott-Raven.
57. Gabbott PLA, Warner TA, Jays PRL, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492: 145-177.
58. Garey LJ, Patel T, Ong WY (1994) Loss of Dendritic Spines from Cortical Pyramidal Cells in Schizophrenia. *Schizophr Res* 11: 137.

59. Gariano RF, Groves PM (1988) Burst firing induced in midbrain dopamine neurons by stimulation of the medial prefrontal and anterior cingulate cortices. *Brain Res* 462: 194-198.
60. Gaspar P, Bloch B, Lemoine C (1995) D1 and D2 Receptor Gene-Expression in the Rat Frontal-Cortex - Cellular-Localization in Different Classes of Efferent Neurons. *European Journal of Neuroscience* 7: 1050-1063.
61. Gates M, Ogden A, Bleakman D (2001) Pharmacological effects of AMPA receptor potentiators LY392098 and LY404187 on rat neuronal AMPA receptors in vitro. *Neuropharmacology* 40: 984-991.
62. Geiger JR, Melcher T, Koh DS, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15: 193-204.
63. Geisler S, Zahm DS (2005) Afferents of the ventral tegmental area in the rat-anatomical substratum for integrative functions. *J Comp Neurol* 490: 270-294.
64. Goel V, Grafman J, Tajik J, Gana S, Danto D (1997) A study of the performance of patients with frontal lobe lesions in a financial planning task. *Brain* 120: 1805-1822.
65. Goldman-Rakic PS (1996) Regional and cellular fractionation of working memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13473-13480.
66. Goldman-Rakic PS (1999) The physiological approach: functional architecture of working memory and disordered cognition in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 46: 650-661.
67. Goldman-Rakic PS, Leranth C, Williams SM, Mons N, Geffard M (1989) Dopamine synaptic complex with pyramidal neurons in primate cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 9015-9019.
68. Goldman-Rakic PS, Porrino LJ (1985) The primate mediodorsal (MD) nucleus and its projection to the frontal lobe. *J Comp Neurol* 242: 535-560.
69. Goldman-Rakic PS (1995) Architecture of the prefrontal cortex and the central executive. *Structure and Functions of the Human Prefrontal Cortex* 769: 71-83.
70. Grace AA (2000) Gating of information flow within the limbic system and the pathophysiology of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 31: 330-341.
71. Grace AA, Bunney BS (1984) The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. *J Neurosci* 4: 2877-2890.
72. Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ (2007) Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci* 30: 220-227.
73. Groenewegen HJ (1988) Organization of the Afferent Connections of the Mediodorsal Thalamic Nucleus in the Rat, Related to the Mediodorsal Prefrontal Topography. *Neuroscience* 24: 379-431.

74. Groenewegen HJ, Berendse HW, Haber SN (1993) Organization of the output of the ventral striatopallidal system in the rat: ventral pallidal efferents. *Neuroscience* 57: 113-142.
75. Groenewegen HJ, Uylings HB (2000) The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res* 126:3-28.: 3-28.
76. Groenewegen HJ, Wright CI, Uylings HB (1997) The anatomical relationships of the prefrontal cortex with limbic structures and the basal ganglia. *J Psychopharmacol* 11: 99-106.
77. Hafen E, Levine M, Garber R, Kuroiwa A, Gehring WJ (1983) Localization of Antennapedia Transcripts in Developing Drosophila Embryos Using An Improved in Situ Hybridization Method. *Experientia* 39: 664-665.
78. Hajos M, Gartside SE, Sharp T (1995) Inhibition of median and dorsal raphe neurones following administration of the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 351: 624-629.
79. Hajós M, Sharp T (1998) Afferent regulation of dorsal raphe 5-HT neurones: possible role of cortical postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Soc Neurosci Abs* 24: 1108.
80. Harrison PJ, Weinberger DR (2005) Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Molecular Psychiatry* 10: 40-68.
81. Harvey PD, Green MF, Mcgurk SR, Meltzer HY (2003) Changes in cognitive functioning with risperidone and olanzapine treatment: a large-scale, double-blind, randomized study. *Psychopharmacology* 169: 404-411.
82. Hokfelt T, Johansson O, Fuxe K, Goldstein M, Park D (1976) Immunohistochemical Studies on Localization and Distribution of Monoamine Neuron Systems in Rat-Brain .1. Tyrosine-Hydroxylase in Mesencephalon and Diencephalon. *Medical Biology* 54: 427-&.
83. Honea RA, Meyer-Lindenburg A, Hobbs K, Pezawas L, Verchinski BA, Goldman AL, Mattay VS, Weinberger DR, Callicott JH (2005) Temporal and prefrontal cortex gray matter abnormalities in patients with schizophrenia and their unaffected siblings; An optimized voxel-based morphometry study. *Neuropsychopharmacology* 30: S190-S191.
84. Hsu DT, Price JL (2007) Midline and intralaminar thalamic connections with the orbital and medial prefrontal networks in macaque monkeys. *J Comp Neurol* 504: 89-111.
85. Hur EE, Zaborszky L (2005) Vglut2 afferents to the medial prefrontal and primary somatosensory cortices: a combined retrograde tracing in situ hybridization study [corrected]. *J Comp Neurol* 483: 351-373.
86. Hurd YL, Suzuki M, SEDVALL GC (2001) D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 22: 127-137.
87. Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB (1991) Efferent Projections of the Infralimbic Cortex of the Rat. *J Comp Neurol* 308: 249-276.

88. Jackson ME, Homayoun H, Moghaddam B (2004) NMDA receptor hypofunction produces concomitant firing rate potentiation and burst activity reduction in the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 8467-8472.
89. Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72: 165-229.
90. Jankowski MP, Sesack SR (2004) Prefrontal cortical projections to the rat dorsal raphe nucleus: ultrastructural features and associations with serotonin and gamma-aminobutyric acid neurons. *J Comp Neurol* 468: 518-529.
91. Javadpour A, Malhi GS, Ivanovski B, Chen XH, Wen W, Sachdev P (2007) Increased anterior cingulate cortex volume in bipolar I disorder. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* 41: 910-916.
92. Johnson SW, Wu YN (2004) Multiple mechanisms underlie burst firing in rat midbrain dopamine neurons in vitro. *Brain Res* 1019: 293-296.
93. Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H (1994) Differences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor channels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit expression. *Neuron* 12: 1281-1289.
94. Kalkman HO, Fozard JR (1991) 5HT Receptor Types and Their Role in Disease. *Current Opinion in Neurology and Neurosurgery* 4: 560-565.
95. Kapur S, Zipursky RB, Remington G (1999) Clinical and theoretical implications of 5-HT₂ and D₂ receptor occupancy of clozapine, risperidone, and olanzapine in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 156: 286-293.
96. Kargieman L, Santana N, Mengod G, Celada P, Artigas F (2007) Antipsychotic drugs reverse the disruption in prefrontal cortex function produced by NMDA receptor blockade with phencyclidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14843-14848.
97. Koechlin E, Basso G, Pietrini P, Panzer S, Grafman J (1999) The role of the anterior prefrontal cortex in human cognition. *Nature* 399: 148-151.
98. Kosofsky BE, Molliver ME (1987) The serotonergic innervation of cerebral cortex: Different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei. *Synapse* 1: 153-168.
99. Krettek JE, Price JL (1977) Projections from Amygdaloid Complex to Cerebral-Cortex and Thalamus in Rat and Cat. *J Comp Neurol* 172: 687-722.
100. Kroeze WK, Roth BL (1998) The molecular biology of serotonin receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis. *Biol Psychiatry* 44: 1128-1142.
101. Krystal JH, Anand A, Moghaddam B (2002) Effects of NMDA receptor antagonists: implications for the pathophysiology of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 59: 663-664.
102. Lammel S, Hetzel A, Hackel O, Jones I, Liss B, Roeper J (2008) Unique properties of mesoprefrontal neurons within a dual mesocorticolimbic dopamine system. *Neuron* 57: 760-773.

103. Lee HS, Kim MA, Waterhouse BD (2005) Retrograde double-labeling study of common afferent projections to the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *J Comp Neurol* 481: 179-193.
104. Lemoal M, Simon H (1991) Mesocorticolimbic Dopaminergic Network - Functional and Regulatory Roles. *Physiological Reviews* 71: 155-234.
105. Lhermitte F, Pillon B, Serdaru M (1986) Human Autonomy and the Frontal Lobes .1. Imitation and Utilization Behavior - A Neuropsychological Study of 75 Patients. *Annals of Neurology* 19: 326-334.
106. Li X, Witkin JM, Need AB, Skolnick P (2003) Enhancement of antidepressant potency by a potentiator of AMPA receptors. *Cell Mol Neurobiol* 23: 419-430.
107. Lidow MS, Wang F, Cao Y, Goldman-Rakic PS (1998a) Layer V neurons bear the majority of mRNAs encoding the five distinct dopamine receptor subtypes in the primate prefrontal cortex. *Synapse* 28: 10-20.
108. Lidow MS, Williams GV, Goldman-Rakic PS (1998b) The cerebral cortex: a case for a common site of action of antipsychotics. *Trends Pharmacol Sci* 19: 136-140.
109. Luppi PH, Sakai K, Salvert D, Fort P, Jouvet M (1987) Peptidergic Hypothalamic Afferents to the Cat Nucleus Raphe Pallidus As Revealed by A Double Immunostaining Technique Using Unconjugated Cholera-Toxin As A Retrograde Tracer. *Brain Res* 402: 339-345.
110. Lynch G, Gall CM (2006) Ampakines and the threefold path to cognitive enhancement. *Trends Neurosci* 29: 554-562.
111. Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, Haganir RL, Price DL (1993) Ampa Glutamate Receptor Subunits Are Differentially Distributed in Rat-Brain. *Neuroscience* 53: 327-358.
112. Martin-Ruiz R, Puig MV, Celada P, Shapiro DA, Roth BL, Mengod G, Artigas F (2001) Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. *J Neurosci* 21: 9856-9866.
113. MartinRuiz R, Ugedo L (2001) Electrophysiological evidence for postsynaptic 5-HT_{1A} receptor control of dorsal raphe 5-HT neurones. *Neuropharmacology* 2001 JUL;41(1):72-78 41: 72-78.
114. Meltzer HY (1999a) The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* 21: S106-S115.
115. Meltzer HY (1999b) Treatment of schizophrenia and spectrum disorders: pharmacotherapy, psychosocial treatments, and neurotransmitter interactions. *Biol Psychiatry* 46: 1321-137.
116. Milad MR, Quirk GJ (2002) Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420: 70-74.
117. Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA (2005) Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs. *Mol Psychiatry* 10: 79-104.

118. Miyamoto Y, Yamada K, NODA Y, Mori H, Mishina M, Nabeshima T (2001) Hyperfunction of dopaminergic and serotonergic neuronal systems in mice lacking the NMDA receptor epsilon1 subunit. *J Neurosci* 21: 750-757.
119. Morgane PJ, Galler JR, Mokler DJ (2005) A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol* 75: 143-160.
120. Mori F, Pérez-Torres S, Reyes-Irisarri E and Mengod G. cAMP-specific phosphodiesterases 4 expression in Alzheimer disease brain. 2008.
121. Ref Type: Generic
122. Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991) Molecular-Cloning and Characterization of the Rat Nmda Receptor. *Nature* 354: 31-37.
123. Nanopoulos D, Belin MF, Maitre M, Vincendon G, Pujol JF (1982) Immunocytochemical evidence for the existence of GABAergic neurones in the nucleus raphe dorsalis. Possible existence of neurones containing serotonin and GABA. *Brain Res* 232: 375-389.
124. Nauta WJH (1971) Problem of Frontal Lobe - Reinterpretation. *Journal of Psychiatric Research* 8: 167-&.
125. Neafsey EJ, Hurleygius KM, Arvanitis D (1986) The Topographical Organization of Neurons in the Rat Medial Frontal, Insular and Olfactory Cortex Projecting to the Solitary Nucleus, Olfactory-Bulb, Periaqueductal Gray and Superior Colliculus. *Brain Res* 377: 261-270.
126. Nichols DE (2004) Hallucinogens. *Pharmacol Ther* 101: 131-181.
127. Niemi LT, Suvisaari JM, Tuuio-Henriksson A, Lonnqvist JK (2003) Childhood developmental abnormalities in schizophrenia: evidence from high-risk studies. *Schizophr Res* 60: 239-258.
128. Niznikiewicz MA, Kubicki M, Shenton ME (2003) Recent structural and functional imaging findings in schizophrenia. *Current Opinion in Psychiatry* 16: 123-147.
129. Nocjar C, Roth BL, Pehek EA (2002) Localization of 5-HT(2A) receptors on dopamine cells in subnuclei of the midbrain A10 cell group. *Neuroscience* 111: 163-176.
130. Nordstrom AL, Nyberg S, Olsson H, Farde L (1998) Positron emission tomography finding of a high striatal D2 receptor occupancy in olanzapine-treated patients. *Arch Gen Psychiatry* 55: 283-284.
131. Nyberg S, Eriksson B, Oxenstierna G, Halldin C, Farde L (1999) Suggested minimal effective dose of risperidone based on PET-measured D2 and 5-HT2A receptor occupancy in schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 156: 869-875.
132. Nyberg S, Nilsson U, Okubo Y, Halldin C, Farde L (1998) Implications of brain imaging for the management of schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol* 13 Suppl 3: S15-S20.

133. O'Neill MJ, Murray TK, Whalley K, Ward MA, Hicks CA, Woodhouse S, Osborne DJ, Skolnick P (2004) Neurotrophic actions of the novel AMPA receptor potentiator, LY404187, in rodent models of Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol* 486: 163-174.
134. O'Neill MJ, Witkin JM (2007) AMPA receptor potentiators: application for depression and Parkinson's disease. *Curr Drug Targets* 8: 603-620.
135. Ongur D, Price JL (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex* 10: 206-219.
136. Overton PG, Clark D (1997) Burst firing in midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res Brain Res Rev* 25: 312-334.
137. Palucha A, Pilc A (2007) Metabotropic glutamate receptor ligands as possible anxiolytic and antidepressant drugs. *Pharmac Ther* 115: 116-147.
138. Paxinos G, Watson C (1986) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney: Academic Press.
139. Pazos A, Cortés R, Palacios JM (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res* 346: 231-249.
140. Perez-Manso M, Barroso-Chinea P, Aymerich MS, Lanciego JL (2006) 'Functional' neuroanatomical tract tracing: analysis of changes in gene expression of brain circuits of interest. *Brain Res* 1072: 91-98.
141. Peterson P, Peterson J, Finn P (1990) Inherited predisposition to alcoholism: characteristics of sons of male alcoholics. *J Abnorm Psychol* 99(3): 291-301.
142. Peyron C, Petit JM, Rampon C, Jouvet M, Luppi PH (1998) Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience* 82: 443-468.
143. Pieribone VA, Astonjones G (1988) The Iontophoretic Application of Fluoro-Gold for the Study of Afferents to Deep Brain Nuclei. *Brain Res* 475: 259-271.
144. Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G (1994) Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Mol Brain Res* 23: 163-178.
145. Price JL (2007) Definition of the orbital cortex in relation to specific connections with limbic and visceral structures and other cortical regions. *Linking Affect to Action: Critical Contributions of the Orbitofrontal Cortex* 1121: 54-71.
146. Puig MV, Artigas F, Celada P (2005) Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA. *Cereb Cortex* 15: 1-14.
147. Puig MV, Celada P, Diaz-Mataix L, Artigas F (2003) In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT_{2A} receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cereb Cortex* 13: 870-882.
148. Peñas R, Adell A, Vázquez P. E, Serrats J, Artigas F, Vilaró M. T. (2008) Frontocortical 5-HT₄ receptors control dopamine but not serotonin release in medial prefrontal cortex: neuroanatomical and functional evidence. .

149. Raymond JR, Mukhin YV, Gettys TW, Garnovskaya MN (1999) The recombinant 5-HT1a receptor: g protein coupling and signalling pathways. *Br J Pharmacol* 127: 1751-1764.
150. Ressler KJ, Mayberg HS (2007) Targeting abnormal neural circuits in mood and anxiety disorders: from the laboratory to the clinic. *Nat Neurosci* 10: 1116-1124.
151. Ronde P, Ansanay H, Dumuisa A, Miller R, Bockaert J (1995) Homologous desensitization of 5-hydroxytryptamine(4) receptors in rat esophagus: Functional and second messenger studies. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 977-983.
152. Rose JE, Woolsey CN (1947) The Orbitofrontal Cortex and Its Connections with the Mediodorsal Nucleus in Rabbit, Sheep and Cat. *Research Publications-Association for Research in Nervous and Mental Disease* 27: 210-232.
153. Ross CA, Margolis RL, Reading SAJ, Pletnikov M, COYLE JT (2006) Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* 52: 139-153.
154. Sanderson DJ, Good MA, Seeburg PH, Sprengel R, Rawlins JN, Bannerman DM (2008) Chapter 9 The role of the GluR-A (GluR1) AMPA receptor subunit in learning and memory. *Prog Brain Res* 169: 159-178.
155. Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F (2004a) Expression of Serotonin1A and Serotonin2A Receptors in Pyramidal and GABAergic Neurons of the Rat Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex*.
156. Saper CB (2000) Hypothalamic connections with the cerebral cortex. *Cognition, Emotion and Autonomic Responses: the Integrative Role of the Prefrontal Cortex and Limbic Structures* 126: 39-48.
157. Sarazin M, Pillon B, Giannakopoulos P, Rancurel G, SAMSON Y, Dubois B (1998) Clinicometabolic dissociation of cognitive functions and social behavior in frontal lobe lesions. *Neurology* 51: 142-148.
158. Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS (1994) The role of D1-dopamine receptor in working memory: local injections of dopamine antagonists into the prefrontal cortex of rhesus monkeys performing an oculomotor delayed-response task. *J Neurophysiol* 71: 515-528.
159. Schaechter JD, Wurtman RJ (1990) Serotonin Release Varies with Brain Tryptophan Levels. *Brain Res* 532: 203-210.
160. Schmidt CJ, Sorensen SM, Kehne JH, Carr AA, Palfreyman MG (1995) The role of 5-HT2A receptors in antipsychotic activity. *Life Sci* 56: 2209-2222.
161. Schmued LC, Fallon JH (1986) Fluorogold - A New Fluorescent Retrograde Axonal Tracer with Numerous Unique Properties. *Brain Res* 377: 147-154.
162. Schmued LC, Heimer L (1990) Iontophoretic Injection of Fluorogold and Other Fluorescent Tracers. *J Histochem Cytochem* 38: 721-723.
163. Schoenbaum G, Setlow B, Saddoris MP, Gallagher M (2003) Encoding predicted outcome and acquired value in orbitofrontal cortex during cue sampling depends upon input from basolateral amygdala. *Neuron* 39: 855-867.

164. Schultz W (2004) Neural coding of basic reward terms of animal learning theory, game theory, microeconomics and behavioural ecology. *Curr Opin Neurobiol* 14: 139-147.
165. Schultz W (2007) Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu Rev Neurosci* 30: 259-288.
166. Serrats J, Artigas F, Mengod G, Cortes R (2003) GABAB receptor mRNA in the raphe nuclei: co-expression with serotonin transporter and glutamic acid decarboxylase. *J Neurochem* 84: 743-752.
167. Sesack SR, Bressler CN, Lewis DA (1995a) Ultrastructural associations between dopamine terminals and local circuit neurons in the monkey prefrontal cortex: a study of calretinin-immunoreactive cells. *Neurosci Lett* 200: 9-12.
168. Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (1989) Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 290: 213-242.
169. Sesack SR, Pickel VM (1992) Prefrontal cortical efferents in the rat synapse on unlabeled neuronal targets of catecholamine terminals in the nucleus accumbens septi and on dopamine neurons in the ventral tegmental area. *J Comp Neurol* 320: 145-160.
170. Sesack SR, Snyder CL, Lewis DA (1995b) Axon terminals immunolabeled for dopamine or tyrosine hydroxylase synapse on GABA-immunoreactive dendrites in rat and monkey cortex. *J Comp Neurol* 363: 264-280.
171. Shammi P, Stuss DT (1999) Humour appreciation: a role of the right frontal lobe. *Brain* 122: 657-666.
172. Shergill SS, Brammer MJ, Williams SC, Murray RM, McGuire PK (2000) Mapping auditory hallucinations in schizophrenia using functional magnetic resonance imaging. *Arch Gen Psychiatry* 57: 1033-1038.
173. Silvestre JS, Fernandez AG, Palacios JM (1996) Effects of 5-HT₄ receptor antagonists on rat behaviour in the elevated plus-maze test. *Eur J Pharmacol* 309: 219-222.
174. Simon H, Scatton B, Lemoal M (1980) Dopaminergic A10 Neurons Are Involved in Cognitive Functions. *Nature* 286: 150-151.
175. Soares JC, Mann JJ (1997) The functional neuroanatomy of mood disorders. *Journal of Psychiatric Research* 31: 393-432.
176. Spanagel R, Weiss F (1999) The dopamine hypothesis of reward: past and current status. *Trends Neurosci* 22: 521-527.
177. Svensson TH, Tung CS (1989) Local cooling of pre-frontal cortex induces pacemaker-like firing of dopamine neurons in rat ventral tegmental area in vivo. *Acta Physiol Scand* 136: 135-136.
178. Tanaka E, North RA (1993) Actions of 5 Hydroxytryptamine on Neurons of the Rat Cingulate Cortex. *J Neurophysiol* 69: 1749-1757.

179. Tanaka H, Grooms SY, Bennett MV, Zukin RS (2001) The AMPAR subunit GluR2: still front and center-stage. *Brain Res* 886: 190-207.
180. Tanaka SC, Doya K, Okada G, Ueda K, Okamoto Y, Yamawaki S (2004) Prediction of immediate and future rewards differentially recruits cortico-basal ganglia loops. *Nat Neurosci* 7: 887-893.
181. Thierry AM, BLANC G, Sobel A, Stinus L, Glowinski J (1973) Dopaminergic terminals in the rat cortex. *Science* 182: 499-501.
182. Thierry AM, Chevalier G, Ferron A, Glowinski J (1983a) Diencephalic and mesencephalic efferents of the medial prefrontal cortex in the rat: electrophysiological evidence for the existence of branched axons. *Exp Brain Res* 50: 275-282.
183. Thierry AM, Deniau JM, Chevalier G, Ferron A, Glowinski J (1983b) An electrophysiological analysis of some afferent and efferent pathways of the rat prefrontal cortex. *Prog Brain Res* 58: 257-61.
184. Thierry AM, Deniau JM, Feger J (1979) Effects of Stimulation of the Frontal-Cortex on Identified Output Vmt Cells in the Rat. *Neurosci Lett* 15: 103-107.
185. Tomiyama M, Palacios JM, Cortes R, Vilario MT, Mengod G (1997) Distribution of AMPA receptor subunit mRNAs in the human basal ganglia: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 46: 281-289.
186. Tong ZY, Overton PG, Clark D (1996a) Antagonism of NMDA receptors but not AMPA/kainate receptors blocks bursting in dopaminergic neurons induced by electrical stimulation of the prefrontal cortex. *J Neural Transm* 103: 889-904.
187. Tong ZY, Overton PG, Clark D (1996b) Stimulation of the prefrontal cortex in the rat induces patterns of activity in midbrain dopaminergic neurons which resemble natural burst events. *Synapse* 22: 195-208.
188. Tong ZY, Overton PG, Martinez-Cue C, Clark D (1998) Do non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area play a role in the responses elicited in A10 dopaminergic neurons by electrical stimulation of the prefrontal cortex? *Exp Brain Res* 118: 466-476.
189. Tork I (1990) Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci* 600: 9-34; discuss.
190. Uylings HBM, Groenewegen HJ, KOLB B (2003) Do rats have a prefrontal cortex? *Behavioural Brain Research* 146: 3-17.
191. van Eden CG, Rinkens A, Uylings HBM (1998) Retrograde degeneration of thalamic neurons in the mediodorsal nucleus after neonatal and adult aspiration lesions of the medial prefrontal cortex in the rat. Implications for mechanisms of functional recovery. *European Journal of Neuroscience* 10: 1581-1589.
192. Varga V, Szekely AD, Csillag A, Sharp T, Hajos M (2001) Evidence for a role of GABA interneurons in the cortical modulation of midbrain 5-hydroxytryptamine neurones. *Neuroscience* 106: 783-792.
193. Verberne AJM, Owens NC (1998) Cortical modulation of the cardiovascular system. *Progress in Neurobiology* 54: 149-168.

194. Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51: 32-58.
195. Vilaro MT, Cortes R, Gerald C, Branchek TA, Palacios JM, Mengod G (1996) Localization of 5-HT₄ receptor mRNA in rat brain by in situ hybridization histochemistry. *Brain Res Mol Brain Res* 43: 356-360.
196. Villalobos C, Jean-Claude Beique JAGaRA (2005) Serotonergic regulation of calcium-activated potassium currents in rodent prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience* 22: 1120-1126.
197. Weinberger DR (2007) Schizophrenia drug says goodbye to dopamine. *Nature Medicine* 13: 1018-1019.
198. Williams GV, Rao SG, Goldman-Rakic PS (2002) The physiological role of 5-HT_{2A} receptors in working memory. *J Neurosci* 22: 2843-2854.
199. Xia YF, Arai AC (2005) AMPA receptor modulators have different impact on hippocampal pyramidal cells and interneurons. *Neuroscience* 135: 555-567.
200. Xu ZQD, Hokfelt T (1997) Expression of galanin and nitric oxide synthase in subpopulations serotonin neurons of the rat dorsal raphe nucleus. *J Chem Neuroanat* 13: 169-187.
201. Yokota S, Oka T, Tsumori T, Nakamura S, Yasui Y (2007) Glutamatergic neurons in the Kolliker-Fuse nucleus project to the rostral ventral respiratory group and phrenic nucleus: a combined retrograde tracing and in situ hybridization study in the rat. *Neurosci Res* 59: 341-346.
202. Young WS, Mezey E, Siegel RE (1986) Quantitative Insitu Hybridization Histochemistry Reveals Increased Levels of Corticotropin-Releasing Factor Messenger-Rna After Adrenalectomy in Rats. *Neurosci Lett* 70: 198-203.
203. Zhou FM, Hablitz JJ (1999) Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. *J Neurophysiol* 82: 2989-2999.