

V. DISCUSSIÓ

1. Consideracions generals

Un dels principals objectius de la present tesi ha estat estudiar el paper que exerceixen els receptors excitadors (serotoninèrgics 5-HT_{2A}, adrenèrgics α_1 i glutamatèrgics AMPA) i inhibitoris (serotoninèrgics 5-HT_{1A}), presents a l'EPFm de rata i ratolí, sobre l'alliberació cortical de 5-HT *in vivo*. Estudis previs del laboratori han mostrat que l'activació dels receptors 5-HT_{2A} i AMPA corticals produeix un increment de la freqüència de descàrrega de les neurones piramidals de l'EPFm i de les neurones 5-HTèrgiques del NDR, així com un increment de l'alliberació cortical de 5-HT (Martín-Ruiz *et al.*, 2001; Puig *et al.*, 2003). Per tant, la mesura d'alliberació cortical de 5-HT *in vivo* ens serveix com a indicador de l'activitat del circuit escorça prefrontal – nuclis del rafe.

Ens hem centrat principalment en l'anàlisi dels efectes d'aquests receptors monoaminèrgics (5-HT_{2A}, 5-HT_{1A}, adrenèrgics α_1) ja que són els receptors pels quals determinats fàrmacs antipsicòtics presenten una elevada afinitat i, en concret, a l'EPFm perquè és una regió on són particularment abundants i per la seva implicació en la simptomatologia negativa de l'esquizofrènia. Tot i la importància dels receptors D2 en el tractament de l'esquizofrènia (no s'ha descrit fins al moment cap fàrmac amb capacitat antipsicòtica sense que bloquegi almenys parcialment els receptors D2), la presència d'aquests receptors a l'EPF no està prou clara. S'ha suggerit una moderada expressió del missatger i de la proteïna en totes les capes corticals i especialment a capa V en diferents tipus de perfils cel·lulars (Vincent *et al.*, 1993; Le Moine *et al.*, 1998). Semblaria, per tant, que les accions dels fàrmacs antipsicòtics a l'EPF poden ser importants per a la seva acció terapèutica però no podem descartar de cap manera la importància del bloqueig D2 en l'acció d'aquests fàrmacs sobretot a regions límbiques com el NAc.

D'altra banda, un altre neurotransmissor àmpliament implicat en l'esquizofrènia ha estat el glutamat. Inicialment es va postular un dèficit en la neurotransmissió glutamatèrgica degut als efectes induïts per antagonistes NMDA, però resultats recents indiquen una situació contrària (vegeu Introducció, apartat 1.2.3., i tot seguit

apartat 8). Aquests estats d'hipo o hiper-glutamatèrgia podrien correspondre a fases diferents de l'esquizofrènia.

2. Modulació del circuit EPF - NR per receptors monoaminèrgics

Els resultats obtinguts en els treballs 1, 2, 4 i 5 han posat de manifest que l'activació dels tres receptors excitadors, moduladors (5-HT_{2A} i α_1) i ionotròpic (AMPA), es tradueix en un increment de l'alliberació cortical de 5-HT per un mecanisme dependent d'impuls nerviós ja que l'efecte és revertit per la tetrodotoxina, que bloqueja els canals de sodi dependents de voltatge.

Aquest increment de l'alliberació de 5-HT a l'EPFm induït tant per l'administració local de l'agonista parcial 5-HT_{2A/2C} DOI com de l'agonista glutamatèrgic S-AMPA (treballs 1, 2 i 5) ja havia estat observat anteriorment en rata (Martín-Ruiz *et al.*, 2001). Per estudiar el paper dels receptors 5-HT_{1A} s'han utilitzat ratolins genoanul·lats (treball 1). Els resultats del treball 2 fan palesa la similitud dels efectes entre ambdues espècies, rata i ratolí. A més a més en els treballs 1 i 3 vam caracteritzar neuroquímicament i farmacològica, a l'EPFm i al NDR, els ratolins genoanul·lats dels receptors 5-HT_{1A}.

L'efecte del DOI s'interpreta com a resultat de l'activació de les vies excitadores descendents cap al NDR i el consegüent increment de l'activitat serotoninèrgica portant a un augment final d'alliberació de 5-HT a terminacions. Aquest fet està recolzat per estudis anteriors del grup on s'ha descrit un increment de la freqüència de descàrrega de les neurones piramidals a les zones corticals Cg1 i PL (àrees mostrejades per la sonda de microdiàlisi) després de l'administració sistèmica de DOI (Puig *et al.*, 2003) i un increment de la freqüència de descàrrega d'algunes neurones serotoninèrgiques al NDR després de l'aplicació local de DOI a l'EPFm (Martín-Ruiz *et al.*, 2001). Així mateix, l'increment de la neurotransmissió glutamatèrgica cortical mediada per receptors AMPA seguint diferents estratègies (aplicació exògena de l'agonista S-AMPA a l'EPFm, treballs 1, 2 i 5; desinhibició de les aferències excitadores talàmiques a l'EPFm, treball 5) incrementa la freqüència de descàrrega de les neurones piramidals i l'alliberació de 5-HT a terminacions corticals (Martín-Ruiz *et al.*, 2001; Puig *et al.*, 2003). Aquests resultats concorden amb l'increment de l'expressió de *c-fos*, gen d'activació primerenca sensible a

activitat elèctrica, a EPFm després de la desinhibició del tàlem mediodorsal amb bicuculina (Erdtsieck-Ernste *et al.*, 1995).

Ara bé, cal tenir present que les neurones piramidals de l' EPFm controlen l' activitat de les neurones 5-HT del NDR d' una manera complexa ja que a més d' una influència excitadora, se n' ha descrit una d' inhibidora mediada possiblement tant per les interneurons GABAèrgiques com pels autoreceptors 5-HT_{1A} (Celada *et al.*, 2001; Varga *et al.*, 2001; Jankowski i Sesack, 2004). Una possible explicació podria ser que les neurones piramidals de les regions més ventrals de l' EPFm (com la IL estudiada per Varga *et al.*, 2001) innervessin majoritàriament les interneurons GABAèrgiques enlloc de les neurones 5-HT del NDR. De fet, petites diferències regionals en el lloc d' estimulació farmacològica o elèctrica de l' EPFm produeixen una influència contrària en l' activitat de les neurones noradrenèrgiques del LC (Sara i Hervé-Melville, 1995; Jodo *et al.*, 1998).

De la mateixa manera, els resultats obtinguts en el treball 4 mostren que l' administració de cirazolina (agonista del receptor adrenèrgic α_1) a l' EPFm incrementa l' alliberament local de 5-HT per l' estimulació dels adrenoceptors α_1 localitzats possiblement a les neurones piramidals que projecten cap al NDR, mitjançant un mecanisme similar a l' observat prèviament per l' activació 5-HT_{2A}. Aquesta presumpció està recolzada principalment per un seguit d' analogies entre els dos receptors, 5-HT_{2A} i α_1 :

- Ambdós són excitadors i estan acoblats al mateix sistema de transducció de senyal (hidròlisi de fosfoinosítids i mobilització de Ca^{2+} a través de l' activació de proteïnes G_q i conseqüent activació de la fosfolipasa C).
- La seva activació despolaritza (Araneda i Andrade, 1991) i incrementa l' excitabilitat de les neurones piramidals de l' EPFm de rata (Marek i Aghajanian, 1999).
- Existeix una gran superposició en la distribució d' ambdós receptors en les zones PL i IL de l' EPFm de rata i ratolí (Pazos *et al.*, 1985; Palacios *et al.*, 1987; Pieribone *et al.*, 1994; Pompeiano *et al.*, 1994; Day *et al.*, 1997; López-Giménez *et al.*, 2002) que projecten al NDR (Hajós *et al.*, 1998; Peyron *et al.*, 1998) tot i que fins ara no hi ha evidències de coexpressió en neurones piramidals.

- En estudis de microdiàlisi de doble sonda (treball 4), s' observa un increment de l' alliberació de 5-HT al NDR induït per l' aplicació de cirazolina a l' EPFm.

3. Paper de la transmissió glutamatèrgica en els efectes excitadors de l' activació dels receptors 5-HT_{2A} i α_1 corticals

L' increment de l' alliberació de 5-HT produït per l' administració local de DOI i de cirazolina a l' EPFm es reverteix per un antagonista del receptor AMPA/KA (NBQX) i en canvi no per l' antagonista NMDA MK-801 (Martín-Ruiz *et al.*, 2001; treballs 2 i 4). De forma anàloga, la perfusió de S-AMPA mimetitza l' increment de l' alliberació de 5-HT induït per DOI i cirazolina (Martín-Ruiz *et al.*, 2001; treballs 1, 2, 4 i 5) mentre que la reducció de la transmissió glutamatèrgica mitjançant l' aplicació local de l' agonista dels receptors metabotròpics del glutamat (mGluR) II/III 1S,3S-ACPD reverteix aquest increment. No està clar però si aquest agonista mGluR actuaria de manera presinàptica inhibint l' alliberació de glutamat i/o postsinàpticament mitjançant l' activació de mGluR inhibidors. En qualsevol cas, aquestes observacions permeten concloure que aquest increment de l' alliberació de 5-HT induït per l' activació dels receptors corticals 5-HT_{2A} i α_1 depèn de la transmissió glutamatèrgica mediada per receptors AMPA a l' EPFm.

Aquests resultats concorden amb estudis previs realitzats *in vitro* en rodanxes d' EPFm que descriuen un increment de l' excitabilitat piramidal induït per 5-HT (5-HT_{2A}-depenent) i per NA, i una reversió d' aquest efecte per antagonistes AMPA i agonistes mGluRII (Aghajanian i Marek, 1997; Marek i Aghajanian, 1999). Ara bé, hi ha certa controvèrsia sobre el mecanisme implicat en la interacció existent entre l' activació d' aquests dos receptors monoaminèrgics excitadors i la transmissió glutamatèrgica, en particular sobre l' origen del glutamat i la localització dels receptors 5-HT_{2A}. Per una part, s' ha descrit que la 5-HT activaria receptors 5-HT_{2A} localitzats en aferències tàlamo-corticals a l' EPFm (presinàptics), alliberant glutamat i incrementant els EPSCs a les neurones piramidals mitjançant receptors AMPA (Marek i Aghajanian, 1998; Marek *et al.*, 2001). Per l' altra, la lesió del nucli MD del tàlem, que projecta a l' EPFm, no anul·la els efectes excitadors de l' activació 5-HT_{2A} per l' al·lucinogen DOI (increment de l' activitat piramidal i de l' alliberació de 5-HT cortical; Puig *et al.*, 2003). En aquest sentit, s' ha descrit que l' increment de l'

alliberació de 5-HT a l' EPFm induït per la desinhibició talàmica (increment de la transmissió glutamatèrgica endògena) és revertit per l' aplicació de l' agonista del receptor μ -opioide DAMGO (receptors presents en terminals talàmiques de l' escorça; Delfs *et al.*, 1994) a diferència de l' increment de l' alliberació de 5-HT induït per DOI que no és antagonitzat per DAMGO (Puig *et al.*, 2003). Aquestes observacions suggereixen que l' efecte del DOI té lloc per una acció directa sobre aquests receptors serotoninèrgics postsinàptics situats en neurones piramidals i que no depèn d' un increment de l' alliberació de glutamat d' aferències talàmiques. Aquesta darrera interpretació està recolzada per dades que indiquen que la despolarització induïda per 5-HT depèn de receptors 5-HT_{2A} en neurones piramidals (Béique *et al.*, 2003) i per l' aparent inexistència de receptors 5-HT_{2A} en axons glutamatèrgics a l' EPF (Miner *et al.*, 2003).

4. Accions locals vs. distals en la modulació de l' alliberament de 5-HT

Els receptors serotoninèrgics 5-HT_{2A} s' expressen densament a les neurones piramidals i en menor proporció a les interneurons GABAèrgiques (vegeu apartat 2.4.1.; Willins *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998; Jakab i Goldman-Rakic, 1998; Santana *et al.*, 2004). Tot i que els estudis de microdiàlisi no permeten distingir quina subpoblació és la responsable de l' acció del DOI sobre l' alliberament de 5-HT, la major proporció de receptors 5-HT_{2A} a neurones piramidals i l' acció global excitadora del DOI sobre la freqüència de descàrrega de les neurones piramidals *in vivo* (Puig *et al.*, 2003) indica que l' acció d' aquests receptors 5-HT_{2A} piramidals supera una possible acció en cèl·lules GABAèrgiques. Aquests receptors també s' han trobat en una tercera població molt més minoritària, a terminacions nervioses (Jakab i Goldman-Rakic, 1998; Miner *et al.*, 2003) però és força improbable que es tracti de terminals serotoninèrgiques ja que s' ha descrit que les neurones 5-HT no expressen els receptors 5-HT_{2A} (Pompeiano *et al.*, 1994; Fay i Kubin, 2000).

Pel que fa als receptors adrenèrgics α_1 no han estat descrits fins al moment en terminals i de fet, s' ha suggerit una localització somatodendrítica del receptor a causa de la bona correspondència entre la proteïna del receptor i l' ARNm (vegeu apartat 2.4.2.), excloent així una possible implicació de receptors α_1 presinàptics en terminacions 5-HT en l' efecte de la cirazolina.

De la mateixa manera, l'acció de l'agonista glutamatèrgic S-AMPA tindria lloc a través de receptors postsinàptics presents a l'escorça, és a dir, incrementant la sortida excitadora cortical, fet que activaria les neurones a les quals projecta, entre elles les neurones 5-HT del NDR amb el consegüent increment de l'alliberació de 5-HT a l'EPFm ja que les subunitats GluR (que formen els receptors AMPA) no semblen expressar-se en terminals axòniques (Petralia i Wenthold, 1992). Aquesta acció postsinàptica del S-AMPA està recolzada per l'anul·lació dels seus efectes *in vitro* per 8-OH-DPAT en neurones piramidals (Cai *et al.*, 2002).

Ara bé, no podem descartar del tot una possible acció presinàptica addicional en l'activació d'aquests tres receptors excitadors. Així, estudis d'alliberació han suggerit un possible efecte local (en terminacions) de l'activació del receptor AMPA ja que l'aplicació local de S-AMPA, a estriat i hipocamp, incrementa l'alliberació de 5-HT en aquestes regions (Ohta *et al.*, 1994; Whitton *et al.*, 1994; Maione *et al.*, 1997; Tao *et al.*, 1997). Recentment aquests treballs han estat recolzats per un estudi que ha descrit receptors AMPA a membranes presinàptiques en cultius cel·lulars (Schenk *et al.*, 2003). Així doncs, en el cas que hi haguessin receptors AMPA en axons serotoninèrgics *in vivo*, l'efecte de l'AMPA sobre l'alliberament de 5-HT cortical es podria explicar també per un efecte directe sobre terminals 5-HT, i l'acció del DOI, i per analogia de la cirazolina, d'incrementar l'activitat piramidal podria induir un augment de l'alliberament local de 5-HT a través de sinapsis axo-axòniques efectuades per col·laterals de les neurones piramidals a l'EPF. Aquest mecanisme podria ser comú a l'acció del DOI, la cirazolina, el S-AMPA i la desinhibició talàmica, atès que tots ells produeixen un augment de l'activitat de les neurones piramidals. Ara bé, aquest segon mecanisme de tipus local no exclouria el del circuit llarg EPF-rafe, per al qual s'han esmentat abans les evidències que recolzen la seva existència. En qualsevol cas, cal tenir també present que tal i com comentarem tot seguit l'efecte del DOI, de la cirazolina i de l'AMPA ha estat revertit per agents que actuen sobre receptors situats a neurones de l'EPF, és a dir, postsinàpticament.

5. Interacció receptor 5-HT_{1A} amb receptors 5-HT_{2A}, α_1 -adrenèrgics i AMPA

L'EPFm conté una gran abundància de receptors 5-HT_{1A} (Pompeiano *et al.*, 1992; Kia *et al.*, 1996a), que s'expressen majoritàriament en neurones piramidals i, en proporció molt inferior, en interneurons GABAèrgiques (Santana *et al.*, 2004). L'activació d'aquests receptors acoblats a canals de K⁺ en neurones piramidals és la responsable, en part, de les accions hiperpolaritzants i de la consegüent disminució de la freqüència de descàrrega induïdes per la 5-HT *in vitro* i *in vivo* (Araneda i Andrade, 1991; Ashby *et al.*, 1994, respectivament). Existeix una superposició en la distribució dels receptors 5-HT_{2A} i 5-HT_{1A} a l'EPF a nivell de proteïna i ARNm (Pazos i Palacios, 1985; Pazos *et al.*, 1985; Pompeiano *et al.*, 1992, 1994). Endemés, estudis d'electrofisiologia *in vitro* i *in vivo* suggereixen la colocalització dels receptors 5-HT_{1A} (hiperpolaritzants) i 5-HT_{2A} (despolaritzants) en les mateixes neurones piramidals (Araneda i Andrade, 1991; Ashby *et al.*, 1994). D'acord amb els resultats presentats al treball 1, aproximadament un 80% de les cèl·lules prefrontals (majoritàriament neurones piramidals) coexpressen els ARNm d'ambdós receptors.

Per tant, és d'esperar trobar una acció oposada d'aquests receptors 5-HT_{1A} inhibidors enfront de l'activació farmacològica dels receptors excitadors 5-HT_{2A}, α_1 -adrenèrgics i AMPA. I efectivament, l'increment de l'alliberació cortical de 5-HT originat per l'administració local de DOI, cirazolina i S-AMPA, ha estat revertit completament per la co-perfusió de diversos agonistes selectius, totals i parcials, del receptor 5-HT_{1A} a l'EPFm de rata i ratolí (treballs 1, 2 i 4), probablement per la hiperpolarització piramidal induïda per l'activació d'aquest receptor que contrarestarà un increment de l'excitabilitat piramidal, reduint així l'activitat del circuit EPFm-NR i per tant, l'alliberació de 5-HT a terminacions. Estudis previs del laboratori ja havien descrit aquesta interacció entre els receptors 5-HT_{2A} i 5-HT_{1A} (Martín-Ruiz *et al.*, 2001) i havien mostrat que l'aplicació local d'agonistes 5-HT_{1A}, BAY x 3702 i 8-OH-DPAT, a l'EPFm, redueixen l'alliberació local i distal (NDR) de 5-HT i la freqüència de descàrrega de les neurones 5-HT del NDR (Casanovas *et al.*, 1999; Celada *et al.*, 2001).

Aquesta acció inhibidora dels agonistes 5-HT_{1A} (treball 1) té lloc exclusivament a través de receptors 5-HT_{1A} ja que és comuna a cinc agonistes diferents, és revertida per la prèvia inactivació dels receptors 5-HT_{1A} (toxina pertússica i EEDQ) i per l'

aplicació de l' antagonista 5-HT_{1A} WAY-100635, i està totalment absent en ratolins genoanul·lats d' aquest receptor. Els resultats obtinguts en aquests ratolins verifiquen definitivament l' especificitat de les respostes farmacològiques originades per agonistes 5-HT_{1A}.

Les dues estratègies emprades en rata per tal d' inactivar els receptors 5-HT_{1A} corticals han resultat útils per atenuar o cancel·lar la resposta 5-HT_{1A}. La toxina pertússica ha estat usada *in vivo* per tal d' inactivar receptors 5-HT_{1A} pre- i postsinàptics (Andrade *et al.*, 1986; Innis i Aghajanian, 1987). Per la seva part, l' EEDQ ha estat també prèviament emprat amb la finalitat d' inactivar receptors 5-HT_{1A} i altres acoblats a proteïnes G *in vitro* (Gozlan *et al.*, 1994). Ara bé, el disseny experimental (protecció local selectiva dels receptors 5-HT_{2A} per ritanserina) ha estat realitzat per primera vegada *in vivo* en el treball 1 i ha permès la preservació de l' efecte local del DOI mentre la resposta del BAY x 3702 ha estat totalment anul·lada. Contràriament, la protecció local dels receptors 5-HT_{1A} per WAY-100635 durant l' administració de l' EEDQ ha conservat l' efecte inhibidor del BAY i per tant, ha recolzat que la seva acció és 5-HT_{1A} dependent.

La reversió per l' activació 5-HT_{1A} de l' efecte del DOI, cirazolina i S-AMPA ha d' implicar forçosament els receptors 5-HT_{1A} postsinàptics, ja que aquests no estan presents en terminacions axòniques (Azmitia *et al.*, 1996; Riad *et al.*, 2000). Així mateix, els resultats obtinguts també estan d' acord amb que la capacitat de la 8-OH-DPAT de suprimir la freqüència de descàrrega de les cèl·lules 5-HT està reduïda a l' extreure l' EPFm i al realitzar una transecció cortical (Ceci *et al.*, 1994; Hajós *et al.*, 1999). També WAY local a EPFm reverteix l' efecte de la 8-OH-DPAT sobre l' alliberació de 5-HT al NDR i a l' EPFm (Celada *et al.*, 2001).

Els resultats neuroquímics (treball 1) es relacionen amb dades d' electrofisiologia que mostren respostes bifàsiques en neurones piramidals de l' EPFm de rata després de l' estimulació elèctrica del NDR i NMR. Probablement aquestes respostes reflecteixen efectes contraris en l' excitabilitat de les neurones piramidals que coexpressen els receptors 5-HT_{2A} i 5-HT_{1A}. I també s' han vist respostes oposades (inhibicions 5-HT_{1A}-dependents i excitacions 5-HT_{2A}-dependents) en la mateixa neurona piramidal induïdes per l' estimulació consecutiva dels nuclis del rafe a diferents coordenades, suggerint d' aquesta manera una connectivitat precisa entre

subgrups neuronals 5-HTèrgics i ambdós receptors de 5-HT presents a neurones piramidals (treball 1).

6. Antagonisme funcional entre els receptors 5-HT_{2A}, α_1 i AMPA

Els treballs 1, 2, 4 i 5, i d' altres previs del nostre grup han permès construir un model del circuit EPFm-NDR (figura 14).

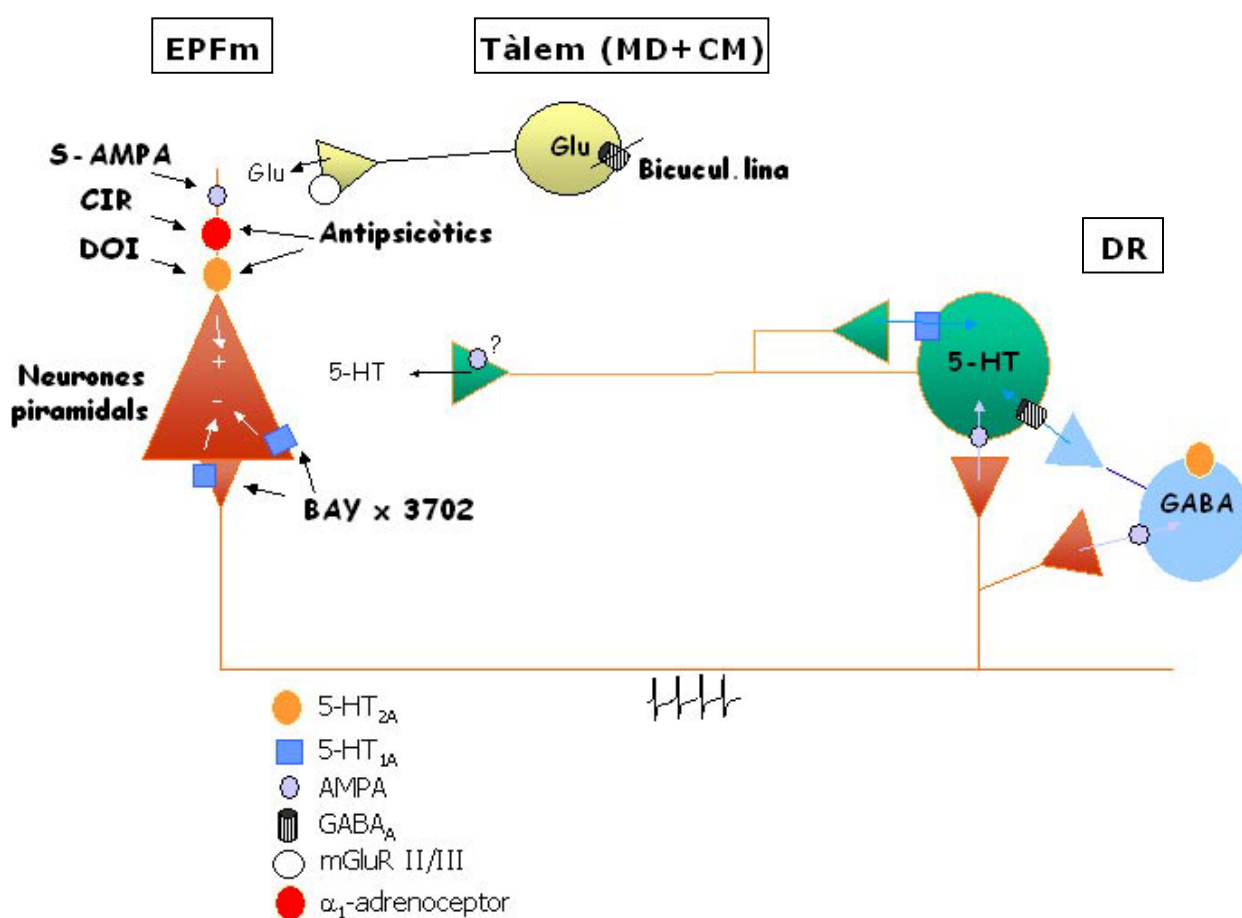


Figura 14. Representació esquemàtica de les interaccions entre l' EPFm i les neurones serotoninèrgiques del mesencèfal, amb alguns dels receptors i neurotransmissors implicats.

Les neurones piramidals expressen receptors 5-HT_{2A}, AMPA i possiblement α_1 -adrenèrgics l' activació dels quals incrementa llur excitabilitat i/o freqüència de descàrrega. Estudis anatòmics i funcionals indiquen l' existència d' una marcada connectivitat recíproca entre l' EPFm i els NR. L' activació selectiva dels receptors 5-HT_{2A} i α_1 a l' EPFm per l' aplicació local d' agonistes (DOI i cirazolina-CIR-,

respectivament) i dels receptors AMPA per l'aplicació de l'agonista S-AMPA o per la desinhibició de les aferències talàmiques, incrementa l'alliberació local de 5-HT (Martín-Ruiz *et al.*, 2001; Puig *et al.*, 2003; treballs 1, 2, 4 i 5), mentre que la dels receptors 5-HT_{1A} pel BAY x 3702 disminueix l'alliberació local de 5-HT i contraresta l'efecte d'incrementar la 5-HT de DOI, cirazolina i AMPA (Casanovas *et al.*, 1999; Celada *et al.*, 2001; Martín-Ruiz *et al.*, 2001; treballs 1, 2, 4 i 5). Els receptors 5-HT_{1A} es localitzen a la regió somatodendrítica de les neurones piramidals corticals i també al con axonal (Kia *et al.*, 1996; De Felipe *et al.*, 2001; Czyrak *et al.*, 2003). Els canvis en l'alliberació de 5-HT estan probablement mediat per la modulació de l'activitat de les neurones piramidals de l'EPFm, PL i IL, que projecten densament al NDR (Hajós *et al.*, 1998; Peyron *et al.*, 1998), i controlen l'activitat de les neurones 5-HTèrgiques i de les interneurons GABAèrgiques (Celada *et al.*, 2001; Varga *et al.*, 2001) dels NR. Els efectes de l'activació d'aquests tres receptors excitadors 5-HT_{2A}, AMPA i α_1 -adrenèrgics són revertits indistintament pel bloqueig de qualsevol dels receptors (M100907, NBQX i prazosin, respectivament). L'eliminació del to d'un dels receptors pel seu antagonista respectiu seria suficient per a reduir l'activitat piramidal i la sortida cortical excitadora descendent cap a les neurones 5-HTèrgiques. Aquest antagonisme recíproc també s'observa en estudis de comportament on les sacsejades de cap (*head twitches*) induïdes pel DOI en rosegadors s'eliminen per prazosin, agonistes 5-HT_{1A}, antagonistes 5-HT_{2A/2C} i antipsicòtics clàssics (Schreiber *et al.*, 1995; Dursun i Handley, 1996). De tota manera, no podem saber amb certesa si M100907 i prazosin actuen com antagonistes purs *in vivo* ja que s'ha descrit el prazosin com un agonista invers en sistemes cel·lulars artificials (Zhu *et al.*, 2000; Hein *et al.*, 2001).

Aquests resultats suggereixen que les neurones piramidals tenen un paper integrador de varietat de senyals i que les interaccions entre fàrmacs i la conseqüent sortida d'informació cortical són un balanç a nivell cel·lular (piramidal) i no receptorial. Així, els antipsicòtics contrarestarien també l'increment de l'activitat de les neurones piramidals per un bloqueig α_1 -adrenèrgic (clàssics) i α_1 -adrenèrgic més 5-HT_{2A} (atípics), reduint l'activitat d'aquestes neurones i per tant, l'increment de l'alliberació de 5-HT induït per l'activació dels receptors 5-HT_{2A}, AMPA i α_1 -adrenèrgics en neurones de projecció de l'EPFm.

7. Acció dels fàrmacs antipsicòtics en models d'estimulació de receptors excitadors

Els fàrmacs antipsicòtics tenen un perfil farmacològic complex ja que presenten afinitat per diferents receptors monoaminèrgics (taula 1). Tots els antipsicòtics, tant típics (haloperidol i clorpromacina) com atípics (clozapina i olanzapina), emprats en els treballs 2, 4, 5 i 6 tenen en comú una elevada afinitat *in vitro* pels receptors α_1 -adrenèrgics (nM), mentre que només els atípics posseeixen una alta afinitat pels receptors serotoninèrgics 5-HT_{2A} i actuen com antagonistes d' ambdós receptors (Arnt i Skarsfeldt, 1998; Bymaster *et al.*, 1999; Meltzer *et al.*, 1999; Sebban *et al.*, 1999). L' administració local a l' EPFm de qualsevol dels quatre antipsicòtics haloperidol, clorpromacina, clozapina i olanzapina contraresta l' increment de l' alliberació de 5-HT produït per l' agonista 5-HT_{2A/2C} DOI (treball 2), per l' agonista α_1 -adrenèrgic cirazolina (treball 4) i per l' increment de la neurotransmissió glutamatèrgica (perfusió de l' agonista S-AMPA i desinhibició talàmica; treball 5). Tenint en compte que tant l' antagonista selectiu α_1 -adrenèrgic, prazosin, com l' antagonista selectiu dels receptors 5-HT_{2A}, M100907, reverteixen l' increment de l' alliberació de 5-HT a l' EPFm induït per l' activació 5-HT_{2A} (Martín-Ruiz *et al.*, 2001; treballs 1, 2 i 4), per l' activació α_1 -adrenèrgica (treball 4) i, per l' activació glutamatèrgica AMPA (treball 5); i les afinitats relatives d' aquests quatre antipsicòtics, podríem concloure que l' efecte dels antipsicòtics atípics seria degut a la seva capacitat de bloquejar els receptors 5-HT_{2A} i els α_1 -adrenèrgics *in vivo*, mentre que en l' efecte dels clàssics hi participaria el bloqueig α_1 -adrenèrgic. De tota manera no podem excloure completament un possible efecte addicional de l' haloperidol i de la clorpromacina sobre els receptors 5-HT_{2A} a causa de la seva moderada afinitat per aquest receptor.

Així mateix, la perfusió local de M100907, prazosin i dels antipsicòtics a l' EPFm (a diferència de la de NBQX) també redueix l' alliberació de 5-HT fet que recolzaria l' existència d' un possible control tònic sobre l' alliberació basal de 5-HT pels receptors 5-HT_{2A} i els α_1 -adrenèrgics corticals però no pels AMPA (els receptors α_1 -adrenèrgics als NR també controlen tònicament l' activitat de les neurones serotoninèrgiques i la seva alliberació local i en terminacions; Baraban i Aghajanian, 1980; Rouquier *et al.*, 1994; Adell i Artigas, 1999; Bortolozzi i Artigas, 2003).

Recentment ha sorgit un gran interès pel paper dels receptors 5-HT_{1A} en l' activitat dels antipsicòtics atípics ja que algun d' ells, com la ziprasidona o l' aripiprazol, mostren una afinitat elevada per aquest receptor actuant d' agonistes parcials, mentre que d' altres que no presenten alta afinitat, com la risperidona o la pròpia clozapina, actuen de fet com agonistes indirectes del receptor a través de mecanismes encara mal coneguts (Millan, 2000; Ichikawa *et al.*, 2001; Chou *et al.*, 2003).

Les neurones piramidals prefrontals expressen abundantment els receptors 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A} i α_1 -adrenèrgics (pels quals els antipsicòtics tenen una elevada afinitat), fet que indicaria que aquestes neurones són dianes cel·lulars comuns per l' acció dels fàrmacs antipsicòtics. En el treball 5, s' ha administrat prazosin, M100907 i els antipsicòtics clàssics i atípics tant de manera local com sistèmica i s' ha observat en totes dues vies d' administració una reversió de l' efecte de l' activació dels receptors AMPA d' igual magnitud, fet que posaria de manifest la importància de l' EPF en el mecanisme d' acció dels antipsicòtics. Aquest conjunt de resultats recolzen el paper fonamental del lòbul frontal en la fisiopatologia i tractament de l' esquizofrènia (per revisió vegeu Weinberger *et al.*, 1994; Arnt i Skarsfeldt, 1998; Lidow *et al.*, 1998; Lewis i Lieberman, 2000).

Cal destacar que aquestes tres propietats dels antipsicòtics (bloqueig del receptor 5-HT_{2A} i/o α_1 -adrenèrgic, activació del receptor 5-HT_{1A}) convergeixen en el mateix efecte a l' EPFm, en una reducció de l' alliberació de 5-HT que, probablement, tindria lloc de manera paral·lela a un canvi en l' activitat de les neurones piramidals. Aquests resultats suggereixen per tant, que a més de la seva acció antidopaminèrgica que molt possiblement té lloc a nivell de NAc, els antipsicòtics exercirien parcialment els seus efectes terapèutics disminuint l' activitat/l' excitabilitat de les neurones piramidals que projecten cap al mesencèfal a través de qualsevol d' aquests mecanismes. En aquest sentit, estudis realitzats recentment en models animals han suggerit un possible paper terapèutic del bloqueig adrenèrgic α_1 (prazosin) potenciant l' efecte tipus antipsicòtic de l' antagonista dels receptors dopaminèrgics D_{2/3} raclopride (Wadenberg *et al.*, 2000). S' ha mencionat també que antagonistes AMPA i agonistes de receptors metabotròpics del glutamat del grup II, és a dir, fàrmacs que disminueixen l' alliberació de glutamat, són fàrmacs efectius en models animals de psicosi (Moghaddam *et al.*, 1997; Meltzer, 2002; Krystal *et al.*,

2003). Aquestes observacions corroboren els nostres resultats obtinguts en el treball 5 on els antipsicòtics reverteixen un increment de l' alliberació de 5-HT induït per un augment de la transmissió glutamatèrgica, possiblement mitjançant una disminució de l' alliberació de glutamat relacionat amb una reducció de l' activitat de la neurona piramidal.

D' altra banda, la perfusió a l' EPFm de l' antagonista selectiu dels receptors dopaminèrgics D_2/D_3 raclopride només reverteix parcialment l' increment de l' alliberació local de 5-HT induït per l' increment de la transmissió glutamatèrgica mentre que la seva administració sistèmica no és capaç de contrarestar aquest increment (treball 5). Aquestes dades juntament amb la presència minoritària dels receptors D_2 a l' EPFm semblarien indicar una menor participació d' aquests receptors corticals en l' efecte dels antipsicòtics.

La perfusió cortical de l' antidepressiu reboxetina (inhibidor selectiu de la recaptació de NA) o de l' ansiolític diazepam (modulador al·lostèric del receptor $GABA_A$) no és capaç de revertir l' increment de l' alliberació de 5-HT induït per l' activació dels receptors AMPA a l' EPFm (treball 5). Aquestes dades suggereixen que la capacitat dels antipsicòtics de disminuir l' alliberació de 5-HT a l' EPFm, i en darrera instància de reduir l' activitat de les neurones piramidals, podria ser un tret diferencial del mecanisme d' acció d' aquests fàrmacs.

8. Model animal d' esquizofrènia: antagonisme NMDA. Efecte d' antipsicòtics.

Els antagonistes NMDA no competitius són drogues psicotomimètiques que indueixen símptomes psicòtics, negatius i cognitius en individus sans, exacerben les manifestacions ja existents en malalts esquizofrènics i la seva administració en animals s' utilitza com a model farmacològic d' esquizofrènia (vegeu Introducció, apartat 1.2.3.).

Les primeres hipòtesis de la malaltia van postular una hipoactivitat glutamatèrgica ja que els antagonistes NMDA (hipofunció a nivell d' aquest receptor) originaven tota aquesta simptomatologia pròpia de l' esquizofrènia. Estudis recents, però, han posat de manifest una hiperactivitat dels sistemes glutamatèrgic i dopaminèrgic corticals i subcorticals després de l' administració aguda d' aquestes drogues (Moghaddam *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 1997; Svensson *et al.*, 1998; Moghaddam i Adams, 1998; Mathé

et al., 1999). Aquestes observacions han estat recolzades per estudis d'electrofisiologia que han mostrat un increment de l'activitat de les neurones piramidals glutamatèrgiques de l'EPF després de l'administració d'antagonistes NMDA (figura 15; Suzuki *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2004), increment relacionat amb el desenvolupament d'anomalies de comportament com hiperlocomoció i l'aparició d'estereotípies. Treballs en pacients esquizofrènics que mostren un increment de l'expressió de la subunitat NR-2 del receptor NMDA i en l'activitat de l'enzim que sintetitza glutamat (glutamina fosfat activada) recolzen també un possible augment de la funció glutamatèrgica en l'esquizofrènia (Haroutunian *et al.*, 2003). Per altra part, MK-801 sistèmic incrementa l'expressió de *c-fos* a escorça cingulada posterior de ratolí (O' Neill *et al.*, 1998).

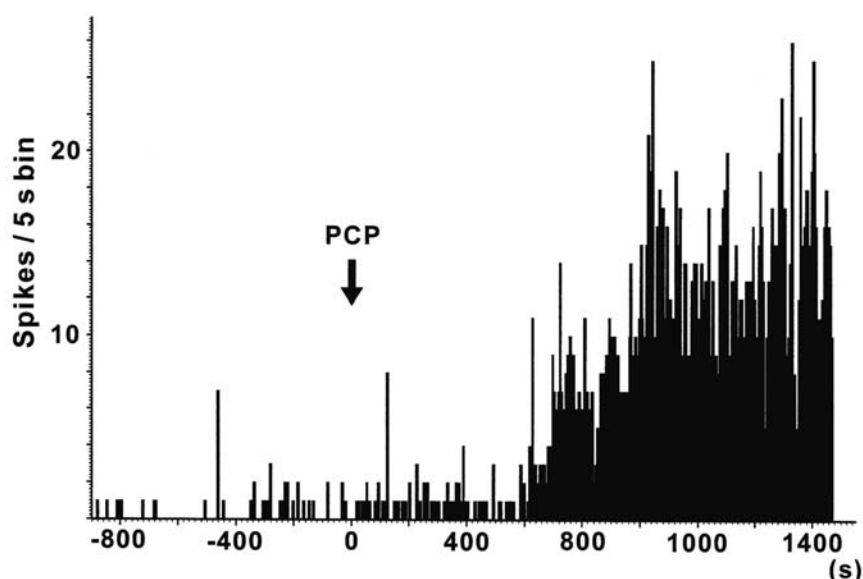


Figura 15. Resposta excitadora d'una neurona de l'EPFm a l'administració sistèmica de PCP en rata anestesiada (Suzuki *et al.*, 2002).

El paper del sistema serotoninèrgic en aquest model animal d'esquizofrènia és força desconegut. Per això, en la present tesi hem estudiat els efectes dels antagonistes NMDA sobre l'alliberació cortical de 5-HT. Els resultats obtinguts en el treball 6 evidencien que l'administració sistèmica de PCP, MK-801 i ketamina (antagonistes NMDA no competitiu) incrementa l'alliberació d'aquest neurotransmissor a l'EPFm, coincidint amb estudis previs realitzats amb PCP (Martin *et al.*, 1998; Millan *et al.*, 1999).

Cal destacar que l'increment de l'activitat de la neurona piramidal per diferents mecanismes farmacològics (antagonisme NMDA, activació receptors 5-HT_{2A}) o fisiològics (desinhibició talàmica) es tradueix en tots els casos en un increment de l'alliberació cortical de 5-HT (treballs 1, 2, 4, 5 i 6) i per tant recolza l'utilització de l'alliberació de 5-HT com a mesura indirecta de l'activitat piramidal com hem esmentat prèviament.

Ara bé, a diferència de l'augment d'activitat descrit per l'administració sistèmica, s'ha observat de manera interessant que els antagonistes NMDA per via local no incrementen els EPSCs en rodanxes d'EPFm (Aghajanian i Marek, 2000) ni tampoc produeixen canvis en la freqüència de descàrrega de les neurones piramidals de l'EPFm en rates anestesiades (Suzuki *et al.*, 2002; Jodo *et al.*, en premsa). Aquestes observacions coincideixen completament amb els nostres resultats (treball 6) on l'administració a l'EPFm de diferents concentracions d'antagonistes NMDA com MK-801, PCP i ketamina no alteren l'alliberació local de 5-HT. D'aquesta manera s'ha postulat que la PCP i els altres antagonistes NMDA podrien activar de manera indirecta, mitjançant una desinhibició o altres mecanismes, un grup de neurones glutamatèrgiques de projecció situades fora de l'EPFm. Dins de les possibles projeccions implicades en l'efecte dels antagonistes NMDA distingim les originades en el nucli MD del tàlem (MD), a l'amígdala basolateral, i a VCA1 i SV. En concret, VCA1 presenta una densa projecció glutamatèrgica cap a l'EPFm (Jay *et al.*, 1992). Les neurones piramidals de l'hipocamp podrien ser desinhibides mitjançant el bloqueig de receptors NMDA a interneurons GABAèrgiques, tot augmentant així l'activitat de vies excitadores hipocamp-EPF (Grunze *et al.*, 1996; Greene, 2001). Aquestes observacions juntament amb l'evidència que l'aplicació local de PCP o MK-801 a VCA1 incrementa la freqüència de descàrrega de les neurones piramidals de l'EPFm suggereixen que els antagonistes NMDA actuarien sobre receptors NMDA situats en neurones GABAèrgiques de l'hipocamp, desinhibint així les neurones piramidals que projecten a l'EPFm (Jodo *et al.*, en premsa). Ara bé, una altra possibilitat sobre el mecanisme implicat, podria ser que PCP i MK-801 antagonitzin els receptors NMDA de les neurones piramidals hipocampals que projectin, enlloc de a neurones piramidals corticals, a interneurons de l'EPFm (Tierney *et al.*, 2004) i produeixin finalment un increment de l'activitat piramidal a l'EPFm.

L' increment de l' alliberació cortical de 5-HT induït per antagonistes NMDA a l' igual que succeïa per l' estimulació de receptors monoaminèrgics excitadors sembla depenent de glutamat ja que els efectes cognitius i comportamentals de la ketamina són atenuats per antagonistes AMPA/kainat i per l' agonista mGluR del grup II, LY 354740, aquest darrer també bloqueja l' alliberament excessiu de glutamat produït per l' administració sistèmica antagonistes NMDA (Moghaddam i Adams, 1998; taula 4).

Aquest increment de l' alliberació cortical de 5-HT induït per l' administració sistèmica dels antagonistes NMDA (PCP, MK-801 i ketamina) ha estat completament bloquejat pel pretractament amb l' antagonista selectiu dels receptors α_1 -adrenèrgics prazosin (treball 6). Així mateix, hem observat una reversió de l' efecte de la PCP sobre l' alliberació cortical de 5-HT per l' antagonista 5-HT_{2A/2C} ritanserina. Aquests resultats tenen un paral·lelisme amb altres estudis de comportament i neuroquímics (taula 4). I de la mateixa manera, NRA0045 (antagonista D₄, 5-HT_{2A} i α_1) però no l' antagonista D₄ NRA0160 atenua els efectes d' hiperlocomoció i d' increment de l' alliberació de glutamat a l' EPFm induïts per PCP (Abekawa *et al.*, 2003). Aquest conjunt de resultats posen de manifest la implicació dels receptors adrenèrgics α_1 i serotoninèrgics 5-HT_{2A} (receptors pels quals els antipsicòtics atípics tenen una elevada afinitat) en la reversió dels efectes induïts pels antagonistes NMDA.

D' altra banda, els resultats del treball 6 evidencien que el pretractament amb l' antipsicòtic típic haloperidol no es capaç de bloquejar l' increment de l' alliberació de 5-HT a l' EPFm induït per PCP o ketamina però en canvi l' administració sistèmica prèvia de l' antipsicòtic atípic clozapina sí és capaç de bloquejar aquests efectes. Aquestes diferències podrien ser causades per la major afinitat de la clozapina pels receptors serotoninèrgics 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, histaminèrgics H1 i muscarínics. Els nostres resultats són comparables amb treballs descrits en la literatura referents a la interacció antagonistes NMDA-antipsicòtics (taula 4). En aquest sentit, estudis de comportament han descrit que els efectes de la PCP i compostos anàlegs, en gran part, no estan originats per un increment de la transmissió dopaminèrgica i per tant no són bloquejats pels antipsicòtics típics o clàssics en estudis bàsics i clínics (Keith *et al.*, 1991; Krystal *et al.*, 1995; Chartoff *et al.*, 2005; taula 4). De manera semblant, en voluntaris sans els efectes psicotomimètics de la ketamina no són bloquejats pels antipsicòtics clàssics però es redueixen de manera significativa per l' antipsicòtic

atípic clozapina (Malhotra *et al.*, 1997). Ara bé també s' ha descrit que l' administració sistèmica de PCP produeix hiperactivitat i estereotípies en rates i ratolins semblant a les induïdes per amfetamina (Haggerty *et al.*, 1984; Suzuki *et al.*, 2002) i bloquejades tant per antagonistes D₂ com per clozapina (Ögren i Goldstein, 1994; Abekawa *et al.*, 2003).

D' aquesta manera, el fet que l' haloperidol reverteixi els efectes del S-AMPA i de la desinhibició talàmica sobre l' alliberació de 5-HT (treball 5) però en canvi no en el model d' antagonisme NMDA (treball 6) podria ser degut a una activació diferencial de poblacions de receptors glutamatèrgics ionotròpics. L' increment en l' alliberació de glutamat induït per antagonistes NMDA (vegeu Introducció, apartat 1.2.3.) actuaria a nivell de receptors AMPA/KA mentre que el suposat increment glutamatèrgic induït per S-AMPA i desinhibició del tàlem es traduiria en una estimulació de tots els receptors glutamatèrgics.

Tot i que alguns dels antipsicòtics atípics, com per exemple la clozapina, incrementen l' expressió del receptor NMDA i desplacen el MK-801 en cultius d' estriat, fet que podria explicar la seva capacitat de revertir els efectes induïts pels antagonistes NMDA (Lidsky *et al.*, 1993; Goff i Coyle, 2001), pensem que el seu efecte tindria lloc a través d' una disminució de l' activitat de les neurones piramidals de l' EPFm.

	Hiperlo-comoció	Dèficit PPI	Aïllament social	Dèficit cognitiu	Increment c-fos	Increment DA/Glu	Sacsejades de cap
AT	+++	0	0	0		0	
AAT	+++	+++	++	+		0	
Prazosin	++	+++				+++	
Antagonista 5-HT_{2A}	+++	+++		+++	+++	+++	+++
Antagonista selectiu D₂	0	0	0	+*			
Antagonista AMPA/KA	++			+++*		++	
Agonista mGluRII	+++			+++		+++	

Taula 4. Resum de les reversions dels efectes induïts per l' administració sistèmica d' antagonistes NMDA (PCP, MK-801 o ketamina) per diferents drogues en models animals (* en humans; Yamaguchi *et al.*, 1987; Thompson *et al.*, 1987; Butelman, 1989; Corbett *et al.*, 1995; Krystal *et al.*, 1995; Varty i Higgins, 1995; Carlsson, 1995; Maurel-Remy *et al.*, 1995; Mathé *et al.*, 1996; Sams-Dodd, 1996; Verma i Moghaddam, 1996; Bakshi i Geyer, 1997; Moghaddam *et al.*, 1997; Swerdlow i Geyer, 1998; Bakshi i Geyer, 1999; Geyer *et al.*, 1999; Millan *et al.*, 1999; Geyer *et al.*, 2001; Habara *et al.*, 2001; Adams i Moghaddam, 2001; Higgins *et al.*, 2003). El dèficit de la PPI i cognitiu, i l' aïllament social induïts per antagonistes NMDA podrien ser un model vàlid per a identificar compostos amb un potencial antipsicòtic atípic.