



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**IDIBAPS**



*cibersam*

Centro de Investigación Biomédica En Red  
de Salud Mental

**EFFECTOS DE LOS ANTAGONISTAS NMDA SOBRE LA  
NEUROTRANSMISIÓN SEROTONÉRGICA Y  
GLUTAMATÉRGICA EN LA CORTEZA PREFRONTAL.  
MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS  
ANTIPSICÓTICOS.**

Tesis Doctoral presentada por  
**Javier López Gil**  
Barcelona, mayo de 2009



TRABAJO PRESENTADO PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR LA  
UNIVERSIDAD DE BARCELONA, PROGRAMA DE DOCTORADO DE  
NEUROCIENCIAS (Departament de Biologia Cel·lular, Immunologia i  
Neurociències)

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

Los directores:

Dr. Albert Adell Calduch  
Investigador Científico del CSIC

Dr. Francesc Artigas Pérez  
Profesor de investigación del CSIC

Javier López Gil  
Barcelona, mayo de 2009



El presente trabajo ha estado financiado con los siguientes proyectos:

SAF2004-05525: Ministerio de Educación y Ciencia

SAF 2007-62378: Ministerio de Educación y Ciencia

PI070111: Ministerio de Sanidad y consumo

SGR2005/00758: Generalitat de Catalunya

Y se ha realizado con las siguientes ayudas:

- CONTRATO CON LA FUNDACIÓ PRIVADA CLÍNIC PER A LA RECERCA BIOMÉDICA (enero 2009)
- CONTRATO EN PRÁCTICAS CON EL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (junio 2007 - diciembre 2008)
- BECA PREDOCTORAL I3P DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC) (junio 2005 - mayo 2007)
- BECA PREDOCTORAL IDIBAPS (enero 2005 - mayo 2005)



*A mis padres*  
*A la memoria de mis abuelos*





## *Agradecimientos*

Como me han hecho constar mientras escribía la tesis, esta es la parte que probablemente más gente se lea, ¡así que tendré que dedicarle su debida atención!. A lo largo de este camino he tenido la inmensa suerte de coincidir con mucha gente que me ha apoyado y animado a continuar adelante y de la que he tenido la oportunidad de aprender algo más sobre la vida. Son muchos nombres para agradecer en apenas unas pocas líneas cuando realmente se merecerían mucho más y, como seguro que me olvido de alguien en estas páginas, tan solo decir que os llevo a todos en los buenos recuerdos que de esta etapa me guardo!.

Lo primero, mil gracias a mis directores de tesis, Albert y Paco. Albert, m'has ensenyat el més important que hi ha a la ciència: aprendre a fer les preguntes i a entendre les respostes. Gràcies per la teva paciència, per confiar desde sempre en mi i per la forma com m'has guiat, parlant i discutint cada petit pas que hem fet. He tingut molta sort de poder treballar amb tú aquests anys i de poder aprendre tantíssim, de la ciència i de la vida, en les nostres interminables converses!.

Paco, sempre t'estaré agraït per acollir-me en aquesta gran familia que és el laboratori. Gràcies per ensenyar-me que no tot en aquest treball són experiments sino que, si existeix alguna cosa millor que els coneixements, és poder compartir-los amb els demés. Gràcies per compartir tot el que saps de ciència, pel teu gran valor científic i per l'ambició per millorar i arribar cada día una mica més lluny!.

Analía, gracias por tu entusiasmo, tu energía ilimitada, por tu contagiosa pasión por la ciencia. Has sido una persona importantísima a lo largo de estos años, con tu siempre presente apoyo, tus consejos, y con esos geniales ánimos que te hacen avanzar cuando el camino es cuesta arriba. Muchas gracias por tu grandísima calidez humana!.

Leti, cuantas batallas hemos compartido en el HPLC!. Cuantas agradables conversaciones en esa pequeña sala llena de ruiditos!. Siempre dispuesta a escuchar, muchísimas gracias por el consuelo en los momentos difíciles y por las alegrías en las buenas rachas, gracias por tener siempre una frase amable para los demás.

Pau, gràcies pel teu esperit crític, per buscar sempre la forma de millorar un experiment i per fer-me pensar en quina és la següent pregunta per resoldre!.

Anna, és impressionant la teva qualitat científica, la teva força i constància i la teva capacitat d'obrir camí! Moltes gràcies per estar sempre disponible per donar-me un cop de mà!

Muchas gracias Lupe y Roser por las risas y el gran ambiente en los congresos y por las conversaciones en el pasillo. Gracias a Cristina, Emili, Teresa, Pep, a todos los "seniors" del departamento, por esos fantásticos recuerdos en las míticas excursiones de neuroquímica y por hacer que este departamento sea como una gran familia!. A Edu y Julio, por su gran ayuda informática. A los compañeros de las juntas, que me han enseñado cómo funciona esto por dentro. A Montse Roig, por su increíble eficiencia

que de tantos apuros me ha sacado, por su paciencia conmigo y por su hospitalidad y amabilidad.

Gracias a los antiguos compañeros, que me acogieron cuando llegué: Daniel, Iolanda, sempre tan amable; Mercè A., de qui he heretat la línia de treball i un troçet d'escriptori!; Zoila, que em va ensenyar l'art de la cromatografia del glutamat! Llorenç, qué divertit va ser coincidir al lab! Quins riures, moltes gràcies per la teva hospitalitat a New York!. Ceci, cuantas risas el poquito tiempo que hemos coincidido, pero cuanto aprendí!. A Mónica, por su hospitalidad y desenfado. Judith, sempre tan treballadora, de qui vaig aprende els secrets de les sondes de diàlisis, moltes gràcies per acollir-me i per la teva espontaneïtat i energia!.

Mercè, gràcies per tot!. Ets una companya fantàstica, hem compartit moltes coses en el lab, moments bons i dolents, i sempre ens hem recolzat. Què bé que ens ho hem passat quan hem coincidit operant i què agradable anar a dinar junts cada dia (tot i que a vegades et faci passar gana!!). Gràcies per escoltar-me, per ajudar-me, per totes les converses al costat d'un cafè, per preocupar-te per mi i per intentar animar-me sempre. I sobretot, moltes gràcies per la teva gran amistat!.

Laia, sempre tant optimista i tant positiva, què divertit va ser passejar per Washington i New York! Gràcies per tenir sempre un moment per fer un riure, per fer ganyotes, per la teva contagiosa alegria, per la teva complicitat i gran sinceritat i per la teva espontaneïtat! Aquests anys no haguessin sigut el mateix sense els nostres "wiiiiiii!". No canviïs mai!!.

Pablo, muchísimas gracias por apoyarme siempre, por la gran alianza que tenemos!. Cuantas charlas y risas y cuanta filosofía que nos hemos echado! Por las partidas de rol y los riquísimos asados argentinos!. Gracias por tener siempre un momento para aguantar estoicamente mis ralladas mentales!.

Moltes gràcies, Silvia, per la teva gran amistat i sinceritat. Ha estat una gran sort tenir-te aprop, amb les converses al passadís o a histologia compartint rallades i paranoies vàries. Gràcies per recolzar-me sempre (fins i tot quan opinem diferent!), per escoltar-me, pels teus consells, per la teva honestedat i confiança i pel teu genial sentit de l'humor, capaç de treure un riure dels dies més foscos!. Sé que sempre podré comptar amb tú!

Noe, qué de risas! Qué agradable tu humor y familiaridad, qué grandes partidas a billar! Y qué decir de las poesías recitadas con entusiasmo! Si alguna vez dos fueron uno... jejeje. Muchísimas gracias por tu siempre presente cariño, pues a veces, un simple abrazo puede valer más que todas las palabras de consuelo!.

Lucila, compañera de tesis y de "trasnochar" en el laboratorio, gracias por siempre estar ahí cada vez que he necesitado un consejo, por tu amabilidad y tu gran bondad y tu reconfortante capacidad de escuchar a los demás. Ha sido un placer coincidir en esta tesis!

Vero, muchísimas gracias por todo! Por ayudarme y apoyarme tantísimo, tanto dentro como fuera del trabajo, por esa capacidad de decir siempre la verdad tal y como es y por tu generosidad!. Nos lo hemos pasado genial con nuestras "frikadas", qué divertida y agradable es siempre tu complicidad! Gracias por toda tu fuerza y tu sentido práctico para solucionar cualquier problema haciéndolo parecer fácil!.

Noemí, muchas gracias por tu tan contagiosa risa, por tu buenísimo sentido del humor (cuantas risas diarias!!!), por ser tan detallista y atenta y por tu gran corazón. Gracias por estar siempre dispuesta a echar una mano y ayudar a los demás y por ese arte haciendo scrapbooking (sí, lo dije bien!).

Muchas gracias, Eva y Tamara, por vuestra amabilidad, vuestro cariño y generosidad. El mundo necesita más gente buena! Merci por soportarme y responderme siempre con palabras amables!.

Me gustaría también darles las gracias al resto de compañeros de fuera de nuestro laboratorio. A Mireia, sempre amb una paraula amable, sempre amb aquella serenitat i seny, merci per tots els ànims que m'has donat! A Eli, amb qui he pogut gaudir d'unes divertidíssimes classes d'anglès, moltes gràcies pel teu humor i pels teus consells. A Anna Serra, genial companya de sopars (què divertida complicitat!), sempre tan agradable i optimista, gràcies per tenir sempre un somriure per oferir!. A Maria, muchísimas gracias por tu gran trabajo, tu eficiencia y por sacarme las castañas del fuego tantíssimas veces! (y por tener que soportar mi inutilidad referente a todo lo que se trata de burocracia!!). A Laura y Aroa, geniales socias con las que compartir los marrones de las juntas de instituto!. A Silvia, con quien compartimos unas divertidas prácticas cuando justo empezábamos este camino. A los vecinos de al lado, Rubén, Mercedes, Jordi y Víctor magníficos compañeros de fiestas y por su compañerismo y apoyo logístico en la cola del Clínic!. A los vecinos de un poco más lejos, Julián con su irónico humor y sus eternas preguntas sobre todo, Raul, Ro, Roci y Ana, suerte ahora que empezais! Giusso, compañero de Lost y alguna frikada más y fotógrafo oficial del departamento, ánimo, que estás arrancando con fuerza!. A los tres mini-becarios, Pipu, Laura y David, qué dos meses tan divertidos! Fue un placer enseñaros un poquito de ciencia, espero que tengais muchísima suerte en vuestro camino y que nos volvamos a encontrar! Ánimos, que vais a llegar muy lejos!.

Me gustaría dedicar unas palabras a cuatro personas muy especiales, sin quienes no hubiera llegado hasta aquí. David, Eva, Xavi, Dani, muchísimas gracias por todo. No hay suficientes palabras para poder agradeceros todo lo que habeis hecho por mi. Siempre me habeis apoyado incondicionalmente, tanto en los buenos momentos como en las penas y las tristezas. Gracias por estar siempre disponibles para escucharme y aconsejarme y por darme fuerzas para seguir adelante!!. Gracias, Dani por tu humor, por tu capacidad de reírte de todo, de nosotros y del mundo, que gran lección y forma de sobrevivir!. Xavi, decir que somos familia es poco, muchísimas gracias por tantísimos años de confianza y amistad y por tu grandísimo corazón!!. David y Eva, qué puedo deciros! Gracias por todo lo que habeis hecho por mi, por las cenas y las eternas veladas conversando hasta la madrugada, por permitirme ser parte de vuestra familia y muy especialmente ahora, disfrutando con vuestra nueva etapa con el pequeño Aleix!. Y gracias, David, por el fantástico diseño de la portada y contraportada de esta tesis!!. Muchísimas gracias a los cuatro por todo lo que hemos vivido, vuestra es una parte de esta tesis.

Moltes gràcies a l'Anna, sempre amable i disposada a escoltar i ajudar, al Jordi amb el seu gran sentit de l'humor, quin mestre!, a los amigos "de toda la vida", Dani,

Diego e Irene, Suter y Carol, Jorge, Raul, Manel, Brun y Marta, Mosqui y Ester, por todo lo que nos reímos cada vez que se mota una barbacoa o sopar!!

M'agradaria també donar les gràcies a la gent que vaig conèixer a la facultat i que, sens dubte, han estat una part molt important de la meva vida durant aquells anys. Gracias, Jordi, son muchos años compartiendo camino, ha sido un honor coincidir contigo y disfrutar tu gran filosofía y manera de entender el mundo. Gracias Ana por tus siempre sorprendentes e-mails y por las geniales conversaciones caminando perdidos durante horas por cualquier zona de Barcelona. Gràcies a Miriam per la teva amistat, Javi, Xurxo, Marta y, molt especialment, gràcies Aleix, una de les persones més bones que conec, pels teus ànims i la teva bondat... i per trucar-me sempre per quedar, ja saps que sóc un desastre i mai m'enrecordo!

Moltes gràcies a la meva família (a la meva família "adoptiva"). Gràcies, Joana i Josep, per ser com els meus segons pares, pels vostres consells i tot el vostre afecte. Gràcies per inculcar-me l'amor per la muntanya i per ser una part molt important de la meva educació i de la meva vida, sempre us portaré amb mi. Gràcies, Noemi i Rut, pel vostre afecte, per ser unes germanes per a mi. Gràcies, Ismael i Marc, per totes les estones felices que hem passat i per tot el que he après de vosaltres. I moltes gràcies a les petites, la Jana i l'Esther, que cada dia estan més i més grans i ens regalen la seva alegria i energia!

Por último, quiero dar las más sinceras gracias a mis padres. Siempre me habéis apoyado y confiado en mí. Me habéis animado a continuar estudiando, a aprender y a ser una buena persona. Gracias por enseñarme a ser siempre fiel a mi forma de pensar y mis ideales, y a luchar por lo que creo que es justo y correcto. Gracias a mi padre por haberme enseñado a pensar con lógica y por enseñarme a discutir, argumentar, y disfrutar de un debate basado en la razón. Gracias a mi madre, por haberme enseñado a tener constancia en el trabajo, a tener fuerza de voluntad y a esforzarme y a continuar caminando por muy difícil que se planteara el mañana, sin ese apoyo no hubiera llegado hasta aquí!. Muchas gracias a los dos por todo vuestro cariño ilimitado, por vuestra infinita paciencia y por darme los valores que tengo.

Esta tesis está especialmente dedicada a vosotros.

Javier López Gil  
Mayo de 2009



*A veces olvidamos que sin ellas,  
este trabajo no sería posible.  
Merecen nuestro mayor respeto pues,  
gracias a ellas, se han salvado millones de vidas.*



# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. ESQUIZOFRENIA</b>	<b>1</b>
1.1. Etiología	2
1.2. Cambios observados en la esquizofrenia	4
1.2.1. Estudios post-mortem	4
1.2.2. Estudios de cognición y neuroimagen	5
1.2.3. Modelos animales	5
1.3. Hipótesis de la esquizofrenia	7
1.3.1. Hipótesis del neurodesarrollo	7
1.3.2. Hipótesis genética	8
1.3.3. Hipótesis dopaminérgica	9
1.3.4. Hipótesis serotoninérgica	11
1.3.5. Hipótesis glutamatérgica	12
<b>2. LA CORTEZA PREFRONTAL</b>	<b>15</b>
2.1. Funciones	19
2.2. Citoarquitectura	20
2.3. Conectividad	23
2.3.1. Tálamo	23
2.3.2. Hipocampo	25
2.3.3. Sistemas aminérgicos	26
2.3.4. Núcleo accumbens - pálido ventral	28
2.3.5. Conexiones cortico-corticales	29
2.4. Receptores corticales	31
2.4.1. Receptores glutamatérgicos	31
2.4.2. Receptores dopaminérgicos	33
2.4.3. Receptores serotoninérgicos	34
<b>3. TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA</b>	<b>36</b>
3.1. Fármacos antipsicóticos	36
3.2. Otros tratamientos	39

## **II. OBJETIVOS** 41

## **III. MATERIALES Y MÉTODOS** 43

<b>1. MATERIALES</b>	<b>43</b>
1.1. Animales de experimentación	43
1.2. Fármacos utilizados	43
<b>2. MÉTODOS – Microdiálisis intracerebral <i>in vivo</i></b>	<b>44</b>
2.1. Construcción de las sondas de microdiálisis	44
2.2. Implantación de las sondas de microdiálisis	45
2.3. Obtención de las muestras	46
2.4. Administración de los fármacos	48
2.4.1. Administración local	48
2.4.2. Administración sistémica	48
2.5. Estudios del comportamiento	48
2.6. Comprobación de la localización de la sonda de microdiálisis	49
2.7. Trazados con fluorogold	50
2.8. Análisis de las muestras obtenidas	50
2.9. Análisis estadístico	50

## **IV. RESULTADOS** 53

### **Trabajo 1** 53

Clozapine and olanzapine, but not haloperidol, suppress serotonin efflux in the medial prefrontal cortex elicited by phencyclidine and ketamine.

### **Trabajo 2** 65

Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801 increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat.



<b>Trabajo 3</b>	<b>79</b>
Role of different monoamine receptors controlling MK-801-induced release of serotonin and glutamate in the medial prefrontal cortex: relevance for antipsychotic action.	
<b>Trabajo 4</b>	<b>95</b>
Unraveling monoamine receptors involved in the action of typical and atypical antipsychotic on glutamatergic and serotonergic transmission in prefrontal cortex.	
<b>Trabajo 5</b>	<b>127</b>
NMDA Receptor Blockade Needs to Disrupt Prefrontal Cortex Bilaterally in an Animal Model of Schizophrenia	
<b>Trabajos anexos</b>	<b>145</b>

## ***V. DISCUSIÓN*** **149**

<b>1. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE MK-801</b>	<b>149</b>
<b>2. ESTUDIO DEL LUGAR DE ACCIÓN DE LOS ANTAGONISTAS NMDA</b>	<b>151</b>
<b>3. EFECTO DE LOS FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS EN EL MODELO MK-801</b>	<b>155</b>
<b>4. ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS</b>	<b>158</b>

## ***VI. CONCLUSIONES*** **165**

## ***VII. BIBLIOGRAFIA*** **167**



## ABREVIATURAS

5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5-HT	5-Hidroxitriptamina o serotonina
AMPA	Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico
AP	Antero-posterior
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BAYx3702	R-(-)-2-{4-[(croman-2-ilmetil)-amino]-butil}-1,1-dioxobenzo[d]isotiazolona
CB	Proteína de unión a calcio calbindina
CPF	Corteza prefrontal
CPFm	Corteza prefrontal medial
CR	Proteína de unión a calcio calretinina
DA	Dopamina
DE	Diámetro externo
DI	Diámetro interno
DOI	1-(2,5-dimetoxi-4-iodofenil)-2-aminopropano
DR	Núcleo dorsal del rafe
DV	Dorso-ventral
EPSCs	Corrientes postsinápticas excitatorias
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GLU	Glutamato
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
i.p.	Administración intraperitoneal ISRS Inhibidor selectivo de la recaptación de serotonina
KO	Animal genoanulado, <i>knockout</i>
L	Lateral
LCR	Líquido cefalorraquídeo
M100907	R-(+)-alpha-(2,3-dimetoxifenil)-1-[4-fluorofeniletil]-4-piperidina-metanol
MD	Núcleo dorsomedial del tálamo
mGluRs	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
MK-801	Dizocilpina
MnR	Núcleo medial del rafe
NA	Noradrenalina
NAA	N-acetilaspartato

NAc	Núcleo accumbens
NBQX	2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamoil- benzo(f)quinoxalina
NMDA	<i>N</i> -metil-D-aspartato
NR	Núcleos del rafe
NRG1	Neuregulina 1
PCP	Fenciclidina
PPI	Inhibición pre-pulso de la respuesta de sobresalto
PV	Proteína de unión a calcio parvalbúmina
s.c.	Administración subcutánea
SN	Sustancia nigra
SNC	Sistema nervioso central
TTX	Tetrodotoxina
vHPC	Hipocampo ventral
VTA	Área tegmental ventral

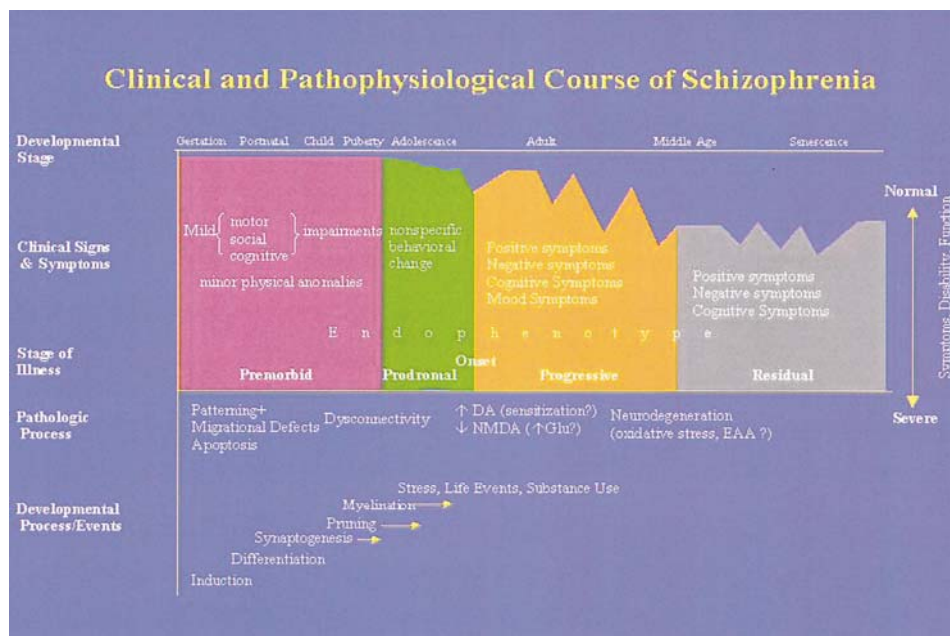




# I. INTRODUCCIÓN

## 1. ESQUIZOFRENIA

La esquizofrenia es una enfermedad cerebral crónica, grave y que afecta aproximadamente a un 1% de la población. Está caracterizada por un mal funcionamiento de los procesos mentales y por alteraciones del comportamiento. Los primeros episodios de la enfermedad se manifiestan durante la adolescencia o al principio de la edad adulta, normalmente tras un pródromo que puede empezar en la infancia (los pacientes esquizofrénicos han sido, en general, niños con problemas de relación social, familiar y escolar) y, a partir de ese inicio, la enfermedad sigue un curso crónico y deteriorante durante toda la vida (**figura 1**).



**Figura 1** – esquema del curso clínico de la esquizofrenia extraído de Lewis and Lieberman 2000.

La sintomatología esquizofrénica es múltiple y variada. En general, se pueden clasificar las afectaciones clínicas en tres grandes grupos de sintomatologías:

- **Síntomas positivos**– esta designación engloba los síntomas psicóticos, las alucinaciones (percepciones no reales, principalmente auditivas), las falsas creencias, crisis, pensamientos aberrantes, etc.
- **Síntomas negativos/afectivos**– falta de motivación, desinterés social, apatía, higiene descuidada, estados depresivos, etc., caracterizan una importante parte de esta compleja enfermedad y provocan el profundo aislamiento

social de los pacientes esquizofrénicos, inhabilitándolos para una normal integración en la sociedad.

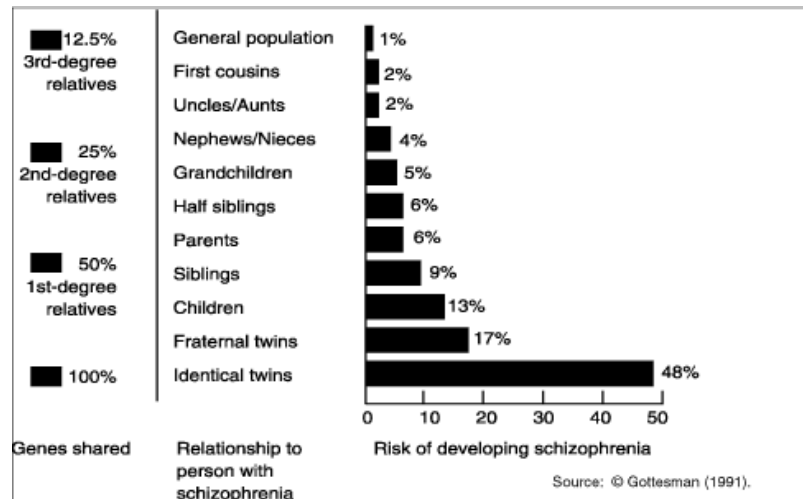
- **Síntomas cognitivos**– graves problemas de atención y en el aprendizaje, en la realización de funciones ejecutivas y de memoria y en especial de la memoria a corto plazo u operativa (*working memory*).

En la actualidad no existe ningún tratamiento capaz de curar la enfermedad, tan sólo consiguen aliviar la sintomatología con una eficiencia relativa y con graves efectos secundarios. Históricamente, han sido los síntomas positivos los que han recibido mayor atención así como tratamientos (es la habilidad para bloquear este tipo de sintomatología lo que ha definido qué fármacos tenían capacidades antipsicóticas). Más recientemente los otros tipos de síntomas han recibido cada vez más atención como el posible “núcleo real” de la enfermedad, reconociendo a los síntomas negativos y cognitivos como los más incapacitantes, responsables del profundo aislamiento social de los pacientes y de su incapacidad funcional. Lamentablemente, a pesar del creciente interés, a fecha actual, tan sólo algunos tratamientos experimentales y algunos fármacos antipsicóticos atípicos mejoran estos síntomas, aunque que distan de constituir una terapia ideal.

## 1.1. ETIOLOGÍA

La causa de la esquizofrenia es desconocida. Las hipótesis actuales plantean la existencia de una base genética de la enfermedad y la existencia de unos factores ambientales que serían los desencadenantes de los procesos psicóticos. De hecho, existe una clara base genética si tenemos en cuenta el aumento de la incidencia de la enfermedad al aumentar el grado de parentesco: de un 1% en la población general, pasamos a un 2% en parientes de tercer grado, un 2 a 6% en parientes de segundo grado, un 6 a 17% en parientes de primer grado, un 17% en gemelos dizigóticos y prácticamente un 50% en gemelos monoigóticos (**figura 2**).





**Figura 2** – esquema representativo del porcentaje de riesgo de padecer esquizofrenia según el parentesco, de Gottesman 1991.

Tras muchos años buscando el “gen de la esquizofrenia”, hoy en día se acepta que es una enfermedad poligenética. De hecho, no se ha encontrado ningún gen directamente responsable, sino una gran cantidad de genes candidatos afectados en pacientes de esquizofrenia, aunque no con suficiente potencia individual como para justificar que sea un gen único el causante de la enfermedad.

También se ha observado una posible implicación de factores ambientales, como exposición a infecciones, problemas autoinmunes o de toxicidad o complicaciones en el nacimiento, en el desarrollo de la enfermedad. Esos factores podrían provocar sutiles alteraciones durante el desarrollo embrionario que aumentarían la susceptibilidad a desarrollar esquizofrenia.

Como antes se ha mencionado, las posibles causas genéticas no parecen ser suficientes para provocar la aparición de la enfermedad. Al contrario que otras patologías de origen genético o del desarrollo que se manifiestan prácticamente desde el momento del nacimiento, la esquizofrenia no suele presentarse hasta la adolescencia o el comienzo de la vida adulta. La hipótesis sugerida es que los factores genéticos o problemas durante el desarrollo embrionario provocarían una vulnerabilidad, una falta de plasticidad del cerebro. Una época de grandes cambios en la vida como es el paso de adolescencia a vida adulta podría dejar patente esa incapacidad del cerebro para adaptarse y desencadenando los primeros síntomas de la enfermedad. (Lewis and Lieberman 2000)

Es importante remarcar que es en esta etapa de la vida cuando importantes estructuras del cerebro acaban su maduración como es el caso, por ejemplo, de la corteza prefrontal (CPF) (Fuster 2001) o el cuerpo calloso, que alcanza su nivel máximo de mielinización. Fallos en estos procesos podrían provocar la vulnerabilidad y la falta de capacidad de adaptación que se ha propuesto que existe en la esquizofrenia.

## **1.2. CAMBIOS OBSERVADOS EN LA ESQUIZOFRENIA**

La complejidad de la esquizofrenia implica también una gran dificultad en su estudio. Su heterogeneidad de sintomatologías, el gran número de factores (genéticos, ambientales, etc.) y áreas cerebrales implicadas en su fisiopatología hacen necesario un acercamiento multidisciplinario a la enfermedad. A grandes rasgos, el estudio de la esquizofrenia se ha centrado en 3 principales abordajes: los estudios post-mortem en cerebros de pacientes esquizofrénicos, los estudios de neuroimagen (normalmente ligados a la realización de pruebas funcionales) y los modelos en animales de experimentación.

### **1.2.1. Estudios post-mortem**

Los estudios post-mortem realizados en cerebros de pacientes esquizofrénicos, han mostrado diferencias significativas como son la reducción del volumen cortical, hipocampal y talámico así como el ensanchamiento de los ventrículos. Recientemente se está realizando un mayor estudio del estado de la materia blanca con técnicas que muestran, entre otras alteraciones, un crecimiento más lento de lo normal de la materia blanca frontal (aproximadamente de un 15%) en casos donde la esquizofrenia se manifestó en edad infantil respecto a sujetos control (Gogtay et al 2008). Un factor común a todos estos trabajos es la variabilidad de resultados, existiendo tanto estudios que muestran unas grandes diferencias volumétricas como otros que no señalan diferencias con los cerebros de sujetos sanos. De todas formas, el consenso general es que existe una pérdida de volumen cerebral en los pacientes esquizofrénicos (Brown et al 1986; Selemon et al 1995; Benes 2000; Harrison 2004).

Otro importante campo de estudio ha sido el de la expresión de receptores en determinadas áreas cerebrales. Se ha observado una disminución de la densidad de transportadores de serotonina en el córtex prefrontal de pacientes de esquizofrenia así como un incremento de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> en los estudios post-mortem (Abi-Dargham 2007). Una de las alteraciones más observada en la corteza prefrontal de cerebros de pacientes esquizofrénicos es la disminución de la expresión de marcadores típicos de neuronas GABAérgicas como son la GAD67 y la parvalbúmina, cuya alteración sugiere una disfunción en estas interneuronas inhibitorias (Cochran et al 2003; Hashimoto et al 2003; Coyle 2004)

Un factor importante a tener en cuenta en este tipo de trabajos es la gran heterogeneidad de la población de estudio: el diferente grado de afectación de la enfermedad, que los pacientes hayan recibido o no tratamiento farmacológico o la presencia de otras enfermedades mentales pueden influir en la expresión diferencial de receptores para neurotransmisores dando lugar a la gran variabilidad de resultados mencionada anteriormente (Abi-Dargham 2007).

### 1.2.2. Estudios de cognición y neuroimagen

Existe un gran número de paradigmas para evaluar las funciones cognitivas, como por ejemplo el *Wisconsin card sort test* que valora la memoria operativa o *working memory* y en la que se puede apreciar un aumento de errores en pacientes de esquizofrenia. Estas pruebas valoran también la capacidad de atención, de retener información, etc. Los estudios de neuroimagen, electroencefalogramas (EEG) o de metabolismo de la glucosa realizados en pacientes esquizofrénicos muestran déficits en la activación de diferentes áreas cerebrales al realizar estas pruebas. Especialmente destaca la hipofrontalidad que presentan estos pacientes: la corteza prefrontal muestra una activación inferior a lo normal durante la realización de pruebas que requieren el uso de funciones propias de esta región como es la memoria a corto plazo (Andreasen et al 1992; Tamminga et al 1992; Gao and Tamminga 1994; Andreasen et al 1997; Potkin et al 2002). De hecho, esta hipofunción metabólica en la corteza de pacientes esquizofrénicos se ha correlacionado con la presencia y gravedad de los síntomas negativos y los déficits cognitivos (Andreasen et al 1992; Tamminga et al 1992), reforzando la implicación de la corteza prefrontal en este tipo de sintomatología.

Una de las mayores ventajas de este tipo de estudio es que se puede seguir al paciente a lo largo de un periodo de tiempo y de esta manera ver si la administración de un determinado fármaco antipsicótico es capaz de corregir parte de estos déficits. Así, por ejemplo, se ha observado que la clozapina puede reequilibrar el metabolismo asimétrico de la glucosa observado en pacientes esquizofrénicos (Potkin et al 1994).

### 1.2.3. Modelos animales

Es evidente la dificultad para trasladar una enfermedad tan compleja como la esquizofrenia a un modelo en animal de experimentación. La gran mayoría de estos modelos han sido desarrollados en roedores y la aproximación más habitual ha sido la administración de drogas o fármacos que tengan la capacidad de inducir síntomas esquizofrénicos en humanos sanos. Actualmente, ningún modelo animal reproduce totalmente los déficits perceptuales, cognitivos y emocionales característicos de la esquizofrenia. Se busca que estos modelos animales presenten la máxima validez predictiva y comparativa, es decir, que los síntomas que provoque en el animal sean representativos de la sintomatología de la enfermedad en humanos y que, en mayor o menor medida, sean capaces de discriminar un fármaco clínicamente efectivo de otro que no lo sea. Este es el caso de, por ejemplo, la hiperlocomoción causada por varios de estos modelos como el de los antagonistas NMDA, que se ha descrito que está relacionada con los síntomas positivos (Moghaddam et al 1997; Moghaddam and Adams 1998; Jentsch and Roth 1999). En varios de estos modelos se puede observar que la administración de antipsicóticos revierte los déficits tanto en animal de experimentación como en humano. Esto sugiere que, a pesar de que las alteraciones en el modelo animal sean tan difíciles de comparar con las alteraciones en humanos, existe una base,

un mecanismo común subyacente a ambos procesos que puede ser estudiado en el animal (Celada et al 2007).

Está propuesto que algunos de estos modelos presentan incluso la capacidad de distinguir entre compuestos con un potencial efecto de antipsicótico atípico o clásico según sean capaces de bloquear o no ciertas características del modelo. En resumen se puede decir que un buen modelo es aquel en el que, por ejemplo, se observen cambios similares a los de la esquizofrenia en humanos y alteraciones “representativas” en animales y en ambos casos sea revertido por la administración de antipsicóticos. En todo caso, es importante remarcar que no toda sustancia que revierta los déficits en el animal de experimentación presenta efectos antipsicóticos al ser administrada en humanos.

Uno de los tipos de pruebas más importantes y frecuentemente realizadas para el estudio y validación de estos modelos animales, son los estudios del comportamiento. Con este objetivo se han desarrollado una serie de paradigmas de conducta en animales para así poder evaluar entre otras la *working memory* o la PPI, ambas profundamente afectadas en pacientes de esquizofrenia. Otros rasgos característicos de la enfermedad humana como pueden ser el aislamiento social, la dificultad para aprendizaje o el estado depresivo, pueden ser también estudiados en ratas o ratones mediante estas pruebas. A continuación comentamos algunos de los paradigmas de conducta en animales más comunes para estos estudios (Celada et al 2007):

-Locomoción- es muy frecuente que los animales presenten una fuerte hiperlocomoción en estos modelos, así como movimientos involuntarios o estereotipias (balanceo de la cabeza, caídas torpes, cuerpo aplastado, abducción de los cuartos traseros, etc.). Prácticamente todos los antipsicóticos bloquean esta hiperlocomoción.

-PPI- la *pre-pulse inhibition of the startle response* (inhibición prepulso de la respuesta de sobresalto) está basada en el hecho de que una débil señal presentada antes del estímulo reduce o bloquea la amplitud de la respuesta de sobresalto a dicho estímulo. Hay muchas evidencias de que la PPI de humanos y roedores es homóloga y ésta se ha visto alterada en pacientes esquizofrénicos (Geyer et al 2001).

-Aislamiento social- para estudiar las homologías con los síntomas negativos, se utilizan dos test de aislamiento social: el provocado por administración de anfetamina (Ellenbroek 1991) y el provocado por la administración de fenciclidina (PCP) (Sams-Dodd 1996).

-*Working memory*- la principal característica de los síntomas cognitivos en humanos es el déficit en la memoria operativa o a corto plazo que presentan los pacientes de esquizofrenia. Para valorarla en animales existen varias pruebas como son el laberinto acuático de Morris, el laberinto en T y el laberinto de brazos radiales y 5-CSRTT (*5-choice serial reaction time task*) (Celada et al 2007).

### 1.3. HIPÓTESIS DE LA ESQUIZOFRENIA

El estudio de estos modelos animales así como los estudios post-mortem y de neuroimagen, han aportado una serie de evidencias (genéticas, histológicas, neuroquímicas, de la conducta, funcionales, etc.) que han llevado al desarrollo de las diferentes hipótesis sobre las causas de la esquizofrenia. Debido a esta íntima relación entre modelo animal e hipótesis de la enfermedad, es prácticamente imposible hablar de ambos conceptos de forma independiente. A continuación se detallan las principales hipótesis que existen en la actualidad y los modelos animales en los que se basan las mismas.

#### 1.3.1. Hipótesis del neurodesarrollo

Como se mencionó previamente, una de las teorías más aceptadas en la actualidad considera que la esquizofrenia estaría causada por una base genética poco conocida y/o daños durante la gestación. Esto alteraría la plasticidad cerebral para reaccionar a los diferentes estímulos, generando conductas mal adaptadas hasta que un estímulo de intensidad superior desencadenaría el cuadro psicótico (Lewis and Lieberman 2000).

Se han desarrollado modelos en animales basados en lesiones neuronales en estadios perinatales, principalmente utilizando neurotoxinas siendo quizás el más caracterizado el de Barbara Lipska y Daniel Weinberger (Lipska and Weinberger 1993; Lipska and Weinberger 1995; Lipska et al 1995; Lipska and Weinberger 2000). En este modelo se realiza una lesión excitotóxica (administración de ácido iboténico) en el área CA1 y el *subiculum* ventral del hipocampo ventral en P7 (día post-natal 7). La importancia de esta región queda patente por estudios que muestran cambios funcionales y estructurales en esta zona en pacientes de esquizofrenia (Weinberger 1999). La CA1 y el *subiculum* ventral proyectan a la corteza prefrontal (CPF) y al área tegmental ventral (VTA), origen de las vías dopaminérgicas mesolímbica y mesocortical (Carr and Sesack 1996). Una lesión en estas áreas del hipocampo provoca una alteración grave de los circuitos cortico-límbicos, hecho que queda patente pues en edad adulta las ratas lesionadas presentan alteraciones celulares y funcionales en la CPF y áreas relacionadas anatómicamente (Lipska et al 2002).

Estas ratas lesionadas, ya en estadios juveniles, muestran menos contactos sociales que las ratas control. En edad adulta presentan un patrón de comportamiento social alterado, estereotipias, una respuesta incrementada al estrés, a los antagonistas del receptor NMDA y a los agonistas dopaminérgicos, así como déficits en la PPI y en la memoria operativa, comportamientos representativos de la esquizofrenia en humanos (algunos de los cuales son normalizados en la rata mediante la administración de antipsicóticos) (Carr and Sesack 1996; Lipska 2004, Celada et al 2007). La lesión transitoria en P7 mediante la administración de tetrodotoxina en el hipocampo ventral también produce esas alteraciones mientras que cuando la toxina se administra en edad adulta no provoca esos síntomas (Lipska et al 2002).

Las conductas que presentan estas ratas están relacionadas con un incremento de la transmisión dopaminérgica en las vías mesolímbica y nigroestriatal, mostrando los adultos alteraciones moleculares y anatómicas estos sistemas tales como niveles reducidos del RNA mensajero (mRNA) del transportador de dopamina (DAT) en la *sustancia nigra* y en la VTA y disminución de la proteína GAD67 (proteína característica de neuronas GABAérgicas) en la CPF y del receptor de dopamina D2 en el estriado (Lipska and Weinberger 2000; O'Donnell et al 2002; Lipska et al 2003)

Otro modelo consiste en la administración de la endotoxina bacteriana del lipopolisacárido (LPS) en ratas gestantes. La descendencia de las ratas tratadas, a parte de una alteración del sistema inmune, presenta déficits en la PPI que pueden ser revertidos mediante la administración con antipsicóticos (Borrell et al 2002).

Un modelo que en los últimos tiempos ha ganado más atención es el de la administración de metilazoximetanol (MAM), un agente metilante del DNA, en ratas gestantes en el día 17 (GD17). Los descendientes de estas ratas, al llegar al estado adulto, presentan alteraciones del comportamiento como déficits en la PPI, incremento de sensibilidad a PCP y anfetamina y disrupción de la actividad rítmica en el córtex prefrontal, alteraciones características de un modelo de esquizofrenia (Moore et al 2006; Goto and Grace 2006). Se ha postulado una hiperfunción dopaminérgica en estos animales como posible causa de los cambios descritos (Lodge and Grace 2007). El hecho de que la inactivación del hipocampo revierta las alteraciones de la conducta y la hiperdopaminérgia indica que un incorrecto desarrollo del hipocampo ventral, que presentaría un incremento en su actividad espontánea en este modelo, conduciría a un estado de hiperexcitación de las neuronas dopaminérgicas del área tegmental ventral (VTA) (Lodge and Grace 2007). Estos resultados sugieren que la desregulación de las vías dopaminérgicas descrita en esquizofrenia y modelos animales podría estar relacionada con una hiperactividad del hipocampo ventral (Lodge and Grace 2007).

### 1.3.2. Hipótesis genética

A pesar de que no se ha encontrado un gen especialmente ligado a la esquizofrenia, numerosos estudios sugieren que existe un importante componente genético en esta enfermedad (Cardno et al 1999; Tsuang et al 2001). Se ha observado que el gen DISC1 (*disrupted in schizophrenia 1*) tiene un papel central en la producción de nuevas neuronas durante el desarrollo cerebral y en la edad adulta. Descubierta en una translocación cromosómica en una familia escocesa con alta incidencia de esquizofrenia, depresión y trastorno bipolar (Blackwood et al 2001), mutaciones en este gen dan lugar a un desarrollo neuronal aberrante (Kamiya et al 2005) y su silenciamiento en progenitores neuronales disminuye la proliferación celular (Mao et al 2009). De la misma manera, en adultos, la aplicación de RNAs de interferencia del gen DISC1 en el giro dentado provoca una disminución de progenitores que se traduce en alteraciones del comportamiento como hiperactividad, sugiriendo una vez más su posible implicación en las causas de la esquizofrenia (Mao et al 2009). Otro gen cuya implicación en la esquizofrenia

se ha sugerido es el de la proteína DARPP32– una fosfoproteína regulada por dopamina y AMP cíclico que regula la eficacia de la neurotransmisión dopaminérgica (Fienberg et al 1998). Estudios post-mortem de pacientes de esquizofrenia muestran una disminución de esta proteína en la capa II de la CPF (Albert et al 2002).

A parte de los modelos de neurodesarrollo, han surgido los modelos de animales modificados genéticamente. Potencialmente, genes que regulen la expresión de receptores implicados en la esquizofrenia así como de las muchas proteínas implicadas en el funcionamiento de estos, pueden ser genes cuyo daño puede generar susceptibilidad a la enfermedad. Un ejemplo es el del gen de la neuregulina 1 (NRG1, en el cromosoma 8) (Stefansson et al 2002; Petryshen et al 2005). Esta proteína regula la expresión de subunidades del receptor de glutamato NMDA. Ratones mutantes heterocigotos para esta proteína muestran una mala adaptación al medio, alteraciones en la PPI e hiperlocomoción (Stefansson et al 2002), sugiriendo que afectaciones en los receptores NMDA podrían estar relacionadas con la esquizofrenia.

Otro modelo es el de los ratones que presentan una reducción de aproximadamente el 95% de la subunidad NR1 del receptor NMDA (Mohn et al 1999). Estos animales son hiperactivos, presentan estereotipias, graves alteraciones en la interacción social y sexual y déficits en la PPI, los cuales pueden ser revertidos por clozapina.

También se ha considerado un posible papel en esta patología por parte del gen de la reelina. La reelina es una proteína clave para permitir a la neurona una migración correcta y la consecución de una posición final en las estructuras en láminas (Rice and Curran 2001). Se ha visto que hay una disminución en los niveles de RNA mensajero en los cerebros post-mortem de pacientes de esquizofrenia. El ratón mutante *reeler*, presenta una disminución de reelina y de GAD67, un incremento en el empaquetamiento neuronal y una disminución en la densidad de espinas dendríticas, así como déficits en la PPI (Impagnatiello et al 1998; Guidotti et al 2000).

### 1.3.3. Hipótesis dopaminérgica

Durante mucho tiempo esta ha sido la hipótesis más aceptada sobre la causa de la esquizofrenia, postulando la existencia de un exceso de actividad dopaminérgica (Carlsson 1988). Varias observaciones muestran la importancia de la dopamina en la sintomatología psicótica. Por un lado, drogas que incrementan la neurotransmisión dopaminérgica, como son los psicoestimulantes (por ejemplo anfetaminas y cocaína), pueden causar una psicosis parecida a los síntomas positivos de la esquizofrenia en individuos sanos y pueden exacerbar los síntomas psicóticos en pacientes esquizofrénicos (Ellenbroek and Cools 1990), así como provocar alteraciones de la PPI en animales de experimentación (Geyer et al 1999). Estudios de neuroimagen sugieren que los enfermos de esquizofrenia presentan de promedio una mayor liberación estriatal de dopamina (DA) tras la administración de anfetamina, en comparación con el grupo control (Laruelle et al 1996). En línea con

esta observación, encontramos un reciente artículo que muestra una mayor recaptación de dopamina en el estriado de pacientes con alto riesgo de esquizofrenia o en las primeras fases de la enfermedad (pródromo), mostrando así un incremento de la actividad dopaminérgica estriatal (Howes et al 2009). Por otro lado, todos los fármacos antipsicóticos utilizados en la actualidad son antagonistas del receptor de dopamina D2 (Seeman et al 1975) y la afinidad por estos receptores está altamente correlacionada con su efectividad clínica para tratar los síntomas psicóticos (Seeman et al 1976; Creese et al 1996; Kapur and Mamo 2003). Los fármacos antipsicóticos clásicos, de hecho, se caracterizan por su potente efecto antagonista del receptor D2 (causante también de sus efectos secundarios, los síntomas extrapiramidales o parkinsonianos). Tanto estos antipsicóticos clásicos como los de segunda generación, pese a tener un variado perfil farmacológico presentan, todos, este antagonismo D2, sugiriendo se requiere un cierto bloqueo de estos receptores dopaminérgicos para ejercer una potencial acción antipsicótica.

Un refinamiento posterior de la hipótesis dopaminérgica postula una hiperactividad de la vía mesolímbica que sería responsable de la sintomatología positiva y una hipofunción de la vía mesocortical que provocaría los síntomas negativos y déficits cognitivos al disminuir la transmisión dopaminérgica en la CPF (Carlsson 1988; Davis et al 1991; Weinberger et al 1992; Abi-Dargham et al 2000). Un bloqueo de los receptores D2 sería pues beneficioso para los síntomas psicóticos pues se estaría contrarrestando el exceso de dopamina (Kapur 2004) pero no mejoraría los síntomas negativos pues, como se ha mencionado, pueden estar asociados a una disminución de la transmisión dopaminérgica.

Pese a todos estos indicios, en los últimos tiempos el modelo de la administración de psicoestimulantes como la anfetamina está utilizándose menos debido a que reproduce los síntomas positivos pero en cambio apenas recrea los síntomas negativos y cognitivos característicos de la enfermedad. Estudios post-mortem y de tomografía de emisión de positrones (PET) no han logrado demostrar una excesiva activación de los receptores D2 (Lewis and Lieberman 2000; Kapur 2004). En cambio, sí se ha descrito un incremento en la densidad de receptores D1 corticales y su asociación con el déficit cognitivo de los pacientes (Abi-Dargham et al 2002), aunque estos estudios no se han podido reproducir (Karlsson et al 2002).

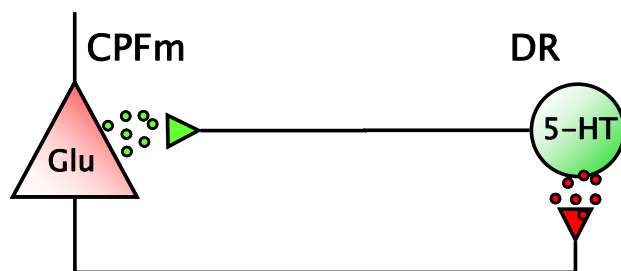
Así pues, es probable que un cambio, una alteración única en la neurotransmisión dopaminérgica no sea suficiente para generar la amplia y variada sintomatología esquizofrénica. Además, el hecho de que la clozapina, que exhibe un relativamente débil antagonismo D2 y un mayor antagonismo 5-HT<sub>2A</sub> sea capaz de reducir los síntomas negativos y cognitivos y sea igualmente efectiva para el tratamiento de los síntomas positivos sugiere la implicación de otros sistemas de neurotransmisión en la fisiopatología de la esquizofrenia (Meltzer et al 1989a; Meltzer 1999; Meltzer 2004).



### 1.3.4. Hipótesis serotoninérgica

Esta hipótesis está basada en dos observaciones principales. En primer lugar, la administración de LSD (dietilamida del ácido lisérgico), DOI y otros compuestos agonistas del receptor de serotonina 5-HT<sub>2A/2C</sub> provocan alucinaciones (graves alteraciones de la percepción y la cognición) que se han comparado con los síntomas psicóticos de la esquizofrenia (Bowers, Jr. and Freedman 1966; Gouzoulis-Mayfrank et al 1998a; Gouzoulis-Mayfrank et al 1998b). Pese a estas características comunes, existen diferencias entre los efectos de estos agonistas serotoninérgicos y los síntomas positivos: los efectos de estas drogas generan una rápida tolerancia y las alucinaciones que causan son principalmente visuales mientras que la esquizofrenia se caracteriza por las alucinaciones auditivas.

La acción de estos alucinógenos (LSD, DOI) depende de la activación de receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub> corticales (Glennon et al 1984; Aghajanian and Marek 1999a; Nichols 2004; Beique et al 2007). Se ha descrito que la administración sistémica de DOI incrementa la frecuencia de descarga de las neuronas piramidales en la CPF así como de las serotoninérgicas de los núcleos del rafe y aumenta la neurotransmisión glutamatérgica cortical a través de la activación de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (Aghajanian and Marek 1999b). La administración de DOI de forma local en la CPF provoca un incremento de la actividad de las neuronas del rafe y del área tegmental ventral (VTA) y consecuentemente, un aumento de la liberación cortical tanto de serotonina como de dopamina (Martin-Ruiz et al 2001; Bortolozzi et al 2005). Se ha descrito ampliamente la gran interconectividad entre la corteza y los núcleos del rafe y el proceso por el cual la excitación de la corteza prefrontal provoca la liberación de 5-HT en la corteza consecuencia de la activación de las neuronas de estos núcleos aminérgicos (**figura 3**) (Aghajanian and Wang 1977; Thierry et al 1983; Sesack et al 1989; Jentsch and Roth 1999; Celada et al 2001) así como el proceso inverso, pues la estimulación eléctrica del rafe provoca una liberación de serotonina en la corteza prefrontal, serotonina capaz de activar (vía 5-HT<sub>2A</sub>) o inhibir (a través de los 5-HT<sub>1A</sub>) las neuronas piramidales en la CPFm de rata (Thierry et al 1983; Sesack et al 1989; Hajos et al 2003; Puig et al 2003; Puig et al 2004; Amargos-Bosch et al 2004; Puig et al 2005).



**Figura 3** – Una subpoblación de neuronas piramidales de capa V proyecta densamente al rafe dorsal (Gabbott et al 2005) y ejerce un fuerte control sobre la excitación de estas células, de forma que la liberación de serotonina en la CPFm refleja la actividad de estas neuronas piramidales (Celada et al 2001; Amargos-Bosch et al 2007).

En segundo lugar, la observación de que los antipsicóticos atípicos sean antagonistas del receptor 5-HT<sub>2A</sub> (Meltzer et al 1989a; Meltzer 2004), indica una importante implicación del sistema serotoninérgico en la fisiopatología de la esquizofrenia y en su tratamiento. Se postula que gracias a este efecto de bloqueo del receptor 5-HT<sub>2A</sub> los antipsicóticos atípicos son capaces de revertir los síntomas de la esquizofrenia sin necesidad de bloquear un porcentaje tan alto de los receptores dopaminérgicos D2 como los antipsicóticos clásicos, de forma que realizan su función terapéutica sin provocar los graves efectos secundarios de estos últimos (Meltzer et al 1999; Kapur et al 1999). De acuerdo con esto, estudios preclínicos han mostrado que el antagonismo del receptor 5-HT<sub>2A</sub> y el agonismo 5-HT<sub>1A</sub> pueden disminuir los déficits cognitivos provocados por el antagonismo NMDA (Carli et al 2006)

Posiblemente, este rol en el tratamiento de la esquizofrenia esté relacionado con el importante papel que el receptor 5-HT<sub>2A</sub> juega en procesos de memoria operativa (Williams et al 2002). Existe un mayor número de estos receptores en áreas del cerebro involucradas en cognición y percepción, y la corteza prefrontal es particularmente rica en este tipo de receptor (Pompeiano et al 1994; Amargos-Bosch et al 2004), dónde lo encontramos expresado tanto en neuronas piramidales como en interneuronas GABAérgicas (Santana et al 2004). A pesar de esto, la mayor proporción en neuronas piramidales y el efecto global excitador del DOI sugieren que su acción sobre los receptores 5-HT<sub>2A</sub> de neuronas piramidales de la corteza prefrontal es predominante sobre su acción en las interneuronas (Bortolozzi et al 2003). Un potente antagonismo del receptor 5-HT<sub>2A</sub> como el que presentan algunos antipsicóticos atípicos estaría bloqueando la hiperactividad de las neuronas piramidales corticales, restaurando así unos niveles normales de actividad. Además, estos fármacos de nueva generación poseen también afinidad por otros receptores serotoninérgicos, como son el 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub> (Meltzer 1999; Millan 2000; Ichikawa et al 2001; Meltzer 2004; Roth et al 2004), reforzando la idea de mecanismos diferentes del dopaminérgico para el tratamiento de la esquizofrenia. De todas formas y pese a estas características, se ha visto que el antagonismo 5-HT<sub>2A</sub> por si solo no posee efecto antipsicótico, sigue siendo requerida una acción de bloqueo de los receptores de dopamina D2 para el efecto terapéutico.

### **1.3.5. Hipótesis glutamatérgica**

La hipótesis glutamatérgica está principalmente basada en los efectos de los antagonistas no competitivos del receptor de glutamato NMDA: ketamina, fenciclidina (PCP, polvo de ángel) y MK-801 (dizocilpina). La administración de estos fármacos provoca la aparición de síntomas esquizofrénicos en individuos sanos y exacerba la sintomatología en pacientes de esquizofrenia (Javitt and Zukin 1991; Krystal et al 1994; Malhotra et al 1996; Tamminga 1998; Newcomer et al 1999; Krystal et al 2003).

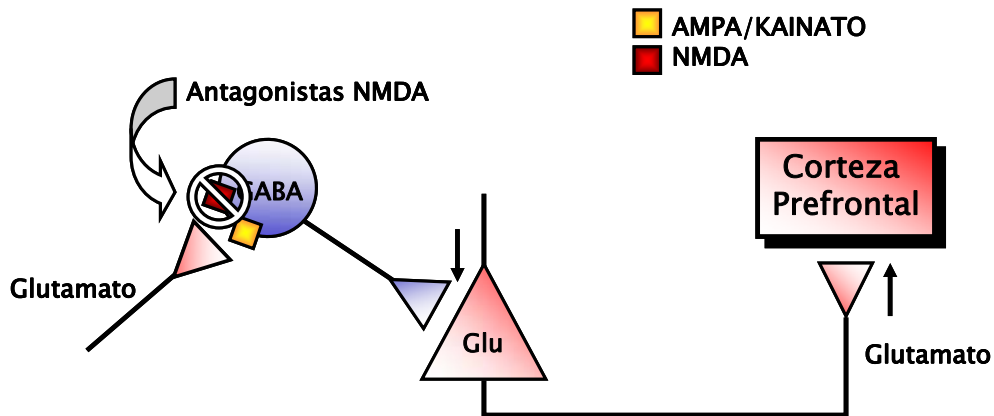
Está descrito que la administración de antagonistas NMDA provocan graves alteraciones en la memoria operativa y otras funciones cognitivas como la PPI -

déficits que pueden ser revertidos mediante la administración de antipsicóticos atípicos con más efectividad que con los fármacos clásicos (Abi-Saab et al 1998; Olney et al 1999; Geyer et al 2001; Aultman and Moghaddam 2001; Tsai and Coyle 2002). En ratas, la administración de ketamina, PCP y MK-801 causa hiperlocomoción y movimientos estereotipados como son ataxia, postura aplanada del cuerpo, abducción de las patas traseras, balanceo de la cabeza, caídas torpes, etc. (Hertel et al 1995; Adams and Moghaddam 2001; Homayoun et al 2004), que podrían ser representativos de la enfermedad en humanos (Moghaddam and Adams 1998; Mohn et al 1999; Jentsch and Roth 1999). A parte de este característico cuadro de comportamiento alterado, la administración de estos fármacos provoca unos importantes cambios neuroquímicos como es el incremento de la concentración extracelular de glutamato (Moghaddam et al 1997; Adams and Moghaddam 2001; Lorrain et al 2003; Ceglia et al 2004; Calcagno et al 2006), dopamina (Schmidt and Fadaye 1996; Adams and Moghaddam 1998; Mathe et al 1999; Adams and Moghaddam 2001) y serotonina (Martin et al 1998; Millan et al 1999; Adams and Moghaddam 2001; Calcagno et al 2006) en la CPFm de la rata. Al igual que en el caso de la neuroquímica, los experimentos de electrofisiología muestran también un incremento de la actividad de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal como consecuencia de la administración sistémica de estos fármacos (Suzuki et al 2002; Jackson et al 2004; Kargieman et al 2007; Kargieman et al 2008) al mismo tiempo que se daban los cambios de la conducta citados. Este aumento de la actividad también se ha reflejado en estudios de c-fos donde se puede ver un fuerte incremento de su señal en la corteza y el tálamo, siendo posible revertir este aumento mediante la administración de antipsicóticos (Kargieman et al 2007; Kargieman et al 2008).

Una de las características más importantes y destacables de este modelo es que es el único que no solo emula los síntomas positivos, sino que también reproduce los síntomas negativos y cognitivos (Krystal et al 1994; Jardemark et al 2000; Krystal et al 2003). A diferencia de otros modelos farmacológicos como el de la amfetamina, una sola exposición a PCP o ketamina puede provocar un cuadro psicótico y un déficit cognitivo en individuos sanos durante horas o incluso días (Krystal et al 1994; Jardemark et al 2000; Krystal et al 2003). Es, pues, el único modelo que presenta un paralelismo clínico entre los síntomas en humanos y en animales de experimentación al reproducir de forma más precisa (Javitt and Zukin 1991) los síntomas negativos (alteraciones del comportamiento social) y cognitivos (alteraciones de la memoria operativa a las dosis que incrementan la actividad de las neuronas de la PFC) (Jackson et al 2004). Curiosamente, los niños son relativamente resistentes a los efectos de los antagonistas NMDA, reflejando quizás el hecho de que la esquizofrenia no se desarrolla hasta edades más avanzadas (Coyle 2006).

Todos estos datos plantean una importante paradoja pues, ¿cómo es posible que al antagonizar un receptor activador como es el receptor NMDA veamos un incremento de actividad y de la liberación de neurotransmisores cuando sería más lógico esperar una inhibición?. Para responder esta cuestión, la hipótesis más aceptada actualmente es la hipótesis de la desinhibición (Moghaddam et al

1997; Krystal et al 2003; Homayoun and Moghaddam 2007b). Según ésta, los antagonistas NMDA harían su efecto sobre neuronas GABAérgicas tónicamente activas que controlarían una conexión glutamatergica, excitadora. Al bloquear los receptores NMDA de estas neuronas estaríamos anulando su actividad y, consecuentemente, desinhibiendo la neurotransmisión glutamatergica que llevaría al exceso de actividad y de neurotransmisión serotoninérgica y dopaminérgica observados en la corteza prefrontal (**figura 4**).



**Figura 4** – Esquema de la hipótesis del antagonismo NMDA como causante de los diferentes cambios neuroquímicos observados en la esquizofrenia. Estos fármacos bloquearían la actividad de neuronas GABAérgicas tónicamente activas, provocando una desinhibición y consecuentemente una hiperactivación de la corteza prefrontal.

Actualmente, se desconoce en qué área o áreas del cerebro están estas neuronas GABAérgicas afectadas por los antagonistas NMDA. A diferencia de todos los efectos observados con la administración sistémica, cuando estos fármacos se perfunden de forma local en la corteza prefrontal, no provocan ningún cambio en la actividad de las neuronas piramidales ni en la conducta del animal (Suzuki et al 2002; Jodo et al 2005), sugiriendo que realizan su efecto en algún área externa a la corteza prefrontal como puede ser el hipocampo, tálamo, etc. En contradicción con estos datos que sugieren una falta de efecto local de los antagonistas NMDA en la corteza prefrontal, datos recientes cuestionan esta afirmación. Un estudio del grupo de Bitá Moghaddam (Homayoun and Moghaddam 2007b) muestra una inhibición de la actividad de las neuronas GABAérgicas de la CPFm que precede a una activación de las neuronas piramidales corticales tras la administración sistémica de MK-801. Estos resultados sugieren un efecto local en la corteza de los antagonistas NMDA, un bloqueo de las interneuronas GABAérgicas seguido de una desinhibición de las neuronas piramidales.

Coincidiendo con estos datos, encontramos estudios que muestran una disminución del marcaje de parvalbúmina (PV) en las neuronas GABAérgicas de la CPFm con la administración prolongada de antagonistas NMDA (Cochran et al 2003). El hecho de que no haya pérdida del número de células, se ha relacionado

con una afectación en la funcionalidad de estas neuronas (Cochran et al 2003). Estas observaciones, junto con el hecho de que los receptores NMDA de estas neuronas son más sensibles al antagonismo NMDA (Grunze et al 1996; Li et al 2002; Coyle 2006), apoyan la citada hipótesis: los antagonistas NMDA bloquearían la actividad de las neuronas GABAérgicas de la corteza prefrontal, provocando así una desinhibición, una hiperexcitación de las neuronas piramidales de la misma que podría conducir a las alteraciones en la neurotransmisión cortical previamente comentadas. En la corteza prefrontal, las neuronas GABAérgicas que contienen PV son las neuronas en cesto o *basket cells* y las neuronas en candelabro o *chandelier*. Ambos tipos neuronales son responsables del control de la actividad general de los circuitos de la CPF debido, entre otras cosas, a la gran cantidad de contactos sinápticos que presentan. Estas neuronas juegan un importante papel en la generación de oscilaciones corticales, las cuales se encuentran alteradas en esquizofrenia (Cho et al 2006; González-Burgos and Lewis 2008). Se ha propuesto que en la corteza prefrontal los receptores NMDA regulan preferentemente la actividad de las interneuronas GABAérgicas. En estas neuronas PV-positivas, los receptores NMDA serían los principales responsables del nivel de excitación de la neurona, estando tónicamente activos y actuando como un “sensor” de la actividad de los circuitos corticales mientras que en las neuronas piramidales estarían más relacionados con funciones de plasticidad sináptica (Olney et al 1999; Lisman et al 2008). Los previamente comentados datos de electrofisiología refuerzan esta hipótesis al sugerir que los receptores NMDA regulan tónica y preferencialmente la actividad de las interneuronas GABAérgicas mientras que la actividad basal de las neuronas piramidales no estaría directamente controlada por los receptores NMDA si bien sería susceptible de desinhibición (Grunze et al 1996; Li et al 2002; Homayoun and Moghaddam 2007b; Lisman et al 2008).

Así pues, la administración de ketamina, PCP o MK-801 bloquearía los receptores NMDA de estas neuronas GABAérgicas corticales PV-positivas, reduciendo así su actividad. Esto produciría una desinhibición de la neurona piramidal y, consecuentemente, una hiperexcitación de los circuitos corticales, induciendo así las alteraciones en la neurotransmisión previamente descritas. Además, con el sensor bloqueado por el antagonista NMDA, la neurona GABAérgica no sería capaz de responder a este exceso de actividad de la red cortical y restaurar así una función cognitiva y perceptual normal (Lisman et al 2008). Esta es, de hecho, la hipótesis en la que se centra la presente tesis doctoral.

## 2. LA CORTEZA PREFRONTAL

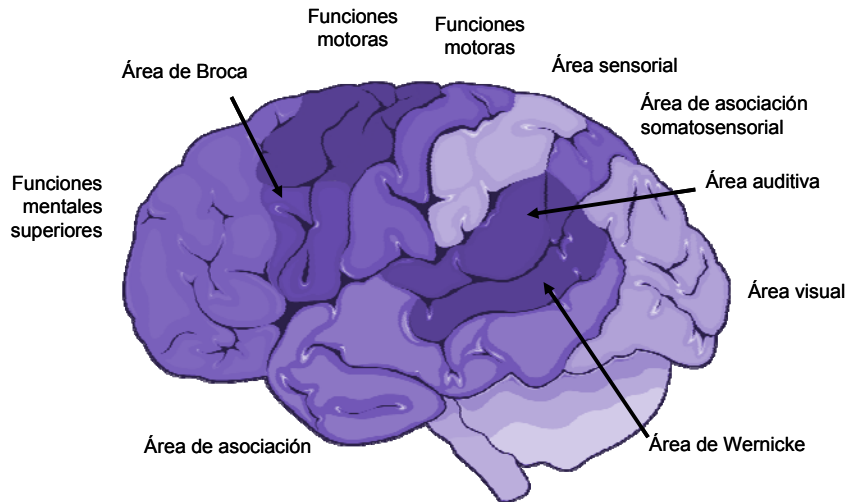
La corteza prefrontal es la parte más rostral del lóbulo frontal, constituido también por la corteza motora y premotora. Mientras que éstas dos últimas participan en la generación de movimientos, la corteza prefrontal está implicada en procesos cognitivos y motivacionales/emocionales (Fuster 2001) (**figura 5**).

La fisiología del córtex cerebral está estructurada de manera jerárquica. En el primer nivel, las áreas sensoriales y motoras reciben las entradas sensoriales y

ejecutan funciones motoras específicas. Áreas más complejas y evolucionadas como las cortezas de asociación reciben la información de las áreas sensoriales y motoras primarias y realizan funciones más integradoras. La corteza prefrontal representa el máximo nivel de esta jerarquía, realizando la representación, planificación y ejecución de las acciones y, en consecuencia, no presenta conexiones con cortezas sensoriales o motoras primarias pero sí con cortezas asociativas (Fuster 2001).

La corteza prefrontal es una región clave en la fisiopatología de la esquizofrenia pues juega un papel primordial en un gran número de funciones superiores como son la cognición, el control de la conducta y las emociones, la adaptación al medio, etc. (Fuster 1997), funciones que se ha descrito que están alteradas en pacientes esquizofrénicos (Lewis and Lieberman 2000). Se ha observado un metabolismo energético reducido en pacientes de esquizofrenia (sobretudo con respecto a la sintomatología negativa) o depresión (Andreasen et al 1997; Drevets 2000; Drevets 2001; Potkin et al 2002) así como déficits de la memoria operativa o a corto plazo, que es el proceso operativo característico de la corteza prefrontal. Los pacientes esquizofrénicos presentan una hipofrontalidad (activación insuficiente de la corteza prefrontal durante la realización de tareas que requieren el uso de la memoria a corto plazo) que se correlaciona con la presencia y gravedad de los síntomas negativos y los déficits cognitivos (Andreasen et al 1992; Tamminga et al 1992; Weinberger and Gallhofer 1997). Más aún, se ha visto que los niveles de N-acetilaspártato (NAA), marcador de integridad neuronal, están disminuidos en la CPF, el hipocampo y el lóbulo temporal (Tsai and Coyle 1995), y en el modelo animal de los antagonistas NMDA está disminuido el marcaje de PV en las neuronas GABAérgicas de la CPF, alteración que se revierte con la administración de antipsicóticos atípicos (Cochran et al 2003). Así pues, estas alteraciones en la corteza prefrontal y sus funciones en pacientes de esquizofrenia, sugieren la importante implicación de esta región del córtex en esta enfermedad.

La corteza prefrontal puede dividirse en tres áreas principales: orbital, medial y lateral. Las regiones orbital y medial participan en el comportamiento emocional mientras que la región lateral, que llega a su desarrollo máximo en humanos, realiza funciones cognitivas como es la organización temporal de la conducta, el habla y el razonamiento (Fuster 2001). Hablando de funciones tan complejas no podemos limitarlas a tan sólo una zona determinada, sino que necesitan de la participación de otras regiones del cerebro. Así pues, las funciones de la corteza prefrontal no dependen tanto de su estructura topográfica, sino de las conexiones que presenta con otras áreas tanto corticales como subcorticales.



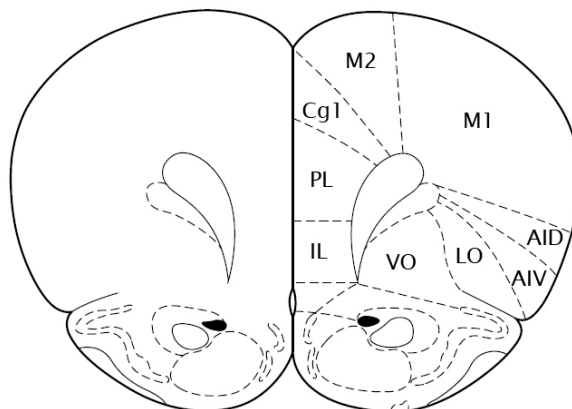
**Figura 5** – Representación del córtex humano y las principales funciones de las áreas más representativas. Modificado de Les Laboratoires Servier – all rights reserved. Copyright © 2006.

En primates, la CPF comprende las áreas 8-13, 24, 32, 46 y 47 del mapa citoarquitectónico de Brodmann (1909). Filogenéticamente, es una de las últimas cortezas que aparecen en la evolución y es en humanos donde alcanza su máximo tamaño siendo el área más extensa del hemisferio cerebral, representando un 30% aproximadamente del neocórtex (Uylings and van Eden 1990; Fuster 2001). En humanos la corteza prefrontal tiene un desarrollo tardío y no alcanza su madurez (entendida ésta como la sinaptogénesis y mielinización de la región) hasta la adolescencia (Uylings and van Eden 1990; Paus et al 1999; Sowell et al 1999; Fuster 2001). Este hecho coincide en el tiempo con la aparición de las funciones cognitivas superiores como son el lenguaje proposicional, el razonamiento y las funciones ejecutivas, remarcando el papel crucial de la CPF en estas conductas complejas.

Clásicamente se ha definido la corteza prefrontal como el área que recibe conexiones del núcleo mediodorsal del tálamo, criterio que ha servido para identificar la CPF en diversas especies (Fuster 1997). Junto con ésta, la corteza prefrontal presenta conexiones con un gran número de estructuras corticales y subcorticales. La CPFm proyecta mayoritariamente al tálamo, a los núcleos aminérgicos del mesencéfalo (núcleo del rafe, locus coeruleus, área tegmental ventral), al hipotálamo lateral, al sistema límbico (amígdala e, indirectamente, al hipocampo), a los gánglios basales (caudado-putamen, núcleo *accumbens*) y a la habénula lateral (Groenewegen et al 1997; Groenewegen and Uylings 2000). Gran parte de estas conexiones son recíprocas. La CPF recibe aferencias de los núcleos aminérgicos, del tálamo, del sistema límbico y del hipotálamo. Tanto la amígdala como el hipotálamo proyectan a las partes medial y ventral de la CPF (Ray and Price 1993). Por su parte, las aferencias del hipocampo llegan, sea directa o indirectamente, a prácticamente todas las regiones de la corteza prefrontal (Barbas and Blatt 1995)

Las conexiones del tallo cerebral, diencefalo y sistema límbico aportan a la CPF información relacionada con el estado interno del animal, su motivación, la parte más visceral de la cognición. A su vez, la amígdala y el hipotálamo, proyectando a la corteza prefrontal ventral y medial, complementan esta información con el significado emocional de los diferentes estímulos sensoriales recibidos (LeDoux 1993). Prácticamente todas las regiones de la corteza prefrontal reciben conexión, ya sea directa o indirecta del hipocampo, que aportaría la información referida al contexto espacial de la acción (Floresco et al 1999).

A su vez, las regiones medial, orbital y lateral, están interconectadas entre ellas. Una importante parte de la conexión cortico-cortical es interhemisférica y ésta es prácticamente toda recíproca y organizada topográficamente (Yeterian and Pandya 1985; Cavada and Goldman-Rakic 1989a; Cavada and Goldman-Rakic 1989b).



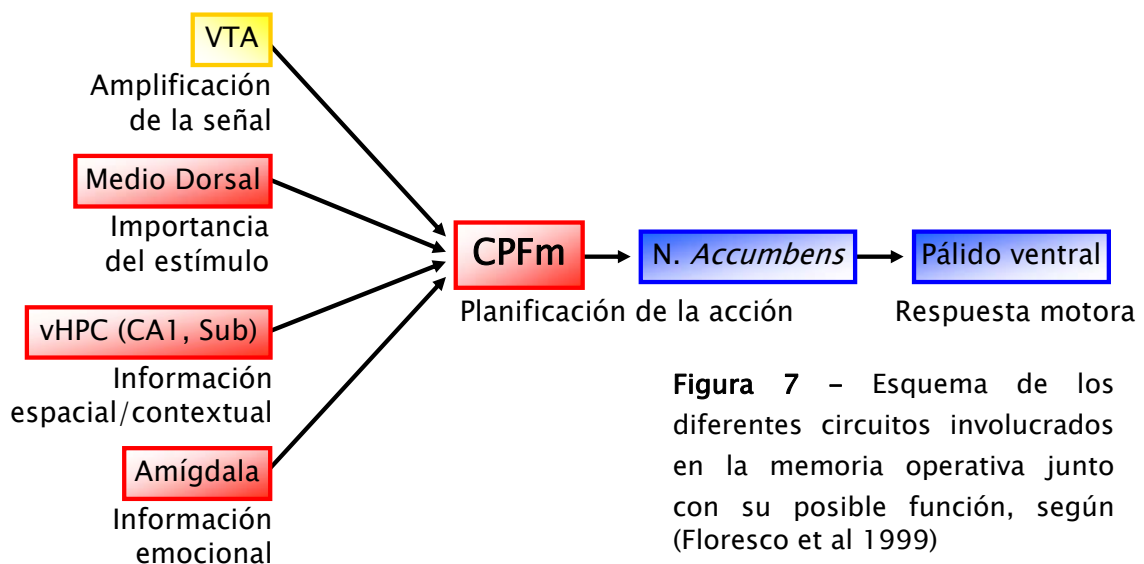
**Figura 6** – Esquema de una sección coronal de rata (+3.2 mm. anterior a Bregma, atlas de Paxinos y Watson 1998). AID y AIV– corteza insular agranular dorsal y ventral. VO y LO– corteza orbital ventral y lateral. Cg1– corteza cingulada. PL e IL– corteza prelímbica e infralímbica. M1 y M2– corteza motora 1 y 2.

Respecto a la rata, la corteza prefrontal se puede dividir en tres regiones principales: la lateral (área insular agranular dorsal (AID) y ventral (AIV), la orbital (ventral al cuerpo calloso) y la medial (**figura 6**). En este trabajo hemos estudiado principalmente esta última, la CPF medial, la cual se divide en 3 zonas, de dorsal a ventral: cingulada superior (Cg1), prelímbica (PL) e infralímbica (IL). Debemos remarcar que pese a estos parecidos estructurales, no podemos usar estos criterios para comparar regiones de especies tan separadas como rata y humano sino que, una vez más, es la gran conectividad de estas áreas con otras estructuras lo que define su función (Fuster 2001). Así pues, la región prelímbica estaría más implicada en funciones límbicas y cognitivas mientras que la zona infralímbica regularía funciones viscerales y autónomas.



## 2.1. FUNCIONES

El proceso fundamental en el que se basa la operatividad de la corteza prefrontal es la memoria operativa o *working memory*. Este término se aplica al tipo de memoria que es activa y relevante solo durante un corto período de tiempo, normalmente en la escala de segundos (Goldman-Rakic 1995). Es el proceso por el cual se “recuperan” conocimientos previamente adquiridos y se utilizan correctamente, la habilidad para mantener eventos y conceptos en mente por cortos períodos de tiempo. Experimentos realizados en monos muestran que neuronas piramidales de la CPF, concretamente del área dorsolateral, se mantienen activas en ausencia de estímulos, durante los períodos de tiempo en que el animal debe recordar un estímulo previo, mientras que en áreas sensoriales o motoras, las neuronas sólo muestran actividad durante la presentación del estímulo o durante la acción motora (Goldman-Rakic 1996).



**Figura 7** - Esquema de los diferentes circuitos involucrados en la memoria operativa junto con su posible función, según (Floresco et al 1999)

El conocimiento que tenemos de las complejas funciones de integración de la corteza prefrontal se ha desarrollado a partir de numerosos estudios neuropsicológicos en humanos así como de lesiones que han permitido estudiar los procesos afectados en cada caso, de forma que es posible vincular funciones a regiones de la CPF (Fuster 2001). Así pues, se ha visto que lesiones de la corteza prefrontal orbital producen grandes cambios de personalidad (impulsividad, irritabilidad, desinhibición, conducta de alto riesgo, etc.). Quizás el caso más famoso es el de Phineas Gage, obrero del ferrocarril que perdió gran parte de su corteza prefrontal en un accidente laboral, volviéndose irritable e impulsivo a raíz de esa lesión (Fuster 1997). Esto muestra su papel en la conducta emocional y su modulación para un correcto funcionamiento social. En cambio, las lesiones de la CPF medial han mostrado su importancia en procesos de atención y concentración. Los daños en esta región provocan dificultad para iniciar movimientos y habla, así como también apatía, desinterés e incapacidad de concentrarse (Cummings 1993). Por su parte, las lesiones del córtex prefrontal lateral provocan incapacidad para

formular y ejecutar planes, representación y construcción de frases y realización de secuencias de acciones en el tiempo, sugiriendo la importancia de esta área en la organización temporal de la conducta (Fuster 2001).

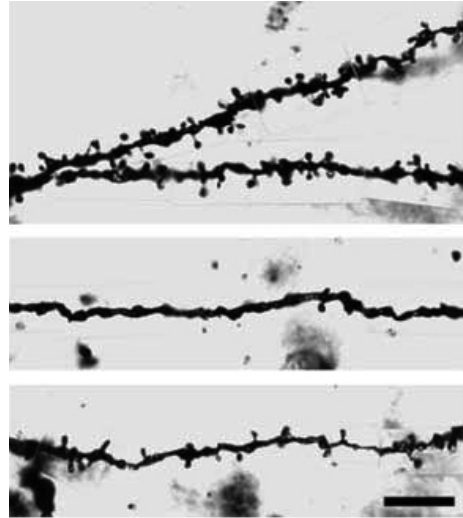
## 2.2. CITOARQUITECTURA

En primates, la corteza prefrontal, así como otras regiones corticales de asociación, está formada por seis capas que se pueden diferenciar según su grosor, empaquetamiento y tipos celulares presentes. En la CPFm de rata, estas capas se sitúan en la región medial del cerebro, siendo las capas más superficiales las más próximas a esta línea media y con las capas más profundas más laterales. En ratas no existe la capa IV granular (Groenewegen and Uylings 2000) y, debido al empaquetamiento, se distinguen sólo 4 capas: I, II/III, V y VI (Swansson 1998).

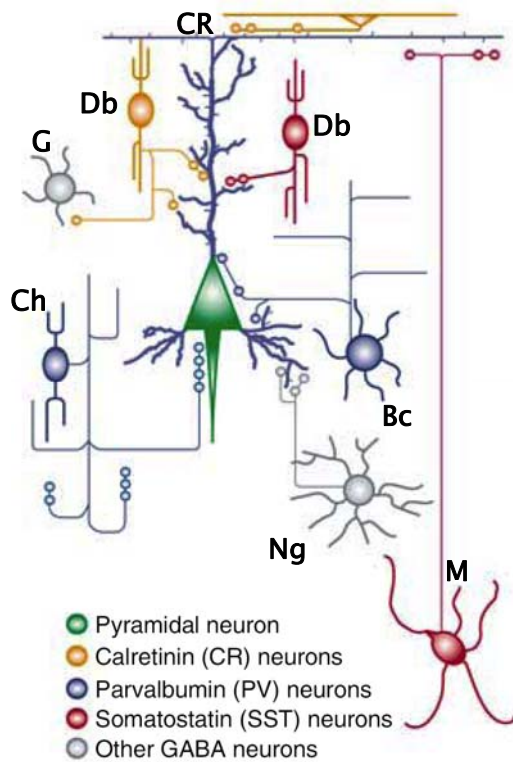
En la corteza distinguimos dos tipos principales de células: las neuronas piramidales y las interneuronas GABAérgicas.

Las neuronas piramidales son la población mayoritaria en la corteza, representando un 75–80 % del total y son glutamatérgicas, es decir, excitadoras. Están formadas por un cuerpo o soma de unas 25–50  $\mu\text{m}$  de diámetro. Estos somas se encuentran distribuidos en las capas II/III (pirámides pequeñas), en la capa V (pirámides grandes) y en la capa VI, mientras que no hay en la capa I (McCormick et al 1985). Del cuerpo celular surgen por lo general una o dos dendritas apicales orientadas perpendicularmente a la línea media y que proyecta a capas superficiales (como a capa I). Presentan también un conjunto de dendritas basales más cortas, dispuestas de forma radial alrededor del cuerpo celular. En ambos tipos de dendritas se pueden observar protuberancias: las espinas dendríticas, donde se realiza el contacto de la gran mayoría de las entradas sinápticas excitadoras a estas células (DeFelipe 2002). Además, se ha observado una importante disminución de estas espinas en las dendritas de neuronas piramidales de capa III de pacientes de esquizofrenia (**figura 8**). Estas células integran todas las entradas que reciben, excitadoras e inhibitoras y, dependiendo del número e intensidad de estas, modificará su nivel de actividad. Existe una gran especificidad laminar de las proyecciones de la CPF, de forma que las neuronas piramidales de las capas II/III suelen proyectar a otras áreas de la corteza mientras que las de capa V proyectan a la mayoría de estructuras subcorticales como el tálamo, aunque también a otras zonas corticales.

**Figura 8** – Tinción de Golgi de dendritas basilares y espinas de neuronas profundas de capa III de corteza prefrontal de un sujeto control (arriba) con dos pacientes de esquizofrenia (abajo) donde se puede observar la marcada disminución de espinas dendríticas que se da en esta enfermedad (Glantz and Lewis 2000).



El otro tipo celular presente en la corteza, las neuronas GABAérgicas (**figura 9**), representan el 15–30% de la población cortical y proporcionan el control local inhibitorio (Somogyi et al 1998; DeFelipe 2002). Las neuronas GABAérgicas de la corteza no son de proyección, es decir, son interneuronas que realizan sus contactos sinápticos dentro de la corteza, no con otras estructuras. A diferencia de las neuronas piramidales, su morfología es muy variada y de hecho se las puede clasificar por la forma de su soma y por el tipo de árbol axonal. De esta forma, distinguimos las interneuronas en cesto o *basket cells*, en candelabro o *chandelier*, en dos pomos o *double bouquet*, bipolares, Martinotti y las de forma neuroglial. Según la forma de su árbol axonal, se pueden dividir en interneuronas de grupo I o local, de grupo II u horizontal o de grupo III o vertical (DeFelipe 2002). Otra clasificación habitual de las interneuronas corticales es según el tipo de proteína de unión a calcio que expresen: calbindina (CB), calretinina (CR) o parvalbúmina (PV), siendo las *double bouquet* las que expresan mayormente CB y junto con las bipolares, CR; mientras que son las neuronas en cesto y en candelabro las que presentan marcaje de PV (Benes and Berretta 2001) (**figura 9**). Las neuronas en cesto son las únicas interneuronas corticales que reciben entradas directas desde el tálamo (Benes and Berretta 2001). Junto con las neuronas en candelabro, se caracterizan por ser neuronas de disparo rápido, las cuales presentan además conexiones entre ellas, tanto químicas como eléctricas (Benes and Berretta 2001). Estos tipos neuronales juegan un rol de gran importancia pues inervan densamente el soma y el principio del cono axónico de la neurona piramidal, ejerciendo así un fuerte control inhibitorio al contactar con la región donde se genera el potencial de acción. Se ha descrito también su papel clave en la generación de oscilaciones corticales (González-Burgos and Lewis 2008). Además, cada una de estas interneuronas PV positivas presenta contactos con una gran cantidad de neuronas piramidales, de forma que una única célula puede llegar a tener más de 200 sinapsis con neuronas piramidales (Cobb et al 1995), dando lugar a vastas redes de conexiones.



**Figura 9** – esquema de los diferentes tipos de interneurona GABAérgica que podemos encontrar en la corteza prefrontal. Estas se pueden diferenciar por la proteína de unión a calcio que expresan (parvalbúmina o calretinina), por el neuropéptido (somatostatina) o según su morfología. Las neuronas en candelabro (Ch) o en cesto (Bc) contactan con el segmento inicial del axón o con el cuerpo celular, respectivamente, de las neuronas piramidales, ejerciendo un fuerte control inhibitorio. En cambio, las *double bouquet* (Db), las neurogliaformes (Ng) y Martinotti (M) forman sinapsis con las dendritas apicales, más alejadas del soma. Por último, las Cajal-Retzius (CR) contactan tanto las dendritas distales de las neuronas piramidales como otras células GABAérgicas (G). Extraído de (Lewis et al 2005; Lewis and González-Burgos 2008).

En efecto, el funcionamiento de la corteza está basado en estos microcircuitos o redes neuronales formados por neuronas piramidales e interneuronas GABAérgicas. La salida principal del circuito es el axón de la neurona piramidal, que, como hemos dicho, está fuertemente controlado por las conexiones GABAérgicas. Además, estas conexiones pueden ser tanto intralaminares como interlaminares o columnares (Somogyi et al 1998; DeFelipe 2002). En estas redes, una de las principales funciones de las interneuronas es la regulación homeostática de la actividad piramidal, supuestamente utilizando los receptores NMDA como sensor para ejercer este control negativo (Lisman et al 2008). De hecho, está descrito que el número de receptores NMDA en neuronas GABAérgicas parece ser de gran importancia para la estabilidad de la red neuronal en procesos de memoria operativa (Woo et al 2008). En la corteza prefrontal de pacientes esquizofrénicos se pueden encontrar alteraciones, tanto morfológicas como neuroquímicas, de estos circuitos corticales como por ejemplo una disminución del tamaño del soma de neuronas piramidales, un decremento del número de espinas dendríticas, una reducción de los niveles de GAD 67 y del marcaje de PV en las interneuronas GABAérgicas, etc. (Andreasen et al 1992; Tamminga et al 1992; Lewis and Lieberman 2000). Esta alteración en la expresión de PV también se puede observar en el modelo de esquizofrenia de los antagonistas NMDA, donde una administración prolongada de PCP provoca una disminución de parvalbúmina

cortical sin cambio en el número de neuronas, alteración que puede ser revertida por la administración de antipsicóticos atípicos pero no por los fármacos clásicos (Cochran et al 2003). La disminución descrita de la expresión de parvalbúmina reflejaría una menor actividad (o en todo caso, una disrupción en su función) de la neurona GABAérgica como consecuencia del bloqueo NMDA. Esto coincide con la observación de que este tipo de neuronas presenta una mayor sensibilidad a los efectos de los antagonistas NMDA (Grunze et al 1996; Li et al 2002). Así pues, estos datos sugieren la existencia de una disfunción de las neuronas GABAérgicas de CPFm en la esquizofrenia, pudiendo ser una alteración clave en la fisiopatología de la enfermedad.

### **2.3. CONECTIVIDAD**

Como se ha mencionado previamente, la corteza prefrontal es el córtex asociativo de mayor nivel, procesando funciones que están íntimamente ligadas a su vasta conectividad con otras estructuras, tanto corticales como subcorticales, de forma que son estas aferencias y eferencias las que definen las diferentes funciones de la CPF.

A continuación, analizaremos más en detalle varias de estas regiones, los núcleos que actualmente gozan de mayor interés en el estudio de la fisiopatología de la esquizofrenia. Comentaremos pues la interacción de la corteza con los núcleos del rafe y de la VTA (por las graves alteraciones serotoninérgicas y dopaminérgicas observadas) así como las principales entradas excitatorias subcorticales a la CPF: núcleo mediodorsal (MD) del tálamo e hipocampo. Según la hipótesis de que los antagonistas NMDA realizarían un bloqueo de neuronas GABAérgicas tónicamente activas provocando la consecuente desinhibición de circuitos glutamatérgicos, es importante comentar como se ejerce la regulación inhibitoria de estas estructuras subcorticales. En el caso del hipocampo, el control inhibitorio es realizado por interneuronas GABAérgicas. Sin embargo, en el caso del núcleo medio dorsal el control se realiza principalmente por el núcleo reticular del tálamo, la sustancia nigra pars reticulata y por el pálido ventral pues está descrito que el tálamo de rata no contiene interneuronas (Bentivoglio et al 1991; Benson et al 1992).

Por último, estudiaremos la importancia de la conexión cortico-cortical. Está descrito que el cuerpo caloso, el haz de fibras que conecta las cortezas de ambos hemisferios, presenta alteraciones del desarrollo en pacientes esquizofrénicos y con desorden bipolar (Carr and Sesack 1998; Gogtay et al 2008; Aydin et al 2008).

#### **2.3.1. Tálamo**

La CPF y el tálamo presentan unas fuertes conexiones recíprocas, el tálamo es una importante fuente de aferencias excitatorias a la corteza (vías tálamo-corticales) y a su vez la CPF modula este flujo de información mediante las vías cortico-talámicas (Groenewegen and Uylings 2000). La proyección del núcleo

medio dorsal (MD) a la CPF está topográficamente organizada y dada su especificidad, ha servido como criterio para identificar la CPF en gran cantidad de especies (Fuster 2001). Posteriormente se ha demostrado que el MD también proyecta a las áreas corticales premotora y motora primaria (Groenewegen and Uylings 2000), aunque podemos seguir considerando que la CPF es la parte que presenta unas conexiones recíprocas más fuertes con este núcleo talámico. Por su parte, en rata, el núcleo MD proyecta principalmente a las zonas prelímbica e infralímbica de la CPFm, siendo la región prelímbica la que recibe la mayoría de las aferencias talámicas provenientes del segmento medial del núcleo MD (Conde et al 1990).

La CPFm proyecta fuertemente al tálamo, las conexiones cortico-talámicas hacia el núcleo MD proceden de las neuronas de la capa VI de la corteza prefrontal (Groenewegen et al 1997; Groenewegen and Uylings 2000). A parte de proyectar al núcleo MD, la CPFm (la región PL) contacta con otros núcleos talámicos como son el paraventricular y el núcleo reuniens (Vertes 2004; Vertes et al 2007).

Existen varias evidencias que implican al tálamo en la fisiopatología de la esquizofrenia. Estudios de marcaje de c-fos (marcador de actividad, señala neuronas cuya actividad se ha incrementado) muestran un incremento de la señal de c-fos en el tálamo de la rata tras la administración de antagonistas NMDA (Kargieman et al 2007; Kargieman et al 2008). Se ha observado también una desregulación de las oscilaciones electrofisiológicas características de las conexiones cortico-talámicas como consecuencia de estos fármacos (Kargieman et al 2007; Kargieman et al 2008). El hecho de que el tálamo sea un núcleo de “distribución” de información tanto visceral como sensorial a la corteza puede estar relacionado con que un mal funcionamiento de este núcleo lleve a informaciones sensoriales incorrectas (alucinaciones).

Uno de los núcleos que controlan la actividad del tálamo es el núcleo reticular (Zikopoulos and Barbas 2006), compuesto por neuronas GABAérgicas y dispuesto en forma de “capa” que recubre todo el tálamo, ejerciendo un importante control inhibitorio. Este núcleo actúa como un filtro de toda la información que llega y sale del tálamo (Pinault and Deschenes 1998). Las proyecciones tálamo-corticales y cortico-talámicas envían conexiones recurrentes a las neuronas GABAérgicas del núcleo reticular el cual, a su vez, proyecta de forma topográfica a los diferentes núcleos talámicos (Pinault and Deschenes 1998). En concreto, el córtex prefrontal proyecta sobretodo a la zona anterior del núcleo reticular, que a su vez controla los núcleos talámicos medio dorsal, ventral anterior y anterior medial (Zikopoulos and Barbas 2006)). Una hipótesis de la esquizofrenia postula que el núcleo reticular estaría afectado, siendo incapaz de realizar su función inhibitoria y consecuentemente llevando a una sobreexcitación del tálamo. En su funcionamiento normal, el núcleo reticular ejerce un filtro sobre la información sensorial que recibe el tálamo, silenciando el ruido (actividad espontánea de las neuronas talámicas) y permitiendo una llegada más clara de la señal sensorial así como facilitando la sincronización de las oscilaciones talámicas (Behrendt 2006). Un funcionamiento alterado de este filtro provocaría una interpretación errónea de las señales viscerales y sensoriales así como un incremento del ruido, lo cual podría

ser la causa de las alucinaciones en la esquizofrenia (Behrendt 2006). Se sabe que este núcleo tiene un rol fundamental en las oscilaciones entre tálamo y corteza, las cuales se encuentran alteradas tras la administración de antagonistas NMDA. Por otro lado, estudios de c-fos muestran que no hay un incremento en el marcaje en este núcleo, en línea con la idea de que sus neuronas inhibitorias estarían bloqueadas por los antagonistas NMDA (Kargieman et al 2007).

Otros núcleos inhibitorios que controlan el tálamo son la sustancia nigra pars reticulata (SNR) y el pálido ventral. Ambos están compuestos por neuronas GABAérgicas y presentan conexiones al núcleo MD del tálamo a la vez que, ambos también, reciben entradas de la CPFm. La SNR está clásicamente relacionada con los circuitos motores de los ganglios de la base, siendo la salida final hacia el tálamo. Por su parte, el pálido ventral está fuertemente regulado por el núcleo accumbens y está involucrado en la modulación de la actividad de las neuronas dopaminérgicas de la VTA.

### 2.3.2. Hipocampo

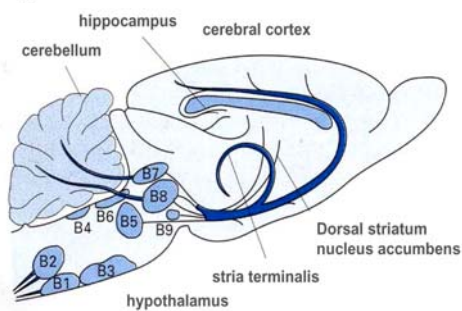
Esta extensa área del cerebro clásicamente se ha relacionado con los procesos de aprendizaje y memoria a largo plazo, aunque también se le atribuye un importante rol en el procesamiento de la información espacial y contextual. A nivel funcional, es característico de esta estructura los procesos de potenciación a largo plazo (LTP) por los cuales, la activación intensa de una conexión neuronal llevaría a cambios plásticos en las neuronas que la forman de manera que esa sinapsis reaccionará de forma más potente a ese estímulo concreto.

El hipocampo proyecta a corteza prefrontal, sobretudo a áreas prelímbica e infralímbica, constituyendo una de las mayores entradas glutamatérgicas (excitatorias) a la corteza. En el caso del hipocampo el control inhibitorio lo ejercen interneuronas GABAérgicas. Una importante particularidad de esta estructura es que, pese a que el hipocampo proyecta directamente a la corteza prefrontal, no existe una conexión directa de la CPFm al hipocampo (Beckstead 1979; Room et al 1985; Sesack et al 1989; Hurley et al 1991; Vertes 2002). El control de la CPF sobre el hipocampo se realiza de forma indirecta a través de dos estructuras: la corteza entorhinal y el núcleo *reuniens* del tálamo (Vertes et al 2006; Vertes et al 2007). Estas dos estructuras presentan conexiones recíprocas, tanto con la corteza prefrontal como con el hipocampo. La corteza entorhinal representa una de las principales entradas de información al hipocampo. Por otro lado, se ha observado que la estimulación del núcleo *reuniens* provoca una fuerte excitación en el área CA1 (cuerno de Amón) del hipocampo comparable con la que provoca una estimulación directa del área CA3 (Vertes et al 2007). Este núcleo recibe proyección de las zonas prelímbica e infralímbica de CPFm de rata y mediante estudios de trazado se ha observado la convergencia de estas fibras marcadas anterógradamente desde la CPFm y fibras marcadas retrógradamente desde el hipocampo (Vertes et al 2007), de forma que la CPFm excita las neuronas de este núcleo, las cuales a su vez proyectan a la CA1 y subículum (evitando las otras regiones del hipocampo) (Vertes et al 2006; Vertes et al 2007).

Existen varias evidencias que sugieren alteraciones del hipocampo en la esquizofrenia. Se ha observado una reducción del volumen hipocampal en el pródromo y en el primer episodio de individuos esquizofrénicos, lo cual además sugiere que esta afectación no es secundaria a la enfermedad o al tratamiento (Harrison 2004). La administración sistémica de antagonistas NMDA provoca un incremento de marcaje de c-fos en el hipocampo, indicador de un aumento de actividad en esta zona. Se ha visto que la inyección local de estos antagonistas en el hipocampo provoca un incremento de actividad de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal (Jodo et al 2005) y, en un plazo de tiempo más amplio, incrementa la densidad de receptores NMDA en el hipocampo (Gao and Tamminga 1994; Buck et al 2006).

### 2.3.3. Sistemas aminérgicos

Existe una fuerte conectividad recíproca entre la CPF y los núcleos aminérgicos del mesencéfalo: el área tegmental ventral (VTA), el locus coeruleus (LC) y los núcleos del rafe dorsal (NDR) y medial (NMR). La corteza ejerce un importante control sobre su actividad, siendo pues capaz de influir en la neurotransmisión monoaminérgica, tanto a nivel de la propia CPF como a nivel más global pues estos núcleos aminérgicos se caracterizan por innervar prácticamente todo el cerebro, de forma que el control de la corteza prefrontal influye a un gran número de funciones cerebrales (Groenewegen and Uylings 2000). En efecto, estos núcleos modulan la actividad de muchas áreas, incluyendo aquellas que a su vez proyectan a la corteza prefrontal.



**Figura 10** – Esquema de las vías serotoninérgicas en el cerebro de rata.

En el cerebro, todos los cuerpos de las neuronas serotoninérgicas se encuentran en los núcleos del rafe, no existen neuronas productoras de serotonina en ninguna otra región. El rafe dorsal (NDR) y el rafe medial (NMR) proyectan e inervan prácticamente toda la corteza (incluyendo la CPF medial) así como un gran número de estructuras subcorticales (**figura 10**). Así pues, la serotonina ejerce un efecto modulador sobre un gran número de estructuras, efecto cursado principalmente por los receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub>

(inhibidor) y 5-HT<sub>2A</sub> (excitador), ambos abundantes a nivel cortical, tanto en neuronas piramidales como en interneuronas GABAérgicas. De esta forma, la liberación de serotonina en la corteza producida por la activación de los núcleos del rafe puede provocar tanto excitaciones como inhibiciones (Hajos et al 2003; Puig et al 2003; Amargòs-Bosch et al 2004; Puig et al 2005, Celada et al 2007), aunque el efecto predominante sobre la CPFm es inhibitorio debido quizás a que los receptores 5-HT<sub>1A</sub> se encuentran en elevada densidad en el principio del cono



axónico, provocando así fuertes inhibiciones del potencial de acción (Puig et al 2004; Puig et al 2005).

Del mismo modo, han sido profundamente estudiadas las proyecciones de CPFm a los núcleos del rafe. Una subpoblación de neuronas piramidales de capa V (aproximadamente el 5%) (Gabbott et al 2005) proyecta al núcleo del rafe dorsal, controlando su actividad. Así pues, la excitación de la CPFm provoca una activación de las neuronas serotoninérgicas del rafe (Aghajanian and Wang 1977; Thierry et al 1979; Thierry et al 1983; Sesack et al 1989; Hajos et al 1998; Celada et al 2001) y como consecuencia de ello se puede observar un aumento de la liberación de serotonina extracelular en la corteza prefrontal. Esto se ve reflejado en que la administración de fármacos como por ejemplo el DOI, que estimulan receptores excitadores (5-HT<sub>2A</sub>,  $\alpha_1$ -adrenérgico, etc) presentes en las neuronas piramidales corticales provoca un aumento de actividad en las neuronas serotoninérgicas que se traduciría en un incremento de la liberación de 5-HT en corteza (Martin-Ruiz et al 2001; Bortolozzi et al 2005). Así pues, la concentración de serotonina cortical sería una medida indirecta del nivel de actividad de la CPFm.

En primates, las terminaciones dopaminérgicas inervan toda la corteza prefrontal, la corteza motora primaria y la corteza premotora. En rata, esta inervación es más densa en las áreas prefrontales (Groenewegen and Uylings 2000). Estos terminales dopaminérgicos (tirosina-hidroxilasa positivos) se encuentran en aposición con interneuronas GABAérgicas de capas profundas de la corteza (Sesack et al 1998; Benes 2000), las cuales a su vez presentan un abundante número de receptores de dopamina D2 (Vincent et al 1995; Khan et al 1998; Le Moine and Gaspar 1998). Así pues, la dopamina ejerce una acción inhibitoria en estas neuronas GABAérgicas a través dichos receptores. Esto no quiere decir que este sea el efecto de la dopamina en corteza pues tanto las neuronas inhibitoras como las neuronas piramidales presentan ambas receptores D1 (excitadores) y D2 (inhibidores) (Santana et al 2009), de forma que una regulación fina de la neurotransmisión dopaminérgica puede dar lugar a respuestas tanto excitadoras como inhibitoras dependiendo del balance de estimulación de ambas familias de receptores dopaminérgicos.

A su vez, la corteza prefrontal (medial, en ratas) presenta un importante control sobre la VTA y la *sustancia nigra pars compacta* (Sesack et al 1989; Carr and Sesack 2000b). La CPF inerva densamente las neuronas dopaminérgicas de la VTA que a su vez proyectan a la CPF y a neuronas GABAérgicas que también pueden proyectar a la corteza (Carr and Sesack 2000a). Estas dos poblaciones neuronales proyectan también al núcleo *accumbens* (NAcc) (Carr et al 1999; Carr and Sesack 2000a; Carr and Sesack 2000b). Así pues, la CPF puede controlar la actividad de las neuronas del VTA a través de la vía N. *Accumbens* → pálido ventral → VTA.

Por su parte, la noradrenalina (proveniente del *locus coeruleus*) también ejerce respuestas complejas en la corteza prefrontal debido a que puede actuar tanto sobre receptores  $\alpha_1$  o  $\alpha_2$  (Branchereau et al 1996; Arnsten 2004). En ratas, la CPF medial proyecta a las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* ejerciendo una acción excitadora (Jodo et al 1998; Amargos-Bosch et al 2003), aunque en

otros estudios se ha observado una acción inhibitoria de la corteza sobre el LC que estaría mediada por interneuronas del LC o de zonas adyacentes (Sara and Herve-Minvielle 1995).

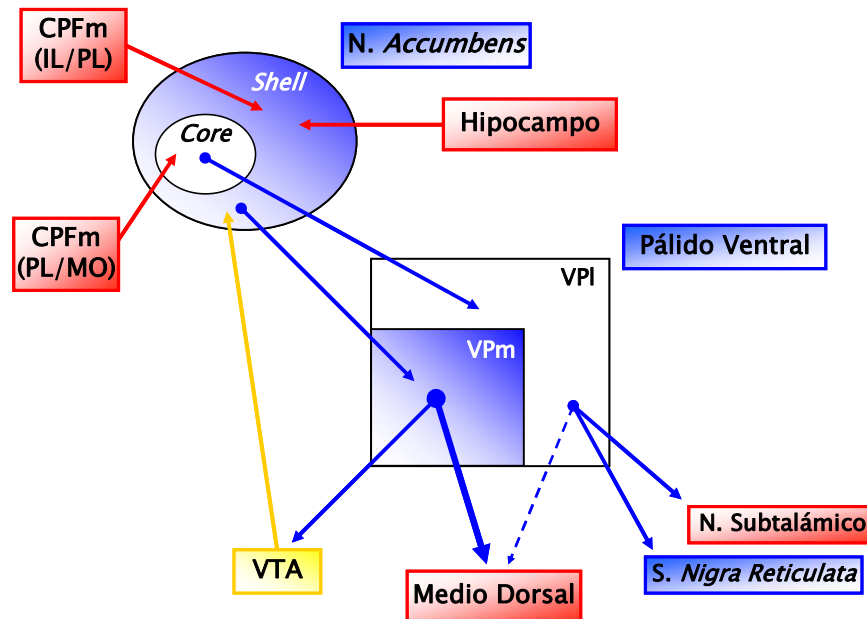
#### 2.3.4. Núcleo *accumbens* – pálido ventral

En varios de los apartados anteriores se ha mencionado la importancia de la conexión entre el núcleo *accumbens* (NAcc) y el pálido ventral. El NAcc es un núcleo formado por neuronas GABAérgicas de proyección del cual se distinguen dos partes, la zona exterior o *shell* y la zona interior o *core*. Se ha propuesto que el *core* juega un papel en la dirección de la conducta hacia un determinado objetivo basándose en el aprendizaje mientras que el *shell* estaría relacionado con las conductas de búsqueda de recompensa (Jongen-Relo et al 2003; Cassaday et al 2005; Goto and Grace 2008). Este núcleo es un componente clave del sistema límbico del cerebro como se puede ver por las conexiones que presenta con estructuras límbicas y corticales: recibe aferencias excitatorias del hipocampo (DeFrance and Yoshihara 1975; Kelley and Domesick 1982; DeFrance et al 1985), de la amígdala basolateral (Swanson and Cwan 1975; Groenewegen et al 1980; McDonald 1991) y de la corteza prefrontal (Beckstead 1979; Groenewegen et al 1980; Groenewegen et al 1999) que convergen sobre las mismas neuronas del NAcc (O'Donnell et al 1997). A su vez, el NAcc proyecta a los ganglios de la base, de los que destaca la fuerte conexión con el pálido ventral (Mogenson et al 1983; Mogenson and Nielsen 1983; Heimer et al 1991).

Por su parte, el pálido ventral es también un núcleo GABAérgico de proyección en el que también se pueden distinguir dos partes: lateral (regiones dorsal y lateral) y medial (regiones ventral y medial), diferenciadas entre ellas por la diferente expresión de neurotensina y calbindina (Maurice et al 1997; Maurice et al 1998). La conexión entre NAcc y pálido ventral está topográficamente definida, de forma que el “*core*” del NAcc proyecta al pálido ventral lateral mientras que el “*shell*” proyecta a la región medial (Maurice et al 1997; Maurice et al 1998), de forma no recíproca (Kalivas et al 2001). La región del lateral del pálido ventral proyecta principalmente al núcleo subtalámico, a la *S. nigra pars reticulata* y, en menor proporción, al núcleo medio dorsal mientras que la región medial proyecta fuertemente a este núcleo talámico así como a la VTA (sobre la que ejerce un importante control), que a su vez proyecta a la región “*shell*” del N.Acc. El núcleo MD está densamente inervado por las aferentes del pálido ventral (Churchill et al 1996; Zahm et al 1996; Kalivas et al 2001) de forma que la estimulación del pálido ventral inhibe la actividad neuronal en el núcleo talámico (Lavin and Grace 1994).

Así pues, la corteza prefrontal puede modular la actividad de la VTA o del MD de forma indirecta mediante esta vía (**figura 11**): una activación de la CPFm provocaría una excitación del NAcc y consecuentemente una inhibición del pálido ventral lo cual llevaría a un incremento de actividad de la VTA y el MD, núcleos que a su vez vuelven a proyectar a la CPF. Además de la corteza, el hipocampo ventral ejerce una potente regulación de las vías dopaminérgicas ascendentes a través de este circuito, mediante la conexión multisináptica hipocampo ventral – NAcc –

pálido ventral – VTA (Floresco et al 2001; Floresco and Grace 2003). La fuerte inervación del PV sobre el núcleo MD y la VTA lo sitúan también en un punto clave en modelos de esquizofrenia como los antagonistas NMDA– la inhibición de sus neuronas podría conducir a una excitación del núcleo MD del tálamo y de las neuronas dopaminérgicas de la VTA. Al mismo tiempo, este circuito también estaría implicado en la desregulación de las vías dopaminérgicas descrita en esquizofrenia y en otros modelos animales, posiblemente como consecuencia de una hiperfunción del hipocampo (Lodge and Grace 2007).



**Figura 11** – Esquema simplificado de las conexiones existentes entre el núcleo *accumbens* y el pálido ventral así como las principales aferencias y eferencias de este circuito. En rojo representadas las conexiones glutamatergicas, en azul las GABAérgicas, en amarillo la dopaminérgica.

### 2.3.5. Conexiones cortico–corticales

Tratándose de una región de asociación superior, de entre todas las conexiones que presenta la corteza prefrontal son de especial importancia las conexiones cortico–corticales. El cuerpo calloso es el haz de fibras que conecta la corteza de un hemisferio con la del otro y representa una de las más importantes entradas glutamatergicas (por lo tanto excitatoria) a la corteza prefrontal, así como uno de los mayores haces de materia blanca del cerebro. La fuerte y extensa interconectividad que presentan los dos hemisferios de la corteza (corteza izquierda con corteza derecha) indica la importancia que tiene la coordinación de ambas para su funcionamiento. De hecho, es necesaria la integridad de estos axones para la formación de las oscilaciones gamma entre ambos hemisferios (Innocenti et al 2003). Las fibras de las regiones más anteriores del cuerpo calloso son las que conectan las cortezas prefrontales derecha e izquierda, así como el cíngulo anterior y la ínsula (Carr and Sesack 1998; Wang et al 2008a). Estas

conexiones del córtex prefrontal contactan mayoritariamente con las espinas dendríticas de las neuronas piramidales formando contactos asimétricos (es decir, excitadores) y, en menor proporción, con los árboles dendríticos de interneuronas GABAérgicas (Carr and Sesack 1998). Las terminales del cuerpo calloso inervan tanto las capas superficiales como las más profundas de forma topográfica, es decir, cada capa con la correspondiente de la otra corteza. Aunque es una observación relativamente infrecuente, algunas de estas terminales convergen con contactos GABAérgicos en la misma neurona diana, proporcionando así un sustrato anatómico para la modulación de las entradas del cuerpo calloso por parte de las neuronas GABAérgicas (Carr and Sesack 1998).

Se han descrito alteraciones del cuerpo calloso en varias enfermedades mentales como son el trastorno bipolar y la esquizofrenia. Varios estudios han mostrado una disminución del tamaño del cuerpo calloso en pacientes de esquizofrenia y que esta reducción se correlaciona con la gravedad de los síntomas psicóticos (Innocenti et al 2003; Aydin et al 2008). Además, las zonas en donde esta reducción es más marcada son el genu y la parte más rostral del cuerpo calloso, que son las regiones donde se interconectan ambas CPFm (Innocenti et al 2003). En pacientes con esquizofrenia iniciada en la infancia (la cual presenta síntomas psicóticos, perturbaciones sensoriales, etc., pero suele ser más severa que la forma adulta (Greenstein et al 2006)) se ha observado una reducción del 15% de la materia blanca en la región frontal de la corteza en comparación a sujetos controles (Gogtay et al 2008). Lesiones del cuerpo calloso muestran unos síntomas parecidos a los del trastorno bipolar, dónde se pueden apreciar otras anormalidades (de volumen, integridad, etc.) de la materia blanca (Wang et al 2008a). Por lo general, en estas dos enfermedades, esquizofrenia y trastorno bipolar, los síntomas aparecen durante la adolescencia, que es precisamente el momento en el que el cuerpo calloso llega a su máxima mielinización (Wang et al 2008a), sugiriendo que una alteración de este proceso podría ser determinante en estas patologías. Una patología relacionada con la mielinización ha sido propuesta tras observar una disminución de los niveles de N-acetil aspartato (NAA) en el cuerpo calloso (el NAA se utiliza como marcador de integridad axonal) (Aydin et al 2008) el hecho de que existe una correlación negativa entre estos niveles de NAA y la gravedad de los síntomas negativos en individuos con alto riesgo de esquizofrenia (Aydin et al 2008).

Así pues, la observación de que esta comunicación interhemisférica está afectada en la esquizofrenia y otras enfermedades mentales graves (especialmente en el segmento anterior del cuerpo calloso, el cual conecta los lóbulos frontales) sugiere que las conexiones callosas juegan un papel clave en el normal funcionamiento de la corteza prefrontal (Carr and Sesack 1998).

## 2.4. RECEPTORES CORTICALES

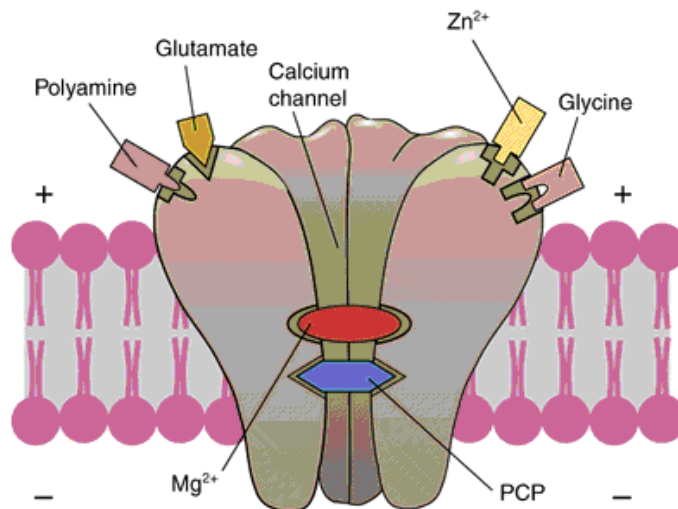
A continuación, comentaremos varios de los múltiples receptores encontrados en las neuronas de corteza, centrándonos en aquellos que más se han estudiado en el presente trabajo de tesis. Como se ha mencionado previamente, las neuronas corticales reciben aferencias excitatorias (glutamato), inhibitorias (GABA) y modulatorias (serotonina, dopamina y noradrenalina). Esto significa que estas neuronas corticales presentan receptores para todos estos sistemas de neurotransmisión, receptores cuyas características (como su sensibilidad, afinidad, mecanismo de transducción de la señal, etc) condicionarán la respuesta de la neurona. En términos generales encontramos dos tipos de receptores: ionotrópicos o metabotrópicos. Los primeros conforman un poro, un canal que se abrirá al entrar en contacto con el neurotransmisor, permitiendo el paso de iones a través suyo; según cuales sean estos iones (si son despolarizantes como sodio o calcio o hiperpolarizantes como cloro), provocarán una corriente, un potencial de acción o una inhibición de la neurona. Estos receptores, por regla general, permiten respuestas inmediatas y de corta duración. El otro tipo de receptores, los metabotrópicos, son receptores ligados en el interior celular a las proteínas G. La unión del ligando, el neurotransmisor, provoca una activación (fosforilación normalmente) de esta proteína G e inician así una cascada de señalización intracelular que, según el tipo de proteína G y de cadena afectada, dará lugar a una u otra respuesta final en un tipo celular determinado. Estas pueden ser desde activar la transcripción de un determinado gen hasta la fosforilación de otros receptores (hecho que puede provocar su internalización en vesículas, por ejemplo). Los cambios provocados por estos receptores suelen tardar más tiempo en hacerse patentes y a la vez, suelen ser más duraderos en el tiempo.

### 2.4.1. Receptores Glutamatérgicos

El glutamato actúa sobre las dos clases de receptores: ionotrópicos y metabotrópicos. Los primeros se dividen en tres familias: los receptores AMPA, los receptores kainato y los receptores NMDA, siendo los dos primeros canales de sodio y el último de calcio. Por su parte, los receptores metabotrópicos de glutamato pueden ser del grupo I (mGluR1 y 5) que activan la fosfolipasa C o del grupo II o III (mGluR2 y 3; mGluR4, 6, 7 y 8, respectivamente) que actúan inhibiendo la adenilato ciclasa.

Los receptores ionotrópicos constan de 4 o 5 subunidades específicas para los receptores AMPA, kainato o NMDA. La activación de los receptores AMPA es despolarizante y son responsables de generar la mayoría de las corrientes excitatorias postsinápticas (EPSC) mediadas por glutamato. Los receptores kainato no están tan bien caracterizados como los AMPA y por lo general, al ser difícil diferenciar las funciones entre ellos, se les suele referir en conjunto como receptores AMPA/kainato. Los receptores NMDA están compuestos por siete subunidades distintas, producto de diferentes genes: NR1 (de la cual existen 8 variantes de splicing), NR2A, B, C y D y NR3A y B (McBain and Mayer 1994; Kew and

Kemp 2005). Para formar un receptor operativo deben de constar como mínimo, dos subunidades NR1, que conforman el complejo receptor (el lugar de unión de la glicina y otros moduladores) y dos subunidades NR2 que forman el poro y constituyen el lugar de unión del glutamato. Los diferentes subtipos de subunidades NR2 que compongan el receptor serán los que determinen las características del receptor como la constante de apertura, efectos de agonistas o antagonistas, el tiempo que permanece abierto, etc, siendo las subunidades NR2A y NR2B las predominantes en cerebro adulto (Kew and Kemp 2005).



**Figura 12** – Esquema del receptor NMDA con sus lugares de unión: glutamato, glicina, poliaminas, zinc y antagonistas NMDA, que por su posición, necesita que que el canal esté abierto previamente, es decir, que haya saltado el magnesio.

Una de las características más importantes de los receptores NMDA es el hecho de que necesitan de la unión de cofactores como son el zinc y la glicina para su funcionamiento. Además, el receptor NMDA presenta un lugar de unión a magnesio en el interior del canal, de forma que en condiciones basales de potencial de membrana este ión impedirá la abertura del canal (**figura 12**). Para que el receptor NMDA pueda activarse requiere un cambio previo del potencial de membrana (normalmente causado por los receptores AMPA) que haga saltar al magnesio de su posición. La abertura del canal NMDA permite el paso a iones calcio, lo cual es una característica muy importante del receptor NMDA pues su activación produce una corriente lenta y duradera. Esto significa que generan una despolarización más larga, lo cual permite la sumación de estímulos nerviosos (durante el tiempo que este receptor está activo otras sinapsis pueden excitar la neurona, sumándose los efectos) e involucra a este receptor en mecanismos fisiológicos de gran importancia como la plasticidad sináptica, la actividad rítmica, el desarrollo neuronal o la potenciación a largo plazo (LTP), mecanismo clave del aprendizaje y memoria.

Esta cinética de activación depende del tipo de subunidades NR2 que formen parte del receptor, cuya configuración cambia a lo largo del desarrollo

(Cull-Candy et al 2001). En etapas juveniles, es la subunidad NR2B la que se encuentra en mayor proporción. Según avanza la maduración del cerebro, esta subunidad se va sustituyendo por la NR2A (Cull-Candy et al 2001), aunque no ocurre en todas las zonas del cerebro. Así como en zonas como la corteza visual se observa este cambio de subunidad, en la corteza prefrontal se mantiene una alta expresión de la subunidad NR2B en los receptores NMDA en el cerebro adulto (incluso dentro de la propia CPF, en neuronas de capa V es mayor la presencia de esta subunidad que en el resto de capas) (Wang et al 2008b). En términos de funcionalidad, se ha observado que la presencia de la subunidad NR2B da lugar a potenciales de acción de mayor duración, con un decaimiento más lento de lo normal, es decir, el canal está más tiempo abierto que en receptores con otras subunidades. Siendo la CPFm la más importante área de integración y siendo la memoria operativa su mecanismo característico, el cual está basado en la activación reverberante de sinápsis y redes neuronales, parece lógico pensar que una combinación de subunidades que permita una mayor integración temporal sea clave para estos procesos (Wang et al 2008b).

En general, se ha observado una amplia distribución de los receptores AMPA y NMDA en todo el cerebro. Ambos receptores se han descrito tanto en neuronas piramidales como en interneuronas GABAérgicas. Estudios de autoradiografía muestran una gran distribución del receptor AMPA en corteza, caudado putamen, hipocampo y cerebelo (Mutel et al 1998). Con una distribución parecida, en rata el RNAm del receptor NMDA se puede encontrar en neuronas de todo el cerebro, en mayor densidad en corteza, hipocampo y cerebelo (Moriyoshi et al 1991), sobretodo en CPF (Scherzer et al 1998). Se ha descrito una alta densidad de receptores mGlu1 en regiones corticales, caudado, putamen, tubérculo olfativo e hipocampo entre otros (Schaffhauser et al 1997). Hay una alta densidad de mGluR2/3 en la capa V de corteza, menor en la capa II/III, a diferencia de lo que sucede en la región frontoparietal (Marek et al 2000).

#### 2.4.2. Receptores dopaminérgicos

Existen cinco subtipos principales de receptores de dopamina, divididos en dos familias: la D1, que consta de los receptores D<sub>1</sub> y D<sub>5</sub> y la familia de receptores D2, que incluye los subtipos D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> y D<sub>4</sub>. Todos estos receptores son metabotrópicos y están acoplados a la adenilato ciclasa, activándola en el caso de la familia D1 e inhibiendo su actividad en el caso de los receptores D2. Así pues, la dopamina puede modular las neuronas piramidales a través de estos dos receptores, haciéndolas más o menos sensibles a entradas excitatorias, creando respectivamente dos estados de potencial de membrana de estas neuronas: *up* y *down*, estados que dependen de las proyecciones desde la VTA (O'Donnell et al 2002).

En la CPF se puede observar que los terminales dopaminérgicos (positivos para tirosina hidroxilasa) están en aposición con interneuronas GABAérgicas (Sesack et al 1998; Benes 2000) y que los receptores de dopamina D2 son abundantes en interneuronas de capas profundas en rata (Vincent et al 1995; Khan

et al 1998; Le Moine and Gaspar 1998). Asimismo, encontramos también expresión del receptor D2 en neuronas piramidales en todas las capas corticales, especialmente en capa V (Vincent et al 1995; Le Moine and Gaspar 1998). Pero mientras que en roedor los receptores D1 se encuentran ampliamente distribuidos, los receptores D2 se encuentran más restringidos a capa V (Gaspar et al 1995; Le Moine and Gaspar 1998), donde están presentes tanto en neuronas piramidales como en interneuronas GABAérgicas, especialmente las que contienen parvalbúmina (Le Moine and Gaspar 1998; Davidoff and Benes 1998; Santana et al 2009). Ambos receptores están presentes en las neuronas con proyecciones excitatorias cortico-corticales y cortico-estriales, pero solo se encuentra el D1 en las proyecciones cortico-talámicas (Le Moine and Gaspar 1998).

Estos receptores son de gran importancia en el tratamiento de la esquizofrenia. Todos los fármacos antipsicóticos actuales presentan un antagonismo D2 y el grado de este antagonismo está relacionado con su eficacia terapéutica. Asimismo, se ha observado que la reducción de los receptores D1 en el córtex de pacientes se correlaciona con la expresión de síntomas negativos (Okubo et al 1997; Abi-Dargham et al 2002). Como hemos visto, la presencia de receptores tanto activadores (D1) como inhibidores (D2) en neuronas piramidales y GABAérgicas (Santana et al 2009) da lugar a una compleja regulación de la actividad de la corteza por parte de las entradas dopaminérgicas. Como hemos mencionado previamente, se postula que una hiperactividad de la vía mesolímbica sería responsable de la sintomatología positiva (Carlsson 1988; Davis et al 1991; Weinberger et al 1992; Abi-Dargham et al 2000). Un bloqueo de los receptores D2 mejoraría los síntomas psicóticos pues estaría revertiendo el exceso de dopamina (Kapur 2004) y, debido a la naturaleza de los receptores de dopamina (D1 excitador, D2 inhibidor), el efecto de un agonista de los receptores D1 y el de un antagonista de los receptores D2 llevarían al mismo efecto final, la reversión de una excesiva neurotransmisión dopaminérgica.

### **2.4.3. Receptores serotoninérgicos**

Existen catorce subtipos de receptores de serotonina en el sistema nervioso central de mamíferos, todos ellos metabotrópicos (asociados a proteína G) exceptuando el receptor 5-HT<sub>3</sub>, que es un canal iónico (Peters et al 1992). Su estructura se compone de siete dominios transmembrana, un tercer bucle intracelular que es el que contacta con la proteína G y con los extremos amino-terminal y carboxi-terminal en el exterior e interior de la membrana, respectivamente. Se han descrito 5 subtipos del receptor 5-HT<sub>1</sub>: 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> y 5-HT<sub>1F</sub>, todos ellos presentan una alta afinidad por la serotonina y están acoplados a proteína G<sub>i/o</sub>, es decir, inhiben la actividad adenilato ciclasa. Se han descrito también 3 subtipos del receptor 5-HT<sub>2</sub>, el 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>, acoplados a la proteína G<sub>q</sub> que activa la fosfolipasa C provocando hidrólisis de fosfoinositoles y movilización de calcio. Por último tenemos a los receptores 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5A</sub>, 5-HT<sub>5B</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub>, acoplados positivamente a adenilato ciclasa (Hoyer et al 1994).



En este trabajo nos hemos centrado en el estudio del papel de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>, a través de los cuales la serotonina puede inhibir o activar, respectivamente, la actividad neuronal. Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> se encuentran tanto de forma presináptica, es decir, en las neuronas serotoninérgicas actuando como autoreceptores como de forma postsináptica. Muestran una alta afinidad por la serotonina y la activación de estos receptores provoca una hiperpolarización mediada por canales de potasio ligados a proteína G, provocando consecuentemente una inhibición de la neurona en la que los encontramos. Se ha observado la presencia de estos receptores en un gran número de estructuras límbicas como el hipocampo, el séptum, el tálamo e hipotálamo y la amígdala, así como en la corteza (Pazos and Palacios 1985; Verge et al 1985; Miquel et al 1991; Pompeiano et al 1992), siendo los núcleos del rafe (dorsal y medial) y el hipocampo las zonas más enriquecidas.

Por su parte, la unión del ligando a los receptores 5-HT<sub>2A</sub> provoca un incremento en la actividad de la neurona. Estos receptores se encuentran muy distribuidos por toda la corteza y en menor proporción, en el claustró, zonas del sistema límbico y de los ganglios basales (Pazos et al 1985; Hoyer et al 1986). El hecho de que los estudios de hibridación *in situ* muestren la misma distribución indica que estos receptores se localizan en cuerpos celulares y dendritas de las células que contienen su ARNm (Mengod et al 1990; Pompeiano et al 1994; Lopez-Gimenez et al 1997). Al contrario de los 5-HT<sub>1A</sub>, los receptores 5-HT<sub>2A</sub> muestran una baja afinidad por la serotonina y no se encuentran en neuronas serotoninérgicas, actúan únicamente como receptores postsinápticos.

Si centramos la atención en la corteza prefrontal, está descrito que los receptores serotoninérgicos más expresados en las neuronas piramidales corticales son los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> (Pazos et al 1985; Pazos and Palacios 1985; Pompeiano et al 1992; Pompeiano et al 1994; Kia et al 1996a; Kia et al 1996b; Willins et al 1997; Jakab and Goldman-Rakic 1998; Jakab and Goldman-Rakic 2000; Martin-Ruiz et al 2001; DeFelipe et al 2001). Mientras que los receptores 5-HT<sub>2A</sub> se localizan principalmente en la dendrita apical, los receptores 5-HT<sub>1A</sub> presentan se distribuyen por el soma y las dendritas basales así como en el segmento inicial del cono axónico, una región clave para el control la de actividad piramidal pues es aquí donde se genera el potencial de acción, de forma que un efecto inhibitorio en esta zona tiene un gran efecto en la actividad de la neurona piramidal (Azmitia et al 1996; DeFelipe et al 2001; Czyrak et al 2003; Cruz et al 2004).

Mediante estudios de electrofisiología se ha sugerido la existencia de una colocalización de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> en las mismas neuronas piramidales de corteza (Araneda and Andrade 1991; Ashby, Jr. et al 1994). La activación de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> provoca una excitación de las neuronas piramidales como se puede observar por el aumento de su frecuencia de descarga (Araneda and Andrade 1991; Aghajanian and Marek 1997; Aghajanian and Marek 1999b; Puig et al 2003). Asimismo, estudios de microscopía electrónica muestran que las neuronas serotoninérgicas inervan también interneuronas GABAérgicas corticales (DeFelipe et al 1991; Smiley and Goldman-Rakic 1996). Así pues, la serotonina puede modular la actividad de la corteza de forma compleja pues se ha

mostrado mediante estudios de c-fos que, tanto las neuronas piramidales, como las interneuronas GABAérgicas, presentan ambos tipos de receptores (Santana et al 2004). A pesar de esto, la estimulación de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> por la perfusión de su agonista DOI en la CPFm incrementa el porcentaje de descarga de las neuronas del rafe y la liberación de serotonina en la corteza por un mecanismo dependiente del receptor 5-HT<sub>2A</sub> (Bortolozzi et al 2003). Este efecto excitatorio del DOI sugiere que realiza una acción directa en los receptores 5-HT<sub>2A</sub> de neuronas piramidales (Bortolozzi et al 2003). En el caso de la administración sistémica de DOI se dan tanto activaciones como inhibiciones, pero mayoritariamente se observa un incremento del 240% de la frecuencia de descarga de las neuronas piramidales, mostrando una vez más la predominancia de una acción activadora sobre las neuronas corticales (Bortolozzi et al 2003). Así pues, la mayor proporción de receptores 5-HT<sub>2A</sub> en neuronas piramidales así como los efectos excitatorios del DOI sugieren que la activación de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> de las neuronas piramidales predomina sobre una posible acción sobre los receptores de neuronas GABAérgicas (Bortolozzi et al 2003).

Diversos receptores serotoninérgicos se han implicado en la fisiopatología de la esquizofrenia. Agonistas del receptor 5-HT<sub>2A</sub> como el LSD o el DOI son alucinógenos mientras que fármacos con capacidades antipsicóticas como son los antipsicóticos atípicos presentan un fuerte antagonismo de este receptor (Meltzer 1999; Millan 2000). Al mismo tiempo, estos antipsicóticos atípicos presentan un agonismo por el receptor 5-HT<sub>1A</sub> (Chou et al 2003) sugiriendo una posible contribución a su efecto terapéutico (Millan 2000). Los receptores 5-HT<sub>2A</sub> se encuentran altamente localizados en las neuronas piramidales de capa V en roedores y primates. Como se ha mencionado previamente, estas neuronas están involucradas en procesos de integración de la información cognitiva y perceptual proveniente de un gran número de regiones corticales y subcorticales, de forma que los receptores de serotonina se encuentran en una posición clave tanto para el funcionamiento correcto de la corteza prefrontal como para mediar los efectos de los fármacos antipsicóticos (Roth et al 2004).

### **3. TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA**

#### **3.1. FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS**

Actualmente, no existe ningún tratamiento capaz de curar la esquizofrenia, los fármacos existentes alivian los síntomas de la enfermedad, aunque a veces provocando graves efectos secundarios. Estos fármacos se denominan antipsicóticos, descubiertos por su habilidad de bloquear los síntomas psicóticos de la enfermedad. Los primeros en aparecer fueron los antipsicóticos clásicos o típicos, caracterizados por presentar todos ellos un potente antagonismo del receptor de dopamina D2 que se correlaciona con su efectividad clínica (Seeman and Lee 1975; Seeman et al 1976; Creese et al 1996; Kapur and Mamo 2003). Entre estos destacan la clorpromacina, el primer antipsicótico descubierto a principios de los años 50 y el haloperidol, que es el antipsicótico atípico más representativo. Así

pues, la administración de estos fármacos es capaz de revertir la sintomatología psicótica (que se postula relacionada una hiperactividad de la vía dopaminérgica mesolímbica) pero no mejoran los síntomas negativos y cognitivos (relacionados precisamente con una actividad ya disminuida de la vía mesocortical), más aún, el bloqueo de la neurotransmisión dopaminérgica cortical que provocan produce un deterioro de las funciones cognitivas de los pacientes esquizofrénicos. De la misma manera, el bloqueo dopaminérgico en el hipotálamo puede generar hiperprolactinemia y en las vías estriatales produce sintomatología extrapiramidal al interferir en los circuitos motores, provocando un grave parkinsonismo (ataxias, discinesias, etc) que muchas veces puede llevar al paciente a abandonar el tratamiento.

A mitad de los años 70 se descubrió la clozapina, el primero y, hasta el momento, el más efectivo fármaco de una nueva generación, los llamados antipsicóticos atípicos. Estos presentan un perfil farmacológico diferente al de los fármacos clásicos, caracterizado por un mayor antagonismo de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y un menor antagonismo D2, hecho que les permite realizar su efecto terapéutico sin los graves efectos secundarios motores (Meltzer 1999). Estudios de neuroimagen han mostrado que una ocupación de receptores D2 del 80% en estriado provoca sintomatología extrapiramidal. Mientras que los antipsicóticos clásicos llegan a este grado de ocupación, los antipsicóticos atípicos (en particular la clozapina) muestran una ocupación inferior al 70% (Farde et al 1988; Nordstrom et al 1995), evitando la generación de los síntomas extrapiramidales y realizando parte de su efecto terapéutico a través del antagonismo 5-HT<sub>2A</sub>. Así pues, la clozapina, el fármaco más representativo de los atípicos, es capaz de disminuir o eliminar los síntomas positivos sin generar parkinsonismo ni disfunciones motoras. Otra de sus principales características es el hecho de que provoca una mejora en los síntomas negativos y de las funciones cognitivas. A pesar de este mejor rendimiento, los antipsicóticos atípicos también generan efectos secundarios, como agranulocitosis (clozapina), incremento de peso (olanzapina), convulsiones (quetiapina) o trastornos metabólicos.

Aunque bastantes presentan la característica mayor afinidad por los receptores 5-HT<sub>2A</sub> (hasta 25 veces más selectividad por los receptores de serotonina que por los de dopamina D2 (Abi-Dargham 2007), los antipsicóticos atípicos presentan una gran variedad de perfiles farmacológicos, formando así un grupo heterogéneo. Varios de estos fármacos presentan afinidad por el receptor 5-HT<sub>1A</sub> y algunos como la risperidona y la clozapina actúan *in vivo* como agonistas de este receptor (Millan 2000; Ichikawa et al 2001; Chou et al 2003).

Asimismo, tanto típicos como atípicos, presentan una afinidad elevada por los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, actuando como antagonistas (Bymaster et al 1996), aunque es importante remarcar que por si solos, un antagonismo  $\alpha_1$ -adrenérgicos, D2, 5-HT<sub>2A</sub> o agonismo 5-HT<sub>1A</sub> no parecen tener efectos antipsicóticos. Es muy probable que el destacado efecto antipsicótico que poseen fármacos como la clozapina sea precisamente por la gran cantidad de receptores por los que presenta afinidad, haciendo que su acción pueda regular múltiples sistemas de neurotransmisión (Meltzer et al 1989a; Roth et al 2004) (**figura 13**).

Receptor	Típicos		Atípicos				
	Clorpromacina	Haloperidol	Clozapina	Olanzapina	Risperidona	Quetiapina	Ziprasidona
D <sub>1</sub>	19.95	210	85	31	430	455	525
D <sub>2</sub>	1.25	0.7	126	11	4	160	5
D <sub>3</sub>		2	473	49	10		7
D <sub>4</sub>		3	35	27	9		32
5-HT <sub>1A</sub>		1100	875	>10 000	210	2800	3
5-HT <sub>2A</sub>	7.94	45	16	4	0.5	295	0.4
5-HT <sub>2C</sub>	12.59	>10 000	16	23	25		1
α <sub>1</sub>	1	6	7	19	0.7	7	11
H <sub>1</sub>		440	6	7	20	11	50
M <sub>1</sub>		>1500	1.9	1.9	>10 000	120	>1000

**Figura 13** – Tabla resumen de la afinidad in vitro de algunos antipsicóticos típicos y atípicos por los receptores monoaminérgicos (nM, datos de receptores humanos clonados, (Seeger et al 1995; Bymaster et al 1996; Arnt and Skarsfeldt 1998; Daniel et al 1999))

Los mecanismos de acción así como las diferencias entre los fármacos antipsicóticos típicos y atípicos han recibido una gran atención en los últimos años. Se ha descrito que fármacos que muestran antagonismo por el receptor 5-HT<sub>2A</sub> o agonismo por el 5-HT<sub>1A</sub> (como la clozapina) incrementan los niveles de dopamina en la CPFm de roedores (Pehek and Yamamoto 1994; Rollema et al 1997; Ichikawa et al 2001; Assie et al 2005), efecto dependiente en la presencia de receptores 5-HT<sub>1A</sub> operativos (Díaz-Mataix et al 2005; Bortolozzi et al 2007). También se ha observado que el efecto de la clozapina sobre la tasa de disparo de la neurona piramidal depende del estado de la neurona: inhibe preferentemente a las neuronas con tasas de disparo más altas y, a la vez, excita a las neuronas con una menor actividad basal (Homayoun and Moghaddam 2007a). Además, la reversión de los efectos sobre la actividad neuronal provocados por el antagonismo NMDA por parte de la clozapina se correlaciona positivamente con la expresión de estereotipias (Homayoun and Moghaddam 2007a). En cambio, la administración de haloperidol únicamente muestra inhibiciones en la actividad neuronal, no el efecto de modulación dependiente del estado neuronal exhibido por la clozapina. Solo en una subpoblación de neuronas corticales, clozapina y haloperidol muestran un mismo efecto, una inhibición sostenida, quizás por una mayor sensibilidad de estas neuronas al antagonismo D<sub>2</sub> (Homayoun and Moghaddam 2007a). Esta acción dual de la clozapina, capaz activar las neuronas más inhibidas y a la vez de inhibir las neuronas con mayor tasa basal de disparo y de esta forma modular tanto la hiperactividad como la hipoactividad en las neuronas y circuitos corticales puede

representar el control preciso necesario para un efecto terapéutico capaz de mejorar el procesamiento cortical en esquizofrenia (Homayoun and Moghaddam 2007a).

Actualmente el tratamiento de la esquizofrenia dista mucho de ser perfecto. La baja efectividad y los graves efectos secundarios hacen que muchas veces el tratamiento se interrumpa. El efecto terapéutico de estos fármacos suele tardar tiempo en aparecer, a parte del hecho de que muchos pacientes presentan resistencias a estos. La aparición de síntomas extrapiramidales y el deterioro cognitivo son dos grandes limitaciones de la terapia con antipsicóticos clásicos. En el caso de los atípicos, pese a su mayor eficacia en los síntomas cognitivos, siguen mostrando una baja respuesta en el tratamiento de los síntomas negativos de la enfermedad.

### 3.2. OTROS TRATAMIENTOS

En la fisiopatología de la esquizofrenia una y otra vez se ha visto la importancia creciente del glutamato y concretamente del receptor NMDA (posiblemente de su hipofunción), como lo prueba el modelo experimental de los antagonistas de este receptor. Existen una serie de tratamientos experimentales que se centran en la regulación de este receptor, en recuperar su funcionalidad normal. Estos tratamientos estudian los efectos de la administración de los agonistas del sitio de unión de la glicina (GMS, *glycine modulatory site*): la glicina, la D-serina y la D-cicloserina. Estos compuestos son necesarios como cofactores del receptor NMDA, su unión al receptor facilita su activación. Administrados junto con fármacos antipsicóticos clásicos se han observado mejorías de los síntomas negativos y cognitivos en pacientes de esquizofrenia (Jardemark et al 2000; Javitt et al 2001; Coyle and Tsai 2004; Lipina et al 2005), mostrando que un aumento de la función del receptor NMDA sería beneficioso para el tratamiento de la esquizofrenia. Asimismo se han administrado bloqueantes del transportador de glicina en estudios preclínicos (Javitt 2002), estos fármacos incrementarían los niveles sinápticos de glicina, aumentando así la función del receptor NMDA. De hecho, se ha sugerido que la clozapina presentaría una ligera acción bloqueante del transportador de glicina (Millan 2005), efecto que aumentaría la concentración de glicina en la sinapsis incrementando así la actividad del receptor NMDA. Esto coincide con la observación de que la coadministración de clozapina y D-serina (el más afín de estos moduladores) no presenta una mejoría en la respuesta del paciente, sugiriendo que la clozapina ya haría por si sola un efecto equivalente a la D-serina (Coyle and Tsai 2004). Otra posibilidad es que la clozapina actúe como agonista parcial del GMS, incrementando así la funcionalidad del receptor NMDA, y produciendo un incremento del glutamato extracelular (Millan 2005).

Más recientemente han ganado un especial interés los agonistas mGluR2/3, receptores metabotrópicos que autorregulan la liberación de glutamato. Se había observado que su administración bloquea las alteraciones sobre la conducta en modelos de antagonistas NMDA (Moghaddam and Adams 1998) y que en

individuos sanos reducen los déficits cognitivos inducidos por ketamina (Krystal et al 2003). Un estudio más actual ha demostrado la eficacia de estos fármacos como antipsicóticos. En una administración crónica en pacientes de esquizofrenia, el agonista mGluR2/3 LY2140023 (que una vez absorbido se hidroliza al compuesto activo LY404039) ha mostrado una eficiencia antipsicótica comparable a la de la olanzapina (Patil et al 2007), tanto en el tratamiento de síntomas positivos como en la mejoría de los síntomas negativos y cognitivos. De especial importancia es el hecho de que éste es el primer compuesto con actividad antipsicótica que no presenta antagonismo para el receptor de dopamina D2 (de hecho, revierte los efectos de la PCP sobre la conducta del animal en ratas depletadas de monoaminas, sugiriendo un mecanismo de acción diferente al de los antipsicóticos (Patil et al 2007), mostrando así nuevas opciones para el desarrollo de futuros tratamientos antipsicóticos.

## II. OBJETIVOS

La hipótesis de trabajo principal de esta Tesis Doctoral es que los fármacos antipsicóticos realizan su acción farmacológica de forma local en la corteza prefrontal medial. Actuando a través de los receptores para distintos sistemas de neurotransmisión, estos fármacos serían capaces de revertir el incremento de actividad cortical descrito en el modelo de esquizofrenia de los antagonistas no competitivos del receptor NMDA. Por su parte, estos compuestos estarían provocando la inactivación de neuronas GABAérgicas y de esta forma desinhibiendo una conexión excitatoria cuyo efecto final sería una hiperactividad de la neurotransmisión cortical.

### OBJETIVOS CONCRETOS

- 1- Caracterizar los efectos de la administración sistémica del antagonista NMDA MK-801 sobre la concentración extracelular de serotonina y glutamato en la corteza prefrontal medial.*
- 2- Estudio del lugar de acción de los antagonistas NMDA en el cerebro, responsable de los cambios observados en la neurotransmisión serotoninérgica y glutamatérgica en la corteza prefrontal medial.*
- 3- Estudiar la capacidad de los antipsicóticos clásicos y atípicos para revertir los efectos de los antagonistas NMDA sobre la neurotransmisión cortical de serotonina y glutamato. Comparación de los efectos de los antipsicóticos administrados de forma sistémica o perfundidos localmente en la corteza prefrontal.*
- 4- Estudio del mecanismo de acción de los fármacos antipsicóticos. Mediante la perfusión local en corteza de agonistas y antagonistas selectivos, se estudiará el papel de los diferentes receptores de serotonina, dopamina y noradrenalina, por los cuales presentan afinidad los antipsicóticos.*





### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 1. MATERIALES

##### 1.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se han utilizado ratas albinas macho de la cepa Wistar proporcionadas por Charles River (Lyon, Francia) con un peso comprendido entre 250 y 320 gramos. Los animales fueron estabulados durante una semana previa a la cirugía en grupos de máximo 4 por jaula e individualmente tras el procedimiento quirúrgico. Se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad (las luces se encienden las 07:00h) con una temperatura ambiente de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y disponiendo en todo momento de agua y comida *ad libitum*. El cuidado y tratamiento de los animales se realizó según la legislación europea de “Protección de los Animales Usados para Experimentación y Otros Fines Científicos” según la directiva de la Unión Europea del 24 de Noviembre de 1986 (86/609/EEC)

##### 1.2. FÁRMACOS UTILIZADOS

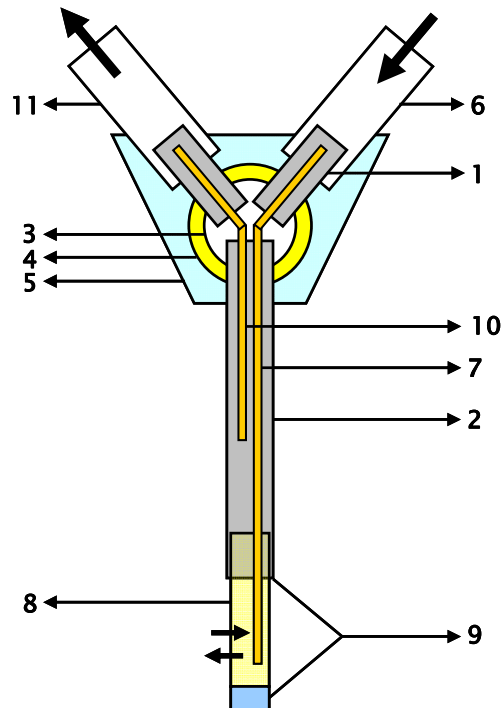
A continuación se detalla una lista de los diferentes fármacos o compuestos utilizados (izquierda) y su correspondiente actividad farmacológica (derecha).

MK-801 PCP Ketamina	Antagonistas NMDA	L-745870	Antagonista D <sub>4</sub>
Olanzapina Clozapina	Antipsicóticos atípicos	BAY x 3702	Agonista 5-HT <sub>1A</sub>
Clorpromazina Haloperidol	Antipsicóticos clásicos	M100907	Antagonista 5-HT <sub>2A</sub>
NBQX	Antagonista AMPA/Kainato	Ritanserina	Antagonista 5-HT <sub>2A/2C</sub>
Prazosín	Agonista $\alpha_1$ - adrenérgico	Tetrodotoxina	Bloqueante canales de Na <sup>+</sup>
Raclopride Eticlopride	Antagonistas D2	Fluorogold	Marcador retrógrado
SKF-38393	Agonista D1		

## **2. MÉTODOS – MICRODIÁLISIS INTRACEREBRAL *IN VIVO***

### **2.1. CONSTRUCCIÓN DE LAS SONDAS DE MICRODIÁLISIS**

La construcción de sondas de microdiálisis y su uso en ratas se llevó a cabo según la metodología descrita en (Adell and Artigas 1998). La sonda está formada por un tubo de acero inoxidable de 25G (0.51 mm. diámetro externo, 0.33 interno) (A-M Systems, Carlsborg, WA, EUA) de 2 cm. de longitud. A través de este tubo se insertan dos tubos de sílica capilar fundida de 0.11 mm DE y 0.04 mm DI (Composite Metal Services Ltd, The Chase, Harlow, Reino Unido), uno de los cuales (la salida) tiene su final aproximadamente en la mitad del tubo de 25G mientras que el otro (la entrada) es más largo y sobresale del tubo de acero. El siguiente paso es la colocación de otros dos tubos de acero inoxidable, estos de 27G (0.41 mm DE, 0.2 mm DI) y 7 mm de longitud en el extremo superior de los capilares de sílica fundida, recubriéndolos. Mediante una mezcla de Araldit® (Ciba-Geigy) se sella la unión entre los dos tubos de 27G y el tubo de 25G, se deja secar y se recubre con cemento dental Kerr® TAB 2000 para endurecer el ensamblaje. A continuación, se conectan los tubos de acero de 27G a un tubo de polietileno (0.61 mm DE, 0.28 mm DI) (Portex Ltd., Hythe, Kent, Reino Unido) para la posterior conexión de la sonda a la bomba de perfusión. Para fijar los tubos de polietileno a los de acero se envuelve la estructura mediante una capa de plástico termofundible. Posteriormente, habitualmente unos días antes de la implantación de la sonda, se corta el tubo de sílica a la medida que se desee según la región cerebral a estudiar y se introduce la membrana de diálisis Cuprophan (Gambro, Lund, Suecia) en el interior del tubo de 25G, recubriendo pues el tubo de sílica. La membrana es una fibra vacía de celulosa regenerada (0.25 mm DE, 0.22 DI) con tamaño de poro que permite el paso de moléculas de peso inferior a 5000 daltons. Tanto el extremo de la membrana como la zona de unión al tubo de acero se sellan con Loctite® gel.



**Figura 14** – Esquema de una sonda de microdiálisis. La sonda está constituida por dos tubos cortos de acero inoxidable (1), de 27G y uno más largo (2) de 25G. La unión de los tres está sellada mediante Araldit® (3) y protegida por cemento dental Kerr® TAB 2000 (4) y por plástico termofundible (5), que fija los dos tubos de polietileno (6). Por uno de los tubos de sílica fundida, el más largo (7), entrará el líquido de perfusión hasta llegar a la membrana de diálisis (8), donde se realiza el intercambio. El extremo de la membrana y su unión al tubo de acero está selladas mediante Loctite® Gel (9). El dializado entra por el otro tubo de sílica fundida (10) y saldrá por el otro tubo de polietileno (11).

## 2.2. IMPLANTACIÓN DE LAS SONDAS DE MICRODIÁLISIS

Las ratas fueron anestesiadas con una dosis de pentobarbital sódico (60 mg/Kg intraperitoneal) y posteriormente colocadas en un estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA) para la implantación de la sonda en la región de interés del cerebro. En el presente trabajo se han realizado experimentos donde se implantó una sonda así como otros en los que se implantaron dos sondas en distintas regiones. En este último caso, una de las sondas siempre se implantó en la corteza prefrontal derecha del animal. Las coordenadas estereotáxicas se calculan según el atlas de anatomía del cerebro de rata de Paxinos y Watson (1986), tomando el bregma para las coordenadas antero-posterior (AP) y lateral (L) y la duramáter para la dorso-ventral (DV). A continuación se muestran las coordenadas utilizadas para las diferentes áreas de estudio así como la longitud de la membrana de diálisis para cada zona:

Zona	Longitud	Antero– posterior	Lateral	Dorso–ventral
Corteza prefrontal medial	4	+3.2	-0.6 ±0.6*	-6
Hipocampo ventral	3	-6.3	-5.5	-7.5
Pálido ventral	1.5	-0.3	-2.4	-8.8
N. reticular	1.5	-2.5	-3.2	-7.5

**Figura 15** – Longitud de la membrana de la sonda de diálisis según la región cerebral y coordenadas estereotáxicas respecto a bregma (AP y L) o duramáter (DV). Todos los valores están expresados en mm.

\* valor para la implantación de la sonda izquierda y derecha en los experimentos de doble sonda en corteza.

Con el animal en el estereotáxico se practica una incisión longitudinal dejando al descubierto el cráneo. Se toman las coordenadas de bregma y se perfora el cráneo en las coordenadas de la región (o regiones, en el caso de los experimentos de doble sonda) de interés con una broca sin llegar a romper la duramáter. A continuación se realizan tres agujeros más en el cráneo (rodeando los lugares donde se implantarán las sondas) en los que se colocarán unos tornillos para poder anclar posteriormente la sonda. Tras tomar la coordenada DV se procede a romper la duramáter y a introducir la sonda en el cerebro. Al finalizar, se prepara una base de cemento dental Kerr® TAB 2000 que permite fijar la sonda a los tornillos. Tras este procedimiento, los animales son individualizados con agua y comida *ad libitum*.

### 2.3. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

La implantación de la sonda no deja de ser una técnica invasiva en la que se produce una lesión de fibras y neuronas así como rotura de vasos sanguíneos, razón por la cual tras el proceso quirúrgico se dejan transcurrir unas 20 horas antes de empezar el experimento de diálisis, para lograr la total recuperación del animal y la estabilización de la concentración extracelular de los neurotransmisores en el cerebro. En el caso de la detección de serotonina y glutamato, ambos pueden liberarse de forma masiva en el caso de una lesión grave. Las plaquetas contienen una gran cantidad de serotonina que puede ser liberada en procesos de lesión tisular y, de esta forma, enmascarar la serotonina sináptica. Por otro lado, los experimentos de diálisis suelen tener una duración de dos días tras la operación, tiempo tras el cual existe riesgo de que la inflamación y el tejido cicatrizante que se forman alrededor de la sonda alteren la neurotransmisión. Una forma para saber que estos neurotransmisores proceden de impulso nervioso es la administración de TTX a través de la sonda. Esta toxina bloquea la transmisión nerviosa, produciendo una disminución en la concentración de serotonina y glutamato sinápticos.

Transcurridas estas 20 horas, se procede a la conexión de las sondas a la bomba de microdiálisis y a la perfusión del líquido cefalorraquídeo (LCR) artificial, cuya composición es: 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.18 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>.

Un problema frecuente en los estudios de microdiálisis es la baja concentración extracelular de los neurotransmisores. Esto es debido a la gran eficiencia que tienen los transportadores que los recaptan y/o la inactivación metabólica. Para solucionar este problema, en los estudios aquí realizados se ha añadido al LCR artificial un inhibidor selectivo de la recaptación de 5-HT (ISRS), el citalopram, a una concentración de 1 µM. En ausencia de citalopram, la concentración extracelular de 5-HT es un reflejo del balance entre liberación y recaptación de serotonina (Adell et al 1991) mientras que en presencia de citalopram se puede medir, principalmente, el componente de liberación. En todo caso, concentraciones tan bajas de ISRS como la aquí usada no provocan cambios en el glutamato dializado ((Langman et al 2006), Queiroz y Artigas, resultados no publicados)

El LCR artificial se perfunde a un flujo de 1.65 µl/min mediante una bomba de perfusión (Harvard Apparatus Syringe infusion Pump 22, EUA). Las jeringas se conectan a un tubo de polietileno de 0.61 mm DE y 0.28 DI (Portex Ltd, Hythe, Kent, Reino Unido) que conduce a un sistema de conexión giratoria, el *swivel* (Instech Laboratories, Plymouth Meeting PA, EUA) que permite a la rata moverse libremente por la jaula sin que los tubos se desconecten. El *swivel* está conectado a la entrada de la sonda mediante un tubo de polietileno de 0.12 mm DI (Microbiotech). A la salida se conecta otro tubo idéntico que lleva a un vial donde se recoge la muestra dializada (viales de polietileno con tapón con capacidad de 250 µl, Elkay Products Inc., Shrewsbury, MA, EUA). Todas las conexiones entre distintos tubos se realizan mediante unos adaptadores (Microbiotech).

Cuando todo el sistema está lleno del líquido de perfusión, se deja una estabilización de aproximadamente dos horas a partir de la cual se recogen muestras cada 20 minutos. Así pues, el volumen recogido, es de 30 µl por fracción. Tras la estabilización se procede a recoger 6 muestras de las cuales se utilizan las 4 más estables para el cálculo de los valores basales. A partir de la sexta fracción se inicia el tratamiento, es decir, la administración del fármaco ya sea de forma sistémica (subcutáneo o intraperitoneal) o local (disuelto en el líquido de perfusión). Se recogen 12 fracciones (4 horas) de tratamiento, de forma que una diálisis completa son, por lo general, 18 muestras.

Los dializados recogidos de 30 µl se dividieron en dos fracciones de 20 y 10 µl para la determinación de 5-HT y glutamato, respectivamente, permitiendo así estudiar ambos neurotransmisores en los mismos animales.

## 2.4. ADMINISTRACIÓN DE LOS FÁRMACOS

### 2.4.1. Administración local

Los fármacos para administración local se disolvieron en LCR artificial con citalopram o, en determinados casos, en agua destilada, ajustando pH de la preparación en caso que fuera necesario. Las soluciones se conservaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  o, en el caso de ser necesario para preservar su estabilidad, se prepararon antes del experimento.

Tras la recogida de las muestras basales, se sustituyó el líquido de perfusión por otro que contiene el fármaco que se desea estudiar y se perfundió de forma constante durante las siguientes 4 horas de tratamiento. Esto nos permitió estudiar el efecto local del fármaco en la región en la que está implantada la sonda, pudiendo así compararlo con los efectos de su administración sistémica. En el caso de los experimentos de doble sonda, esto nos permitió estudiar los cambios en la neurotransmisión tanto locales como en la región donde está implantada la otra sonda, pudiendo así estudiar la funcionalidad de diferentes circuitos y conexiones entre dos zonas del cerebro.

Es importante tener en cuenta que cuando se perfunde un fármaco de forma local se necesitan concentraciones mayores de éste para que atraviese la membrana de la sonda y actúe sobre una cantidad suficiente de tejido como para que pueda ejercer su efecto. Por un lado, la perfusión local sólo afecta a la zona circundante a la sonda de microdiálisis (relativamente poco tejido) mientras que cuando se da sistémicamente llega a todo el cerebro a través de los capilares. Más aún, las concentraciones efectivas que se obtienen mediante la diálisis reversa difieren unos 3–4 órdenes de magnitud respecto a su afinidad *in vitro*, como muestran trabajos de electrofisiología donde necesitan aplicar concentraciones del orden de  $100\text{ }\mu\text{M}$  para activar receptores (Sakai and Crochet 2001; West and Grace 2002). Esto se debe principalmente al bajo flujo utilizado en conjunción con el continuo drenaje que sufren estos fármacos por la constante perfusión, a parte de que no todo el fármaco atraviesa la membrana de la sonda.

### 2.4.2. Administración sistémica

Los fármacos así aplicados se disolvieron en salino (NaCl 0.9%) y se administraron intraperitonealmente (i.p.) o subcutáneamente (s.c.), según el fármaco y sus características de metabolización, especialmente de primer paso hepático.

## 2.5. ESTUDIOS DEL COMPORTAMIENTO

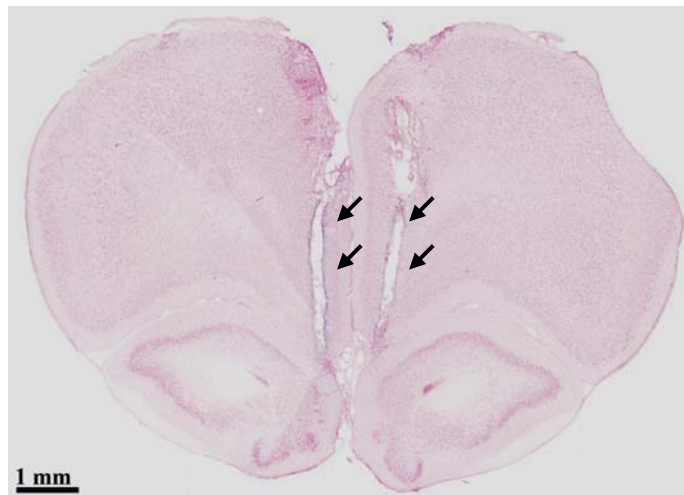
Las medidas del comportamiento del animal se tomaron durante el experimento de microdiálisis. Las estereotipias se valoraron durante los 5 últimos minutos de cada dializado. A las ratas se les asignó un valor de 0 (ausencia), 1

(presencia) o 2 (intenso; >50% del periodo de 5 minutos) por la presencia de las siguientes alteraciones de la conducta: hiperlocomoción y giros, movimientos repetitivos de las patas delanteras y movimientos laterales de la cabeza. La puntuación total se calculó sumando los valores individuales de cada una de esas conductas para cada fracción de 5 minutos.

## 2.6. COMPROBACIÓN DE LA LOCALIZACIÓN DE LA SONDA DE MICRODIÁLISIS

Al finalizar el experimento, el animal fue sacrificado mediante una sobredosis de pentobarbital sódico. A continuación, se perfundió una solución del colorante Fast Green (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA) a través de la sonda o sondas para teñir el tejido circundante a la zona de implantación. Tras unos minutos, se extrajo el cerebro y se congeló a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Una vez congelado se realizaron cortes coronales con un bisturí hasta la visualización de la marca del colorante. En ocasiones en las que se requería una observación más detallada de la localización de la sonda, se procedió a la perfusión del animal primero con solución salina al 0.9 % seguido de la perfusión con formalina al 10% (Sigma). Tras la extracción del cerebro, éste se congeló a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se realizaron cortes coronales de  $50\text{ }\mu\text{m}$  con un criostato. Las secciones obtenidas se tiñeron con Neutral Red (Sigma) para su posterior observación al microscopio.

Aquellos animales en los que se verificó que la localización de la sonda era incorrecta (fuera de la región de interés) fueron descartados para el análisis de los resultados.



**Figura 16** – Corte coronal de corteza prefrontal de rata. En la imagen se pueden observar los lugares de implantación de dos sondas (flechas), en la corteza izquierda y en la derecha.

## 2.7. TRAZADOS CON FLUOROGOLD

En estos experimentos se perfundió una concentración al 0.4% de fluorogold (FG, Fluorochrome LLC, Englewood, CO, USA; 2% en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.3) disuelto en LCR artificial a través de una sonda de microdiálisis implantada en la CPFm derecha a un flujo de 5  $\mu$ l/min durante 10 minutos. Siete días después, tiempo para que el fluorogold marcara retrógradamente las fibras que proyectan a la zona de perfusión, se procedió al sacrificio del animal mediante una sobredosis de pentobarbital sódico y se perfundieron con 4% paraformaldehído. Los cerebros se extrajeron y se guardaron en sucrosa al 10% y se procesaron mediante protocolos estándar descritos previamente. Las secciones de 14  $\mu$ m fueron cortadas en el criostato, montadas en portaobjetos pretratados con Histogrip (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA) y visualizadas directamente con un microscopio de fluorescencia debido a que el trazador utilizado tiene fluorescencia natural.

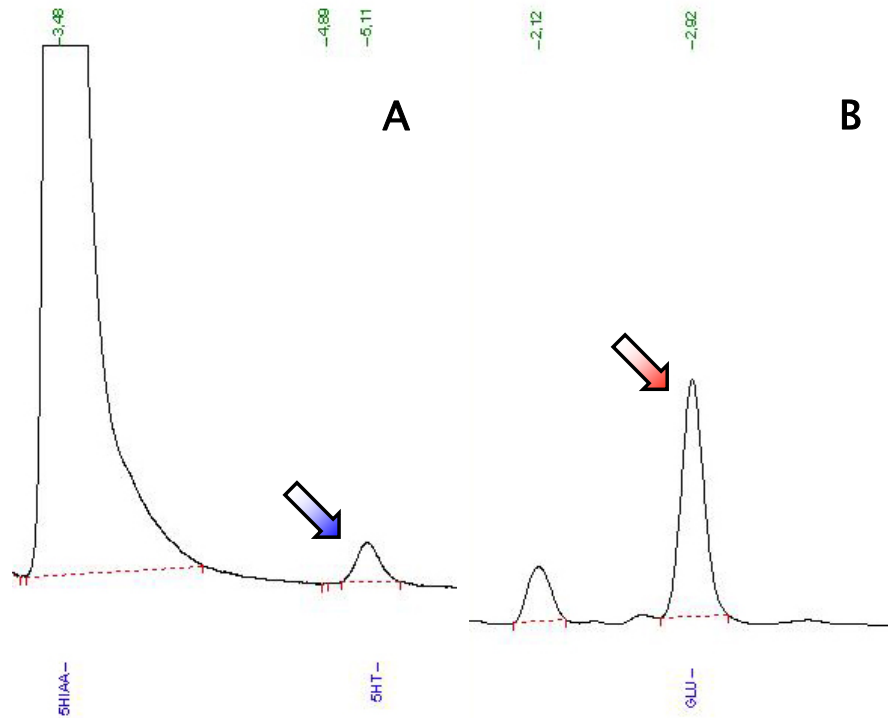
## 2.8. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS OBTENIDAS

La concentración de 5-HT se analizó mediante un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), según el método descrito en (Adell and Artigas 1998). Se utilizó un inyector automático Waters 717plus (Waters Cromatografía, Cerdanyola, España), una bomba Hewlett-Packard 1050 (Agilent Technologies, Las Rozas, España) y una columna Beckman (San Ramon, CA, EUA) de octadecilsilica (ODS) de 3  $\mu$ m de tamaño de partícula, longitud de 7.5 cm. y diámetro de 0.46 cm. para la separación de los compuestos. Estos se detectaron amperométricamente mediante un detector electroquímico Hewlett-Packard 1049 (Agilent Technologies) con un potencial de oxidación de +0.6 V. Como fase móvil se utilizó un eluyente de la siguiente composición por litro de agua milliQ: 0.15 M de fosfato monosódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), 1.8 mM de la sal sódica del ácido 1-octanosulfónico y 0.2 mM de  $\text{Na}_2$ -EDTA, ajustando el pH a 2.8 con ácido fosfórico y añadiendo 30% de metanol. Con un flujo de trabajo de 0.8 ml/min, los tiempos de retención del 5-HIAA y de la 5-HT son de entre 3.5 y 5 minutos, siendo el límite de detección de la 5-HT 4 fmol (figura 17).

Para la detección de glutamato se utilizó otro sistema de HPLC consistente de un inyector automático Waters 717plus, una bomba cuaternaria de gradiente Waters 600 y una columna ODS de 5  $\mu$ m (10 cm. de longitud y 0.4 cm. de diámetro, Teknokroma, España). Las muestras, antes de la inyección en la columna, fueron derivatizadas con OPA, el proceso lo llevó a cabo el inyector automático. Previamente, se le añadió 90  $\mu$ l de agua milliQ a los 10  $\mu$ l de muestra. A estos se les añadió 15  $\mu$ l de OPA y, tras 2.5 minutos de reacción, 80  $\mu$ l de la mezcla se inyectaron en la columna. La detección se realizó con un detector de fluorescencia Waters 470 utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 360 nm y 450 nm, respectivamente. La fase móvil se bombeó a 0.8 ml/min y consistía en dos componentes (Calcagno et al 2006): la solución A (0.05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 28% de



metanol y ajustada a pH 6.4 con 85% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) y la solución B (metanol/agua, en relación de 8:2). Tras la aparición del pico de glutamato a los 3 minutos con un 100% de la solución A, se estableció el gradiente pasando de 100% de solución A a 100% de solución B en 2 minutos. Tras lavar los picos tardíos durante 3 minutos, se recuperaron las condiciones iniciales durante los siguientes 2 minutos. El límite de detección del glutamato fue de 0.2 pmol.



**Figura 17** – Ejemplos de cromatogramas de serotonina (A) y glutamato (B) mostrando respectivamente la presencia de cada neurotransmisor (flechas).

## 2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se expresaron en fmol/fracción y en las figuras se muestran como porcentajes de los valores basales (la media de las 4 fracciones previas al tratamiento). Los datos se analizaron mediante análisis de la variancia (ANOVA) de medidas repetidas, seguido de los test post-hoc necesarios para comparar los efectos de los diferentes factores, generalmente, tratamiento y tiempo, así como de su interacción.



Trabajo 1:

**Clozapine and olanzapine, but not haloperidol, suppress serotonin efflux in the medial prefrontal cortex elicited by phencyclidine and ketamine.**

Amargós-Bosch M., López-Gil X., Artigas F. and Adell A.

*International Journal of Neuropsychopharmacology, 9, 565-573 (2006)*

Los antagonistas del receptor NMDA como la fenciclidina (PCP) o ketamina se utilizan como modelo farmacológico de esquizofrenia por su capacidad de provocar síntomas psicóticos en humanos y alteraciones de la conducta en animales de experimentación. En este primer trabajo examinamos los efectos de la administración de PCP y ketamina sobre la concentración extracelular de serotonina en la corteza prefrontal. La administración sistémica pero no local de estos compuestos provoca un incremento en la liberación de serotonina cortical. Estas alteraciones se bloquearon con la administración sistémica de los antipsicóticos atípicos clozapina y olanzapina, pero no con el fármaco clásico haloperidol. Debido a la importancia de los receptores serotoninérgicos y adrenérgicos en el perfil farmacológico de los antipsicóticos, se estudiaron los efectos de la administración sistémica de un antagonista de los receptores 5-HT<sub>2A/2C</sub>, la ritanserina y un antagonista de los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos, el prazosín. Éste último fue capaz de evitar las alteraciones de los antagonistas NMDA, lo cual indica que las diferencias entre típicos y atípicos no dependen de su común acción sobre los receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos. Por otro lado, parece que el antagonismo 5-HT<sub>2A/2C</sub> solo es efectivo en situaciones de una elevada transmisión serotoninérgica, como muestra el hecho de que la ritanserina sea capaz de bloquear los efectos de la PCP pero no los de la ketamina.



*International Journal of Neuropsychopharmacology* (2006), 9, 565–573. Copyright © 2005 CINP  
doi:10.1017/S1461145705005900

# Clozapine and olanzapine, but not haloperidol, suppress serotonin efflux in the medial prefrontal cortex elicited by phencyclidine and ketamine

Mercè Amargós-Bosch, Xavier López-Gil, Francesc Artigas and Albert Adell

*Department of Neurochemistry, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC (IDIBAPS), 08036 Barcelona, Spain*

## Abstract

*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists such as phencyclidine (PCP) and ketamine can evoke psychotic symptoms in normal individuals and schizophrenic patients. Here, we have examined the effects of PCP (5 mg/kg) and ketamine (25 mg/kg) on the efflux of serotonin (5-HT) in the medial prefrontal cortex (mPFC) and their possible blockade by the antipsychotics, clozapine, olanzapine and haloperidol, as well as ritanserin (5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor antagonist) and prazosin ( $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist). The systemic administration, but not the local perfusion, of the two NMDA receptor antagonists markedly increased the efflux of 5-HT in the mPFC. The atypical antipsychotics clozapine (1 mg/kg) and olanzapine (1 mg/kg), and prazosin (0.3 mg/kg), but not the classical antipsychotic haloperidol (1 mg/kg), reversed the PCP- and ketamine-induced increase in 5-HT efflux. Ritanserin (5 mg/kg) was able to reverse only the effect of PCP. These findings indicate that an increased serotonergic transmission in the mPFC is a functional consequence of NMDA receptor hypofunction and this effect is blocked by atypical antipsychotic drugs.

*Received 24 March 2005; Reviewed 18 April 2005; Revised 15 June 2005; Accepted 15 June 2005;  
First published online 15 August 2005*

**Key words:** Clozapine, haloperidol, ketamine, phencyclidine, serotonin.

## Introduction

The hypothesis of the *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor hypofunction in schizophrenia stems from the observation that NMDA receptor antagonists such as phencyclidine (PCP) and ketamine can evoke psychotic symptoms in normal individuals and aggravate them in schizophrenic patients (for review, see Krystal et al., 2003). For these reasons, NMDA receptor antagonists have been used in experimental animals to model neurochemical and behavioural changes that occur in schizophrenia. Thus, systemic administration of PCP or dizocilpine (MK-801) increases the firing of neurons of the medial prefrontal cortex (mPFC) and causes hyperlocomotion and stereotypies (Jackson et al., 2004; Jodo et al., 2003; Suzuki et al., 2002).

However, microiontophoretically applied PCP does not alter either mPFC cell firing or hyperlocomotion (Suzuki et al., 2002), which suggests that the NMDA receptor antagonists turn on mPFC neurons through the stimulation of excitatory inputs from brain areas outside the mPFC. NMDA receptor antagonists have also been shown to increase extracellular glutamate (Abekawa et al., 2003; Lorrain et al., 2003; Moghaddam et al., 1997), dopamine (Adams and Moghaddam, 1998; Mathé et al., 1999; Schmidt and Fadayel, 1996), and serotonin (5-HT) (Adams and Moghaddam, 2001; Martin et al., 1998a; Millan et al., 1999) in the mPFC. The source of this glutamate is presently unknown, but it has been proposed that NMDA receptor antagonists may block a tonic inhibitory influence of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) neurons over an excitatory projection to the mPFC (Jodo et al., 2005; Krystal et al., 2003; Lorrain et al., 2003; Moghaddam et al., 1997). The increases in dopamine and 5-HT release are probably due to increments in dopaminergic (Pawłowski et al., 1990; Schmidt and Fadayel, 1996) and serotonergic (Lejeune et al., 1994)

Address for correspondence: Dr A. Adell, Department of Neurochemistry, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, CSIC (IDIBAPS), Carrer Rosselló 161, 6th Floor, 08036 Barcelona, Spain.

Tel.: +34-93-3638321 Fax: +34-93-3638301

E-mail: aacnqj@iibb.csic.es

cell firing in the ventral tegmental area and the dorsal raphe nucleus respectively. This latter activation could result from an enhanced glutamatergic output from the mPFC neurons, including those projecting to the dorsal raphe nucleus. Indeed, the electrical or pharmacological stimulation of the mPFC increases serotonergic transmission in the dorsal raphe nucleus (Celada et al., 2001; Martín-Ruiz et al., 2001). Nevertheless, a local effect of NMDA receptor antagonists in the dorsal raphe nucleus cannot be ruled out (Callado et al., 2000).

Although a hyperactive serotonergic transmission in the mPFC has been implicated in schizophrenia (Meltzer, 1989) and in the hyperlocomotion induced by a reduced NMDA receptor function (Miyamoto et al., 2001), the precise role of cortical 5-HT on these effects remains to be determined. However, a relationship between 5-HT and schizophrenia stems from two main observations. First, 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor agonists elicit hallucinogenic states in humans resembling those present in positive symptomatology (Gouzoulis-Mayfrank et al., 1998), and markedly increase the firing rate of pyramidal neurons in the mPFC (Puig et al., 2003). Likewise, the selective activation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in rodent mPFC increases local 5-HT release (Amargós-Bosch et al., 2004; Bortolozzi et al., 2003; Martín-Ruiz et al., 2001; Puig et al., 2003), which could point to an activation of mPFC serotonergic transmission in the illness. Second, atypical antipsychotics are effective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonists. In previous studies we have shown that antipsychotic drugs reverse the increase of the local extracellular 5-HT induced by the pharmacological stimulation of the mPFC with 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenergic receptor agonists (Amargós-Bosch et al., 2003; Bortolozzi et al., 2003). In the present work, we have examined the effects of clozapine, olanzapine and haloperidol on the efflux of 5-HT in the mPFC elicited by PCP and ketamine. In an attempt to understand the contribution of 5-HT<sub>2A/2C</sub> and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors in the action of these antipsychotic drugs, the effects of ritanserin and prazosin were also tested.

## Materials and methods

### Animals

Male Wistar rats (Iffa-Credo, Lyon, France) weighing 250–280 g were used. They were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 hours) and housed three per cage before surgery and individually after surgery. Food and water were always freely available. All experimental procedures were carried out in strict accordance with European Communities Council

Directive on 'Protection of Animals Used in Experimental and Other Scientific Purposes' of 24 November 1986 (86/609/EEC) and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees.

### Drugs

Phencyclidine hydrochloride, ritanserin and prazosin hydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich (Tres Cantos, Spain). Ketamine hydrochloride (Ketolar<sup>®</sup>, 50 mg/ml) and haloperidol were purchased as injectable solutions from Pfizer and Laboratorios Esteve (Barcelona, Spain) respectively. Clozapine was obtained from Tocris (Bristol, UK). Olanzapine and citalopram hydrobromide were generously donated by Eli Lilly & Co (Indianapolis, IN, USA) and H. Lundbeck A/S (Copenhagen-Valby, Denmark) respectively. PCP and Ketolar<sup>®</sup> were dissolved in distilled water or artificial cerebrospinal fluid according to the route of administration. Clozapine, olanzapine, prazosin and ritanserin were dissolved in a few drops of glacial acetic acid and further diluted with distilled water for systemic administration, or artificial cerebrospinal fluid (see below for composition) for local application through dialysis probes. When needed, the pH of the final concentrations was adjusted to 6.5–7.0 with NaHCO<sub>3</sub>. Because PCP and ketamine were administered intraperitoneally (i.p.) and subcutaneously (s.c.) respectively, two different control groups were run in parallel. One group consisted of a first s.c. injection followed 20 min later by an i.p. injection of saline and served as control for the experiment with PCP. The other group consisted of two s.c. injections of saline and served as control for the ketamine experiment. When antipsychotics, prazosin and ritanserin were administered alone, a single s.c. injection of saline served as control group.

### Microdialysis procedures

Concentric dialysis probes with a 4-mm long membrane were implanted under sodium pentobarbital anaesthesia (60 mg/kg i.p.) in the mPFC (AP +3.2 mm, L –0.8 mm, DV –6.0 mm; from Bregma) according to Paxinos and Watson (1986). Microdialysis experiments were conducted 20–24 h after surgery in freely moving rats by continuously perfusing probes with artificial cerebrospinal fluid containing 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.18 mM MgCl<sub>2</sub> and 1  $\mu$ M citalopram, at a rate of 1.5  $\mu$ l/min. Dialysate samples of 30  $\mu$ l were collected every 20 min. After a 100-min stabilization period, four dialysate samples were collected to obtain basal 5-HT values before

pharmacological treatment. At the completion of dialysis experiments, rats were given an overdose of sodium pentobarbital and a Fast Green solution was perfused through the dialysis probes to stain the surrounding tissue.

### Biochemical determinations

The concentration of 5-HT in dialysate samples was determined by HPLC using a 3- $\mu$ m octadecylsilica (ODS) column (7.5 cm  $\times$  0.46 cm; Beckman, San Ramon, CA, USA) and detected amperometrically with a Hewlett-Packard 1049 detector (Palo Alto, CA, USA) set at an oxidation potential of 0.6 V. The detection limit for 5-HT was estimated to be  $\sim$ 1 fmol/sample.

### Experimental design

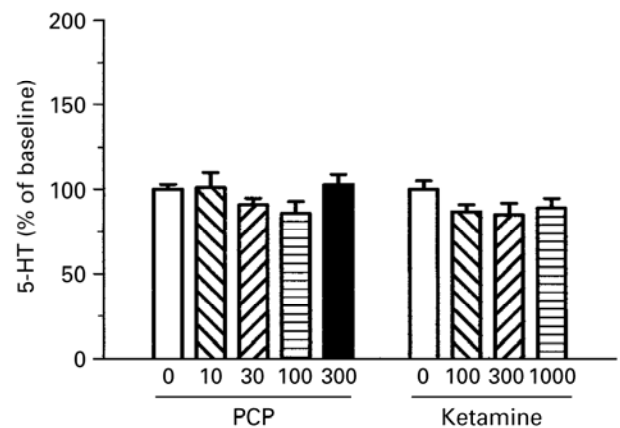
Basically, each experimental group started with the collection of four dialysate samples before drug administration (basal values). Then, a systemic injection (i.p. or s.c.) of saline or a drug (clozapine, olanzapine, haloperidol, prazosin or ritanserin), followed by the administration of a NMDA receptor antagonist (PCP or ketamine) or saline. To examine the local effects of NMDA receptor antagonists on extracellular 5-HT, successive increasing concentrations of PCP or ketamine were perfused for 80 min following the collection of four basal dialysate samples. The rats of the corresponding control group were perfused only with artificial cerebrospinal fluid.

### Statistics

Data (mean  $\pm$  S.E.M.) are expressed as fmol/fraction (uncorrected for recovery) and shown in figures as percentages of basal values, averaged from four fractions collected before treatment. The changes in dialysate 5-HT were analysed by two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) with time and drug as factors. Area under the curve (AUC) was also calculated for the different treatments and expressed as percentage from the same period of control rats. When significant effects were found, post-hoc Newman-Keuls tests were used to compare the effects of each drug (or combination thereof) with the corresponding control group. The level of significance was set at  $p < 0.05$ . For the sake of clarity, significant effects are depicted only in the AUC figures.

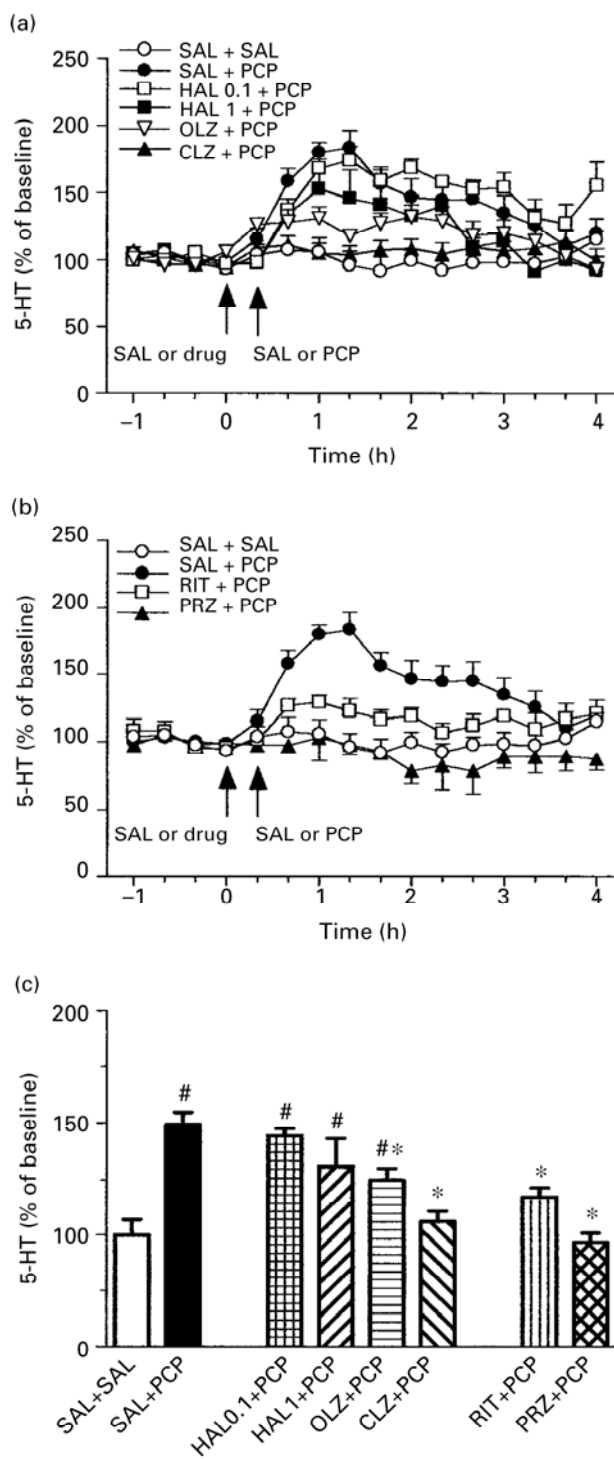
### Results

The basal (pre-drug) concentration of 5-HT was not significantly different among all experimental groups



**Figure 1.** Effects of the local perfusion of different concentrations (in  $\mu$ M) of PCP ( $n = 5$  for each concentration) and ketamine ( $n = 5$  for each concentration) on the 5-HT efflux in the mPFC. There was no significant effect of any NMDA receptor antagonist at the concentrations tested. Data (mean  $\pm$  S.E.M.) are expressed as percentage of baseline.

and amounted to  $37.6 \pm 1.7$  fmol/sample ( $n = 126$ ). The perfusion of PCP (10, 30, 100, 300  $\mu$ M) or ketamine (100, 300, 1000  $\mu$ M) in the mPFC did not change the local concentration of 5-HT (Figure 1). There was no difference between the three control groups used with regard to dialysate 5-HT. As described thoroughly in the literature, the systemic administration of PCP (5 mg/kg i.p.) and ketamine (25 mg/kg s.c.) to rats evoked a marked hyperlocomotion and stereotypies (behavioural observation). The concentration of 5-HT was also elevated significantly following the systemic administration of PCP ( $F_{1,12} = 17.28$ ,  $p < 0.002$ ) and ketamine ( $F_{1,12} = 16.26$ ,  $p < 0.002$ ). The effect of PCP was  $\sim$ 20% higher than that of ketamine, but this difference did not reach statistical significance. The PCP-induced increase of 5-HT was suppressed by clozapine 1.0 mg/kg s.c. ( $F_{1,11} = 10.79$ ,  $p < 0.01$ ), olanzapine 1.0 mg/kg s.c. ( $F_{1,14} = 5.24$ ,  $p < 0.05$ ), ritanserin 5.0 mg/kg i.p. ( $F_{1,11} = 5.12$ ,  $p < 0.05$ ) and prazosin 0.3 mg/kg s.c. ( $F_{1,9} = 14.08$ ,  $p < 0.005$ ), but not by haloperidol 0.1 mg/kg and 1.0 mg/kg s.c. (Figure 2). In a similar way, the ketamine-induced increase of 5-HT was abolished by clozapine 1.0 mg/kg s.c. ( $F_{1,12} = 12.92$ ,  $p < 0.005$ ), olanzapine 1.0 mg/kg s.c. ( $F_{1,14} = 5.61$ ,  $p < 0.05$ ) and prazosin 0.3 mg/kg s.c. ( $F_{1,12} = 30.66$ ,  $p < 0.0002$ ), but not by haloperidol 1.0 mg/kg s.c. and ritanserin 5.0 mg/kg i.p. (Figure 3). When injected alone (Figure 4), clozapine 1.0 mg/kg s.c. ( $F_{1,9} = 8.38$ ,  $p < 0.02$ ), haloperidol 1.0 mg/kg s.c. ( $F_{1,7} = 6.39$ ,  $p < 0.05$ ) and prazosin 0.3 mg/kg s.c. ( $F_{1,8} = 15.67$ ,  $p < 0.005$ ), reduced mPFC 5-HT to the same extent ( $\sim$ 70% of baseline values). In contrast, ritanserin 5.0 mg/kg i.p. resulted in a 20%



**Figure 2.** Effects of phencyclidine (PCP) 5 mg/kg i.p. on the 5-HT efflux in the mPFC alone ( $n=8$ ) or in combination with antipsychotic drugs (a) or receptor antagonists (b). Data (mean  $\pm$  S.E.M.) in (a) and (b) are expressed as percentage of baseline. The group SAL + PCP in (a) has been replotted in (b). Data in (c) represent the area under the curve (AUC) of the different treatments. PCP increased dialysate 5-HT with respect to the control group ( $n=6$ ) that received two injections of saline (SAL). The effect of PCP was blocked by pretreatment with clozapine 1.0 mg/kg s.c. (CLZ,  $n=5$ ),

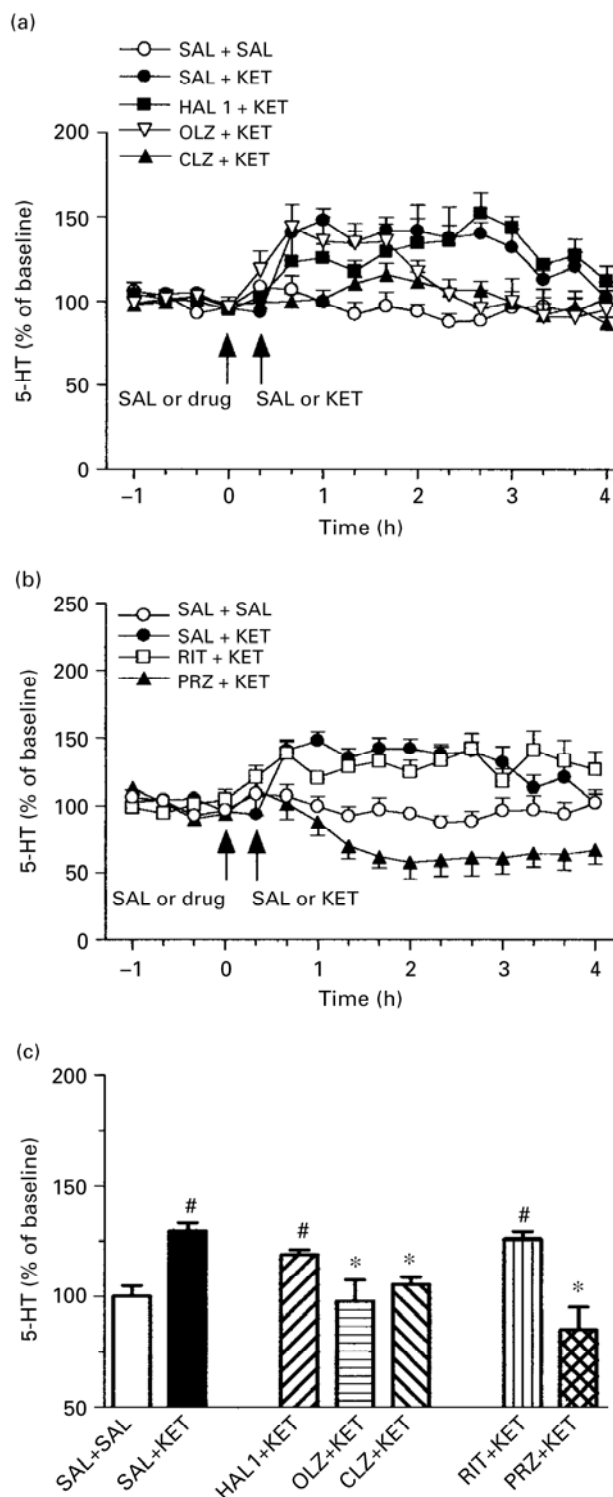
increase ( $F_{1,11} = 10.05$ ,  $p < 0.01$ ) and olanzapine 1.0 mg/kg s.c. produced no change in dialysate 5-HT. It was of note that none of these drugs evoked any gross behavioural change when administered alone (behavioural observation).

### Discussion

The first main finding of this study is that the systemic administration of the NMDA receptor antagonists, PCP and ketamine, increases the efflux of 5-HT in the mPFC. To the best of our knowledge, this was previously shown for PCP (Adams and Moghaddam, 2001; Martin et al., 1998a; Millan et al., 1999), but not for ketamine. Likewise, previous work had shown increases in 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) following MK-801 administration (Kashiwa et al., 1995; Lindfors et al., 1997; Löscher et al., 1993), which could be indicative of an enhanced 5-HT metabolism and/or release. Altogether these findings indicate that an increased serotonergic transmission in the mPFC is a general response to NMDA receptor hypofunction. There does not seem to be differences between competitive and non-competitive NMDA receptor antagonists since both classes of compounds produce a similar activation of cortical serotonergic pathways (Löscher et al., 1993) and 5-HT release (Ceglia et al., 2004). Furthermore, this effect does not result from a direct action of these compounds on the mPFC because the local application of PCP or ketamine did not produce any change in the concentration of 5-HT. In line with our results, the intra-mPFC administration of NMDA receptor antagonists does not affect the local neuronal activity (Aghajanian and Marek, 2000; Jodo et al., 2003; Suzuki et al., 2002), which suggests that the NMDA receptors responsible for such actions are located outside the mPFC. One possible site of action of NMDA receptor antagonists is the ventral hippocampus because the local application of PCP or MK-801 in this region increases the firing of pyramidal neurons in the mPFC (Jodo et al., 2005). According to the hypothesis of the disinhibition of glutamatergic input to the mPFC (see Introduction), PCP and ketamine would increase glutamate release onto non-NMDA receptors in the mPFC (Krystal et al., 2003; Lorrain et al., 2003; Moghaddam et al., 1997).

olanzapine 1.0 mg/kg s.c. (OLZ,  $n=8$ ) and prazosin 0.3 mg/kg s.c. (PRZ,  $n=4$ ), but not by haloperidol 0.1 mg/kg s.c. (HAL 0.1,  $n=4$ ), haloperidol 1.0 mg/kg s.c. (HAL 1,  $n=5$ ) or ritanserin 5.0 mg/kg i.p. (RIT,  $n=5$ ). \*  $p < 0.05$  compared to SAL + PCP group and #  $p < 0.05$  compared to SAL + SAL group.



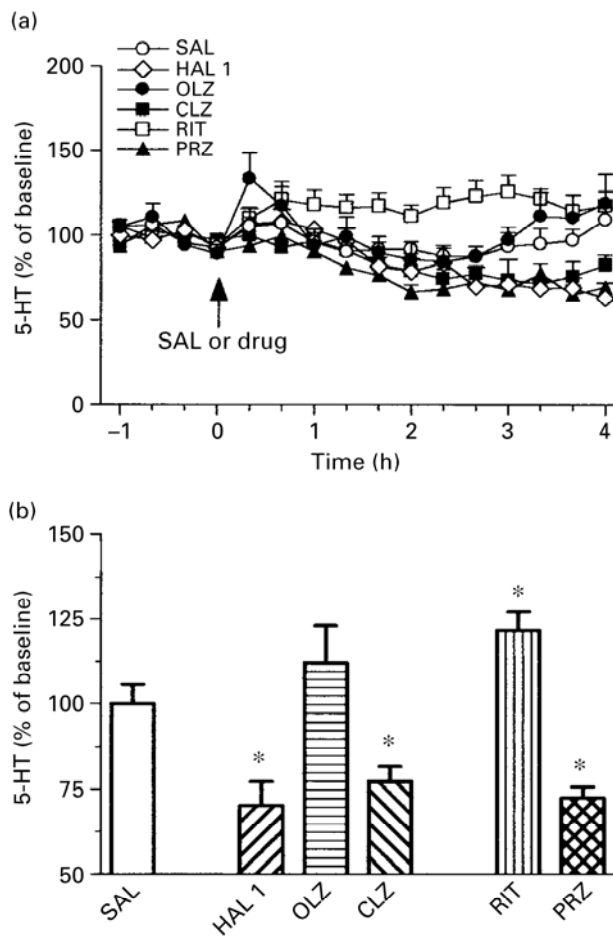


**Figure 3.** Effects of ketamine (KET) 25 mg/kg s.c. on the 5-HT efflux in the mPFC alone ( $n=9$ ) or in combination with antipsychotic drugs (a) or receptor antagonists (b). Data (mean  $\pm$  S.E.M.) in (a) and (b) are expressed as percentage of baseline. The group SAL+KET in (a) has been replotted in (b). Data in (c) represent the area under the curve (AUC) of the different treatments. Ketamine increased dialysate 5-HT with respect to the control group ( $n=5$ ) that received two

The stimulation of such non-NMDA receptors would, in turn, produce an enhanced glutamatergic output from the mPFC neurons, including those projecting to the dorsal raphe nucleus, thereby enhancing serotonergic cell firing and cortical 5-HT efflux. Therefore, the observed effects on 5-HT efflux would be secondary to a primary release of glutamate in the mPFC. In line with these results, the release of 5-HT in the mPFC evoked by the 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor agonist 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI) or the  $\alpha_1$ -adrenoceptor agonist cirazoline was reversed by the activation of mGluR2/3 receptors (Amargós-Bosch et al., 2003; Bortolozzi et al., 2003; Martín-Ruiz et al., 2001). However, although this functional interplay between the mPFC and the dorsal raphe nucleus is well documented (Amargós-Bosch et al., 2003; Celada et al., 2001; Hajós et al., 1998; Lucas et al., 2005; Martín-Ruiz et al., 2001), a direct influence of NMDA receptor antagonists on serotonergic neurons at the level of the dorsal raphe nucleus cannot be discarded. Indeed, the local application of MK-801 into the dorsal raphe nucleus increases the local release of 5-HT both in vitro (Callado et al., 2000) and in vivo (Tao and Auerbach, 2000). A third alternative could be that the NMDA receptor antagonist-induced excess of cortical glutamate would act on AMPA receptors presumably located on serotonergic terminals in the mPFC, thus promoting 5-HT release. Several reports have described the presence of such AMPA receptors in the presynaptic compartment with a role in the regulation of transmitter release (Schenk and Matteoli, 2004). Moreover, the existence of presynaptic AMPA receptors in serotonergic nerve endings has been proposed in other regions of the brain (Maione et al., 1997) although it remains to be determined in the mPFC.

The second important finding of the present study is that the increased efflux of 5-HT produced by the systemic administration of PCP and ketamine was reversed by the atypical antipsychotics clozapine and olanzapine, but not by the classical antipsychotic haloperidol. The blocking effect of olanzapine was

injections of saline (SAL). The effect of ketamine was blocked by pretreatment with clozapine 1.0 mg/kg s.c. (CLZ,  $n=5$ ), olanzapine 1.0 mg/kg s.c. (OLZ,  $n=7$ ) and prazosin 0.3 mg/kg s.c. (PRZ,  $n=5$ ), but not by haloperidol 1.0 mg/kg s.c. (HAL 1,  $n=4$ ) or ritanserin 5.0 mg/kg i.p. (RIT,  $n=4$ ). \*  $p < 0.05$  compared to SAL + KET group and #  $p < 0.05$  compared to SAL + SAL group.



**Figure 4.** Effects of haloperidol 1.0 mg/kg s.c. (HAL 1,  $n=4$ ), olanzapine 1.0 mg/kg s.c. (OLZ,  $n=4$ ), clozapine 1.0 mg/kg s.c. (CLZ,  $n=6$ ), ritanserin 5.0 mg/kg i.p. (RIT,  $n=6$ ) and prazosin 0.3 mg/kg s.c. (PRZ,  $n=5$ ) on 5-HT efflux in the mPFC. Data (mean  $\pm$  S.E.M.) in (a) are expressed as percentage of baseline. Data in (b) represent the area under the curve (AUC) of the different treatments. With respect to the saline-treated group (SAL,  $n=7$ ), only haloperidol ( $*p < 0.05$ ), clozapine ( $*p < 0.02$ ) and prazosin ( $*p < 0.005$ ) significantly reduced 5-HT efflux.

delayed in comparison with that of clozapine, which may be related to differences in kinetics of the drugs. In general, atypical antipsychotics have been shown to be more effective than classical antipsychotics in reversing behavioural deficits (for review, see Jentsch and Roth, 1999) and the blockade of NMDA responses on pyramidal neurons of the mPFC (Wang and Liang, 1998) elicited by PCP. It remains to be determined, however, if the effects of clozapine and olanzapine are dependent on cortical glutamate changes. Previous research appeared to point in that direction inasmuch as clozapine tended to block glutamate efflux induced by PCP (Adams and Moghaddam, 2001). However, the high variability of the responses precluded any

definitive conclusion. On the other hand, the effects of PCP and ketamine were antagonized by the selective  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist prazosin. Both clozapine and haloperidol possess a similar affinity for the  $\alpha_1$ -adrenoceptor (Arnt and Skarsfeldt, 1998; Millan et al., 1998) and together with olanzapine are able to inhibit serotonergic cell firing in the dorsal raphe nucleus through  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonism (Millan et al., 1998; Sprouse et al., 1999). Furthermore, clozapine and haloperidol occupy a similar amount ( $\sim 50\%$ ) of cortical  $\alpha_1$ -adrenoceptors at the doses used in the present work (Chaki et al., 1999). Altogether these findings would suggest that, at the doses tested, the partial occupancy of  $\alpha_1$ -adrenoceptors is not responsible for the different effects of these drugs on the efflux of 5-HT and that these effects would not result from an inhibition of serotonergic cell firing but rather from a direct cortical action. In contrast, the dose of prazosin fully occupies brain  $\alpha_1$ -adrenoceptors (Patel et al., 2001). Thus, its effects may result not only from a post-synaptic action in the mPFC since its local application in the mPFC markedly reduced 5-HT release (Amargós-Bosch et al., 2003), but also from its strong inhibition of serotonergic cell firing at the raphe level (Baraban and Aghajanian, 1980). Nevertheless, it should be kept in mind that the sole blockade of  $\alpha_1$ -adrenoceptors does not possess antipsychotic action.

In addition to  $\alpha_1$ -adrenoceptors, clozapine and olanzapine exhibit affinities much greater than that of haloperidol for 5-HT<sub>2C</sub> receptors (Arnt and Skarsfeldt, 1998; Bymaster et al., 1996). However, antagonism at 5-HT<sub>2C</sub> receptors increases serotonergic transmission. Thus, a selective 5-HT<sub>2C</sub> receptor antagonist (SB 242084) is able to potentiate cortical 5-HT release elicited by 5-HT reuptake blockade (Cremers et al., 2004). This is probably the mechanism by which ritanserin slightly but significantly increased mPFC 5-HT in the present work.

Finally, clozapine and olanzapine share a high affinity for the 5-HT<sub>2A</sub> receptor (Arnt and Skarsfeldt, 1998; Bymaster et al., 1996), which suggests that this receptor could theoretically play a role in the action of these drugs in reducing the increased efflux of 5-HT evoked by PCP and ketamine. In fact, the 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor antagonist ritanserin was able to abolish the effects of PCP on the 5-HT efflux, which can be predominantly attributed to its 5-HT<sub>2A</sub> antagonistic properties (see above). In accord with our results, the selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, M100907, offsets the PCP-induced hyperlocomotion, although PCP does not directly interact with 5-HT<sub>2A</sub> receptors (Millan et al., 1999). In addition, the pharmacological stimulation of the mPFC with S-AMPA is also

reversed by 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonists (Amargós-Bosch et al., 2003), which suggests that the 5-HT<sub>2A</sub> antagonism is able to counteract an excessive stimulation of AMPA receptors in the mPFC. However, ritanserin did not antagonize the ketamine-induced increase in 5-HT efflux, despite it being somewhat lower than that produced by PCP. One possibility of reconciling these apparently discordant findings is that 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor blockade may be effective only in conditions of a high serotonergic tone. In accordance with this, M100907 can block MK-801-induced hyperlocomotion, but not after 5-HT depletion (Martin et al., 1998b). The precise location of the 5-HT<sub>2A</sub> receptors responsible for these effects remains to be determined. It is of significance that, although M100907 is able to block the effects of 5-HT<sub>2A</sub> receptor agonists at the level of the dorsal raphe nucleus (Boothman et al., 2003), the evidence that 5-HT cells do not express 5-HT<sub>2A</sub> receptors (Cornea-Hébert et al., 1999; Pompeiano et al., 1994) further suggests that post-synaptic (possibly cortical) 5-HT<sub>2A</sub> receptors are involved.

Regardless of the precise mechanism, it seems that the ability to prevent the NMDA receptor antagonist-induced enhancement of 5-HT efflux in the mPFC may be a characteristic of atypical antipsychotic drugs. At the dose of 1 mg/kg, it is possible that occupancy of both  $\alpha_1$ -adrenergic and 5-HT<sub>2A</sub> receptors by clozapine and olanzapine may contribute to the blockade of the NMDA receptor antagonism-induced increase in cortical 5-HT efflux. Given that an overactive serotonergic transmission has been inferred to occur in schizophrenia, a reduction of 5-HT in the mPFC may be suggestive of a better antipsychotic profile for negative-cognitive symptoms. It must be taken into consideration, however, that the effects observed in the present work are limited to the pharmacological profiles of clozapine and olanzapine. While all classical antipsychotics are characterized by a predominant D<sub>2</sub> receptor antagonism, within the atypical class each drug possesses a distinct pharmacological profile. It is, therefore, difficult to assign the blockade of NMDA receptor antagonist-induced release of cortical 5-HT to a particular receptor interaction, although the 5-HT<sub>2A</sub> receptor seems to have an important contribution.

#### Acknowledgements

This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Science (SAF2004-05525) and the CIEN Network (IDIBAPS-ISCI III RTIC C03/06). M.A.-B. and X.L.-G. are recipients of predoctoral

fellowships from the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) and Ministry of Education and Science respectively. The excellent technical assistance of Leticia Campa is greatly appreciated. Thanks are also due to Eli Lilly & Co and H. Lundbeck A/S for their generous supply of drugs.

#### Statement of Interest

None.

#### References

- Abekawa T, Honda M, Ito K, Koyama T (2003). Effects of NRA0045, a novel potent antagonist at dopamine D<sub>4</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, and  $\alpha_1$ -adrenaline receptors, and NRA0160, a selective D<sub>4</sub> receptor antagonist, on phencyclidine-induced behavior and glutamate release in rats. *Psychopharmacology* 169, 247–256.
- Adams BW, Moghaddam B (1998). Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. *Journal of Neuroscience* 18, 5545–5554.
- Adams BW, Moghaddam B (2001). Effect of clozapine, haloperidol, or M100907 on phencyclidine-activated glutamate efflux in the prefrontal cortex. *Biological Psychiatry* 50, 750–757.
- Aghajanian GK, Marek GJ (2000). Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Research Reviews* 31, 302–312.
- Amargós-Bosch M, Adell A, Bortolozzi A, Artigas F (2003). Stimulation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors in the rat medial prefrontal cortex increases the local *in vivo* 5-hydroxytryptamine release: reversal by antipsychotic drugs. *Journal of Neurochemistry* 87, 831–842.
- 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<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2A</sub> receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cerebral Cortex* 14, 281–299.
- Arnt J, Skarsfeldt T (1998). Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. *Neuropsychopharmacology* 18, 63–101.
- Baraban JM, Aghajanian GK (1980). Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. *Neuropharmacology* 19, 355–363.
- Boothman LJ, Allers KA, Rasmussen K, Sharp T (2003). Evidence that central 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2B/C</sub> receptors regulate 5-HT cell firing in the dorsal raphe nucleus of the anaesthetised rat. *British Journal of Pharmacology* 139, 998–1004.
- Bortolozzi A, Amargós-Bosch M, Adell A, Díaz-Mataix L, Serrats J, Pons S, Artigas F (2003). *In vivo* modulation of 5-hydroxytryptamine release in mouse prefrontal cortex by local 5-HT<sub>2A</sub> receptors: effect of antipsychotic drugs. *European Journal of Neuroscience* 18, 1235–1246.

- Bymaster FP, Calligaro DO, Falcone JF, Marsh RD, Moore NA, Tye NC, Seeman P, Wong DT** (1996). Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacology* 14, 87–96.
- Callado LF, Hopwood SE, Hancock PJ, Stamford JA** (2000). Effects of dizocilpine (MK 801) on noradrenaline, serotonin and dopamine release and uptake. *Neuroreport* 11, 173–176.
- Ceglia I, Carli M, Baviera M, Renoldi G, Calcagno E, Invernizzi RW** (2004). The 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist M100,907 prevents extracellular glutamate rising in response to NMDA receptor blockade in the mPFC. *Journal of Neurochemistry* 91, 189–199.
- 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<sub>A</sub>, and glutamate receptors. *Journal of Neuroscience* 21, 9917–9929.
- Chaki S, Funakoshi T, Yoshikawa R, Okuyama S, Kumagai T, Nakazato A, Nagamine M, Tomisawa K** (1999). In vivo receptor occupancy of NRA0045, a putative atypical antipsychotic in rats. *Neuropharmacology* 38, 1185–1194.
- Cornea-Hébert V, Riad M, Wu C, Singh SK, Descarries L** (1999). Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the central nervous system of adult rat. *Journal of Comparative Neurology* 409, 187–209.
- Cremers TIFH, Giorgetti M, Bosker FJ, Hogg S, Arnt J, Mørk A, Honig G, Bøgesø K-P, Westerink BHC, den Boer H, Wikstrom H, Tecott LH** (2004). Inactivation of 5-HT<sub>2C</sub> receptors potentiates consequences of serotonin reuptake blockade. *Neuropsychopharmacology* 29, 1782–1789.
- Gouzoulis-Mayfrank E, Habermeyer E, Hermle L, Steinmeyer AM, Kunert HJ, Sass H** (1998). Hallucinogenic drug-induced status resemble acute endogenous psychoses: results of an empirical study. *European Psychiatry* 13, 399–406.
- Hajós M, Richards CD, Székely AD, Sharp T** (1998). An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projections to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neuroscience* 87, 95–108.
- Jackson ME, Homayoun H, Moghaddam B** (2004). NMDA receptor hypofunction produces concomitant firing rate potentiation and burst activity reduction in the prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101, 8467–8472.
- Jentsch JD, Roth RH** (1999). The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20, 201–225.
- Jodo E, Suzuki Y, Katayama T, Hoshino K-Y, Takeuchi S, Niwa S-I, Kayama Y** (2005). Activation of medial prefrontal cortex by phencyclidine is mediated via a hippocampo-prefrontal pathway. *Cerebral Cortex* 15, 663–669.
- Jodo E, Suzuki Y, Takeuchi S, Niwa S, Kayama Y** (2003). Different effects of phencyclidine and methamphetamine on firing activity of medial prefrontal cortex neurons in freely moving rats. *Brain Research* 962, 226–231.
- Kashiwa A, Nishikawa T, Nishijima K, Umino A, Takahashi K** (1995). Dizocilpine (MK-801) elicits a tetrodotoxin-sensitive increase in extracellular release of dopamine in rat medial frontal cortex. *Neurochemistry International* 26, 269–279.
- Krystal JH, D'Souza DC, Mathalon D, Perry E, Belger A, Hoffman R** (2003). NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology* 169, 215–233.
- Lejeune F, Gobert A, Rivet J-M, Millan MJ** (1994). Blockade of transmission at NMDA receptors facilitates the electrical and synthetic activity of ascending serotonergic neurones. *Brain Research* 656, 427–431.
- Lindfors N, Barati S, O'Connor WT** (1997). Differential effects of single and repeated ketamine administration on dopamine, serotonin and GABA transmission in rat medial prefrontal cortex. *Brain Research* 759, 205–212.
- Lorrain DS, Baccei CS, Bristow LJ, Anderson JJ, Varney MA** (2003). Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience* 117, 697–706.
- Löscher W, Annie R, Hönack D** (1993). Comparison of competitive and uncompetitive NMDA receptor antagonists with regard to monoaminergic neuronal activity and behavioural effects in rats. *European Journal of Pharmacology* 242, 263–274.
- Lucas G, Compan V, Charnay Y, Neve RL, Nestler EJ, Bockaert J, Barrot M, Debonnel G** (2005). Frontocortical 5-HT<sub>4</sub> receptors exert positive feedback on serotonergic activity: viral transfections, subacute and chronic treatments with 5-HT<sub>4</sub> agonists. *Biological Psychiatry* 57, 918–925.
- Maione S, Rossi F, Biggs CS, Fowler LJ, Whitton PS** (1997). AMPA receptors modulate extracellular 5-hydroxytryptamine concentration and metabolism in rat striatum *in vivo*. *Neurochemistry International* 30, 299–304.
- Martin P, Carlsson ML, Hjorth S** (1998a). Systemic PCP treatment elevates brain extracellular 5-HT: a microdialysis study in awake rats. *Neuroreport* 9, 2985–2988.
- Martin P, Waters N, Schmidt CJ, Carlsson A, Carlsson ML** (1998b). Rodent data and general hypothesis: antipsychotic action exerted through 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonism is dependent on increases serotonergic tone. *Journal of Neural Transmission* 105, 365–396.
- Martín-Ruiz R, Puig MV, Celada P, Shapiro D, Roth BL, Mengod G, Artigas F** (2001). Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. *Journal of Neuroscience* 21, 9856–9866.
- Mathé JM, Nomikos GG, Blakeman KH, Svensson TH** (1999). Differential actions of dizocilpine (MK-801) on the mesolimbic and mesocortical dopamine systems: role of neuronal activity. *Neuropharmacology* 38, 121–128.
- Meltzer HY** (1989). Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia. *Psychopharmacology* 99, S18–S27.

- Millan MJ, Brocco M, Gobert A, Joly F, Bervoets K, Rivet J-M, Newman-Tancredi A, Audinot V, Maurel S** (1999). Contrasting mechanisms of action and sensitivity to antipsychotics of phencyclidine versus amphetamine: importance of nucleus accumbens 5-HT<sub>2A</sub> sites for PCP-induced locomotion in the rat. *European Journal of Neuroscience* 11, 4419–4432.
- Millan MJ, Gobert A, Newman-Tancredi A, Audinot V, Lejeune F, Rivet J-M, Cussac D, Nicolas J-P, Muller O, Lavielle G** (1998). S 16924 ((R)-2-[1-[2-(2,3-dihydrobenzo[1,4] dioxin-5-yloxi)-ethyl]-pyrrolidin-3yl]-1-(4-fluoro-phenyl)-ethanone), a novel, potential antipsychotic with marked serotonin (5-HT)<sub>1A</sub> agonist properties: I. Receptorial and neurochemical profile in comparison with clozapine and haloperidol. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 286, 1341–1355.
- 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  $\epsilon 1$  subunit. *Journal of Neuroscience* 21, 750–757.
- Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D** (1997). Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience* 17, 2921–2927.
- Patel S, Fernandez-Garcia E, Hutson PH, Patel S** (2001). An in vivo binding assay to determine central  $\alpha_1$ -adrenoceptor occupancy using [<sup>3</sup>H]prazosin. *Brain Research Protocols* 8, 191–198.
- Pawlowski L, Mathé JM, Svensson TH** (1990). Phencyclidine activates rat A10 dopamine neurons but reduces burst activity and causes regularization of firing. *Acta Physiologica Scandinavica* 139, 529–530.
- Paxinos G, Watson C** (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G** (1994). Distribution of the serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor family mRNAs: comparison between 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Molecular Brain Research* 23, 163–178.
- Puig MV, Celada P, Díaz-Mataix L, Artigas F** (2003). In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT<sub>2A</sub> receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cerebral Cortex* 13, 870–882.
- Schenk U, Matteoli M** (2004). Presynaptic AMPA receptors: more than just ion channels? *Biology of the Cell* 96, 257–260.
- Schmidt CJ, Fadaye GM** (1996). Regional effects of MK-801 on dopamine release: effects of competitive NMDA or 5-HT<sub>2A</sub> receptor blockade. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 277, 1541–1549.
- Sprouse JS, Reynolds LS, Braselton JP, Rollema H, Zorn SH** (1999). Comparison of the novel antipsychotic ziprasidone with clozapine and olanzapine: inhibition of dorsal raphe cell firing and the role of 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation. *Neuropsychopharmacology* 21, 622–631.
- Suzuki Y, Jodo E, Takeuchi S, Niwa S, Kayama Y** (2002). Acute administration of phencyclidine induces tonic activation of medial prefrontal cortex neurons in freely moving rats. *Neuroscience* 114, 769–779.
- Tao R, Auerbach SB** (2000). Regulation of serotonin release by GABA and excitatory amino acids. *Journal of Psychopharmacology* 14, 100–113.
- Wang R, Liang X** (1998). M100907 and clozapine, but not haloperidol or raclopride, prevent phencyclidine-induced blockade of NMDA responses in pyramidal neurons of the rat medial prefrontal cortical slice. *Neuropsychopharmacology* 19, 74–85.



Trabajo 2:

**Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801 increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat.**

López-Gil X., Babot Z., Amargós-Bosch M., Suñol C., Artigas F. and Adell A.

*Neuropsychopharmacology, 32, 2087-2097*

Nuestro objetivo es caracterizar los efectos de la administración del antagonista NMDA MK-801 sobre la neurotransmisión cortical de serotonina y glutamato. Para ello se administró MK-801 de forma sistémica mientras perfundimos a través de la sonda de microdiálisis TTX y NBQX, un antagonista AMPA/kainato. El incremento que el MK-801 provoca en la concentración extracelular de serotonina y glutamato en la corteza es dependiente de impulso nervioso y está mediado por una activación sobre los receptores AMPA/kainato como muestra su bloqueo por TTX y NBQX, respectivamente. Estas alteraciones pueden ser bloqueadas de forma diferencial por los antipsicóticos: mientras que el haloperidol solo fue capaz de evitar el aumento de glutamato, la clozapina pudo bloquear tanto el aumento de glutamato como de serotonina. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la mayor eficacia de la clozapina para mejorar los síntomas negativos/cognitivos, que estarían más relacionados con alteraciones de la transmisión serotoninérgica cortical, mientras que los síntomas positivos, tratados tanto por antipsicóticos clásicos como atípicos, estarían relacionados con los síntomas positivos. El hecho de que la perfusión local en corteza prefrontal de los antipsicóticos muestre el mismo resultado que su administración sistémica muestra que esta región del cerebro juega un papel clave para la realización de sus efectos.





# Clozapine and Haloperidol Differently Suppress the MK-801-Increased Glutamatergic and Serotonergic Transmission in the Medial Prefrontal Cortex of the Rat

Xavier López-Gil<sup>1</sup>, Zoila Babot<sup>1</sup>, Mercè Amargós-Bosch<sup>1</sup>, Cristina Suñol<sup>1</sup>, Francesc Artigas<sup>1</sup> and Albert Adell<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC (IDIBAPS), Barcelona, Spain

The administration of noncompetitive *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists such as phencyclidine and ketamine has been shown to increase the extracellular concentration of glutamate and serotonin (5-HT) in the medial prefrontal cortex (mPFC). In the present work, we used *in vivo* microdialysis to examine the effects of the more potent noncompetitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on the efflux of glutamate and 5-HT in the mPFC, and whether the MK-801-induced changes in the cortical efflux of both transmitters could be blocked by clozapine and haloperidol given systemically or intra-mPFC. The systemic, but not the local administration of MK-801, induced an increased efflux of 5-HT and glutamate, which suggests that the NMDA receptors responsible for these effects are located outside the mPFC, possibly in GABAergic neurons that tonically inhibit glutamatergic inputs to the mPFC. The MK-801-induced increases of extracellular glutamate and 5-HT were dependent on nerve impulse and the activation of mPFC AMPA/kainate receptors as they were blocked by tetrodotoxin and NBQX, respectively. Clozapine and haloperidol blocked the MK-801-induced increase in glutamate, whereas only clozapine was able to block the increased efflux of 5-HT. The local effects of clozapine and haloperidol paralleled those observed after systemic administration, which emphasizes the relevance of the mPFC as a site of action of these antipsychotic drugs in offsetting the neurochemical effects of MK-801. The ability of clozapine to block excessive cortical 5-HT efflux elicited by MK-801 might be related to the superior efficacy of this drug in treating negative/cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* (2007) 32, 2087–2097; doi:10.1038/sj.npp.1301356; published online 14 March 2007

**Keywords:** schizophrenia; clozapine; haloperidol; MK-801; serotonin; glutamate

## INTRODUCTION

The acute administration of noncompetitive *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists such as phencyclidine (PCP) and ketamine has been considered as a pharmacological model of schizophrenia because these drugs can evoke positive and negative symptoms as well as characteristic cognitive deficits that closely resemble those of the illness (Javitt and Zukin, 1991; Krystal *et al.*, 1994; Malhotra *et al.*, 1994; Newcomer *et al.*, 1999). For this reason, schizophrenia has been associated with NMDA receptor hypofunction (Javitt and Zukin, 1991; Tamminga, 1998). In rats, PCP and the more potent and selective noncompetitive NMDA antagonist, dizocilpine (MK-801), bring about hyperlocomotion and stereotypies (Hertel *et al.*,

1996; Adams and Moghaddam, 2001; Homayoun *et al.*, 2004). These behaviors are thought to result from increased dopaminergic and serotonergic activities (Giros *et al.*, 1996; Jentsch *et al.*, 1998; Lucki, 1998), and have been potentially related to positive symptoms of schizophrenia (Moghaddam and Adams, 1998; Jentsch and Roth, 1999; Mohn *et al.*, 1999). Furthermore, the behavioral deficits observed in humans and rodents are distinctly responsive to clozapine (Bakshi *et al.*, 1994; Maurel-Remy *et al.*, 1995; Malhotra *et al.*, 1997). Acute NMDA receptor antagonism has also been reported to increase the release of glutamate (Moghaddam *et al.*, 1997; Adams and Moghaddam, 2001; Lorrain *et al.*, 2003), dopamine (Moghaddam and Adams, 1998; Mathé *et al.*, 1999; Schmidt and Fadayel, 1996), and serotonin (5-HT) (Martin *et al.*, 1998; Millan *et al.*, 1999; Adams and Moghaddam, 2001; Amargós-Bosch *et al.*, 2006) in the medial prefrontal cortex (mPFC) of rats. These effects are coincident with an enhanced spontaneous firing rate of putative pyramidal neurons of the mPFC (Suzuki *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 2004). The increase in cortical glutamatergic transmission elicited through the blockade of an excitatory glutamate receptor (NMDA) may seem contradictory.

\*Correspondence: Dr A Adell, Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC (IDIBAPS), Calle Rosellón 161, 6th floor, Room 630, E-08036 Barcelona, Spain, Tel: +34 93 3638321, Fax: +34 93 3638301, E-mail: aacnq@iibb.csic.es

Received 8 March 2006; revised 14 December 2006; accepted 1 January 2007

However, it has been postulated that noncompetitive NMDA receptor antagonists may actually inhibit GABAergic inputs to glutamatergic neurons in the mPFC (Olney and Farber, 1995; Moghaddam *et al*, 1997; Krystal *et al*, 2003). In fact, GABAergic interneurons in limbic cortex and hippocampus are extremely responsive to NMDA receptor antagonists in comparison with pyramidal neurons (Grunze *et al*, 1996; Li *et al*, 2002), and PCP is able to reduce cortical GABAergic function (Yonezawa *et al*, 1998). It remains to be determined whether this feature can be applied to other GABAergic cells throughout the brain. Thus, theoretically, this glutamatergic disinhibition could occur in the mPFC and/or in areas sending glutamatergic projections to the mPFC. However, the intra-mPFC administration of PCP or ketamine was unable to elevate cell firing and locomotion (Suzuki *et al*, 2002) or increase extracellular 5-HT (Amargós-Bosch *et al*, 2006). Therefore, it appears that the NMDA receptors responsible for these effects are located outside the mPFC, possibly in GABA neurons that would tonically inhibit glutamatergic efferents in areas that project densely to mPFC, such as hippocampus, thalamus, or amygdala.

In a previous work, we showed that acute PCP and ketamine enhanced extracellular 5-HT in the mPFC, and that this effect was blocked by systemic clozapine and olanzapine, but not by haloperidol (Amargós-Bosch *et al*, 2006). In the present study, we have tested the hypothesis that MK-801 would also increase serotonergic and glutamatergic transmission in the mPFC and examined the effects of clozapine and haloperidol, applied both systemically and intra-mPFC, on these neurochemical changes.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Male Wistar rats (Iffa-Credo, Lyon, France) weighing 250–280 g were used. They were maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on at 0700) and housed three per cage before surgery and individually after surgery. Food and water were always freely available. All experimental procedures were carried out in strict accordance with European Communities Council Directive on 'Protection of Animals Used in Experimental and Other Scientific Purposes' of 24 November 1986 (89/609/EEC), and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees. To reduce the influence of between-day variations on drug effects, most experimental groups were not completed at once, but along the duration of the whole work instead.

### Drugs and Reagents

Dizocilpine maleate (MK-801), 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline (NBQX), 5-hydroxytryptamine oxalate, *o*-phthalaldehyde (OPA) reagent (containing 1 mg OPA per ml solution with 2-mercaptoethanol as the sulphhydryl moiety), and glutamate were purchased from Sigma-Aldrich (Tres Cantos, Spain). Clozapine and tetrodotoxin (TTX) were from Tocris (Bristol, UK). Haloperidol was obtained as an injectable solution (5 mg/ml dissolved in 0.5% lactic acid) from Laboratorios Esteve (Barcelona,

Spain). Citalopram hydrobromide was generously donated by H Lundbeck A/S (Copenhagen-Valby, Denmark).

MK-801 was dissolved in saline for intraperitoneal (i.p.) administration or in artificial cerebrospinal fluid (see below for composition) for local application through dialysis probes. Clozapine was dissolved in a few drops of glacial acetic acid and further diluted with saline for subcutaneous (s.c.) administration, or artificial cerebrospinal fluid for local application. For s.c. administration, haloperidol (5 mg/ml) was brought to 1 mg/ml by diluting five times the injectable solution with saline. When needed, the pH of the final concentrations was adjusted to 6.5–7.0 with NaHCO<sub>3</sub>. Appropriate vehicles were administered in control groups.

### Microdialysis Procedures

Concentric dialysis probes with a 4-mm long membrane were implanted under sodium pentobarbital anesthesia (60 mg/kg, i.p.) in the mPFC (AP +3.2 mm, L –0.8 mm, DV –6.0 mm; from bregma), according to Paxinos and Watson (1986). Microdialysis experiments were conducted 20–24 h after surgery in freely moving rats by continuously perfusing probes with artificial cerebrospinal fluid containing 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.18 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1 μM citalopram. The addition of an uptake inhibitor to the perfusion fluid is used in some microdialysis studies to decrease clearance from the extracellular space and magnify the release component of extracellular 5-HT (Adell *et al*, 2002). On the other hand, low concentrations of 5-HT uptake blockers, such as that used in the present study, are without effect on dialysate glutamate *in vivo* (Langman *et al*, 2006; Queiroz and Artigas, unpublished results). Interestingly, voltammetric studies have shown that MK-801 may interact with the serotonin transporter (Irvani *et al*, 1999; Callado *et al*, 2000), thereby underscoring the importance of including citalopram in the perfusion fluid.

The artificial cerebrospinal fluid was perfused at a rate of 1.5 μl/min with a WPI model sp220i syringe pump (WPI, Aston, Stevenage, UK) attached to an overhead liquid swivel (Instech, Plymouth Meeting, PA). Dialysate samples of 30 μl were collected every 20 min and divided into two fractions for the determination of 5-HT (20 μl) and glutamate (10 μl). The *in vitro* dialysis probe recoveries for 5-HT and glutamate were 15 and 17%, respectively. Owing to the incidental occurrence of chromatographic problems, for some rats data on only one transmitter (glutamate or 5-HT) were available. After a 100 min stabilization period, four dialysate samples were collected to obtain basal transmitter values (expressed as concentration of transmitter in a 30 μl sample) before any pharmacological treatment. At the completion of dialysis experiments, rats were given an overdose of sodium pentobarbital and a fast green solution was perfused through the dialysis probes to stain the surrounding tissue for subsequent histological examination.

### Biochemical Determinations

The concentration of 5-HT in dialysate samples was determined by an HPLC system consisting of a Waters 717plus autosampler (Waters Cromatografía, Cerdanyola, Spain), a Hewlett-Packard series 1050 pump (Agilent

Technologies, Las Rozas, Spain), a 3- $\mu$ M octadecylsilica (ODS) column (7.5 cm  $\times$  0.46 cm; Beckman, San Ramon, CA), and an amperometric detector Hewlett-Packard 1049 (Agilent Technologies) set at an oxidation potential of 0.6 V. The mobile phase consisted of 0.15 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8 mM octyl sodium sulfate, 0.2 mM EDTA (pH 2.8, adjusted with phosphoric acid), and 30% methanol and was pumped at 0.7 ml/min (Adell and Artigas, 1998). For the determination of glutamate, another HPLC system was used, which consisted of a Waters 717plus autosampler, a Waters 600 quaternary gradient pump, and a Nucleosil 5- $\mu$ M ODS column (10 cm  $\times$  0.4 cm; Teknokroma, Spain). Dialysate samples were precolumn derivatized with OPA reagent and all this process was carried out by the autosampler. Briefly, 90  $\mu$ l distilled water was added to the 10  $\mu$ l dialysate sample and this was followed by the addition of 15  $\mu$ l of the OPA reagent. After 2.5 min reaction, 80  $\mu$ l of this mixture was injected into the column. Detection was carried out with a Waters 470 Scanning Fluorescence Detector using excitation and emission wavelengths of 360 and 450 nm, respectively. The mobile phase consisted of 0.1 M sodium acetate, 5.5 mM triethylamine (pH 5.5) containing 10–70% acetonitrile and was pumped at 0.8 ml/min (Babot *et al*, 2005). The detection limits for 5-HT and glutamate were 4 fmol and 0.3 pmol, respectively (signal-to-noise ratio 3).

### Statistics

Data (mean  $\pm$  SEM) are expressed as fmol/30  $\mu$ l for 5-HT and pmol/30  $\mu$ l for glutamate, and shown in figures as percentages of basal values, averaged from four fractions collected before treatment. Unless otherwise stated, the changes in dialysate 5-HT and glutamate were analyzed by two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) with time and treatment as factors. When significant effects were found, *post hoc* Newman-Keuls multiple comparison tests were used to compare effects of different treatment groups. In some cases areas under the curve (AUC) of selected time intervals were calculated and compared using ANOVA followed by *post hoc* Newman-Keuls tests, where appropriated. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

The basal (predrug) concentrations of 5-HT and glutamate in dialysate samples of the mPFC, not corrected for *in vitro* recovery, were  $50.3 \pm 1.8$  fmol/30  $\mu$ l ( $n = 155$ ) and  $7.2 \pm 0.6$  pmol/30  $\mu$ l ( $n = 164$ ), respectively.

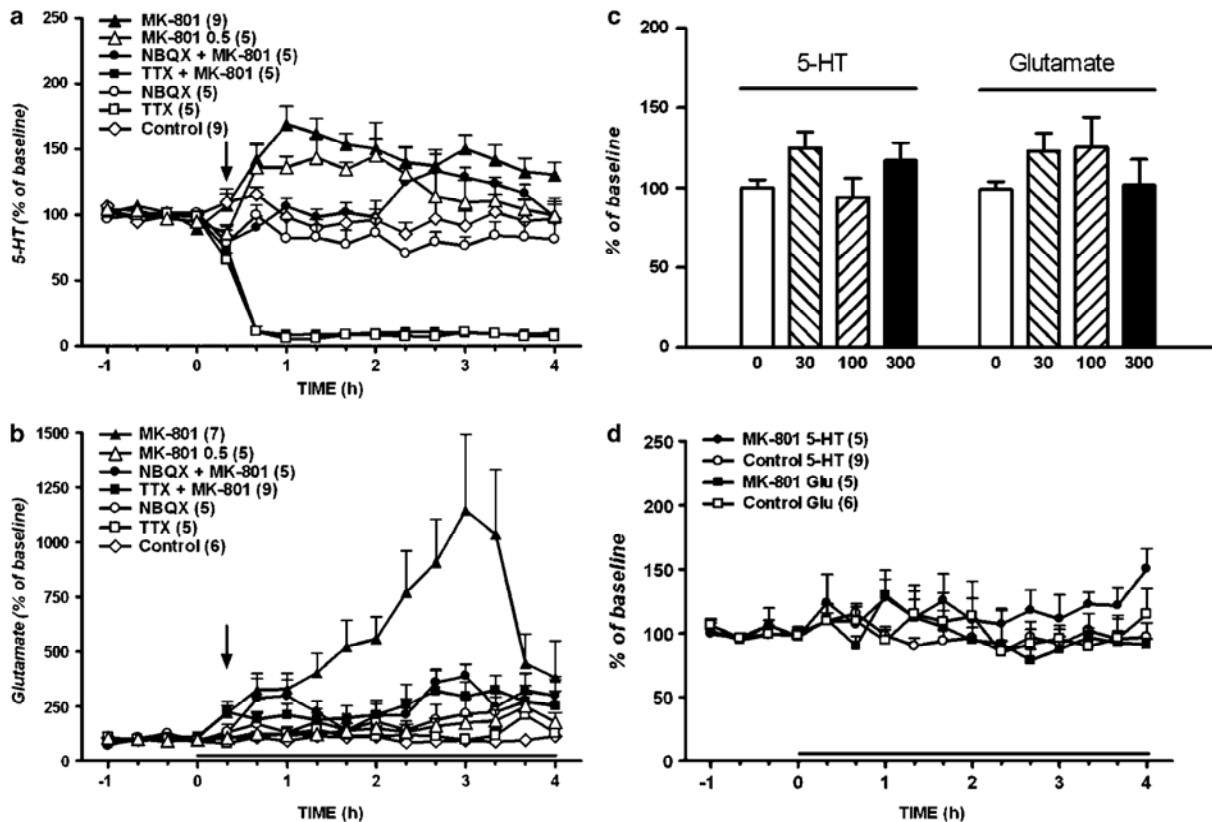
### Effects of MK-801

As described previously in the literature (Homayoun *et al*, 2004; Jackson *et al*, 2004) the systemic administration of MK-801 to rats evoked marked hyperlocomotion and stereotypies (behavioral observation). Two-way ANOVA showed that with respect to saline-injected group, the administration of MK-801 (0.5–1 mg/kg, i.p.) enhanced dose dependently the extracellular concentration of 5-HT (Figure 1a) as demonstrated by the significant effect of treatment ( $F_{2,20} = 12.5$ ,  $p < 0.0005$ ), time ( $F_{15,300} = 5.9$ ,  $p < 0.00001$ ), and treatment  $\times$  time interaction ( $F_{30,300} = 3.3$ ,  $p < 0.00001$ ). *Post hoc* comparisons showed that the

increase elicited by 1 mg/kg MK-801 was higher than that of 0.5 mg/kg ( $p < 0.05$ ; Newman-Keuls test). The systemic administration of MK-801 also increased extracellular glutamate (Figure 1b), as shown by the significant effect of treatment ( $F_{2,15} = 15.0$ ,  $p < 0.0003$ ), time ( $F_{15,225} = 5.0$ ,  $p < 0.00001$ ), and treatment  $\times$  time interaction ( $F_{30,225} = 4.6$ ,  $p < 0.00001$ ). However, only the dose of 1.0 mg/kg MK-801 significantly increased dialysate glutamate ( $p < 0.001$ ; Newman-Keuls test). For this reason, this latter dose was used for subsequent experiments. As described before for PCP (Adams and Moghadam, 2001), glutamate increased more slowly than 5-HT after MK-801 administration. On the contrary, the intra-mPFC perfusion of MK-801 at 30, 100, and 300  $\mu$ M for 80 min was without effect on dialysate 5-HT and glutamate (Figure 1c). To exclude any possible delayed effect of intracortical MK-801, a further experiment was carried out in which a concentration of 300  $\mu$ M of the compound was perfused through the dialysis probe for 4 h. This long perfusion of MK-801 did not alter the concentrations of 5-HT and glutamate in the mPFC (Figure 1d). The local application of the AMPA/kainate antagonist, NBQX (300  $\mu$ M), suppressed the MK-801-induced increase in 5-HT ( $F_{1,12} = 9.2$ ,  $p < 0.02$ ; Figure 1a) and glutamate ( $F_{1,10} = 6.7$ ,  $p < 0.03$ ; Figure 1b). When given alone, NBQX did not change 5-HT and glutamate levels in comparison to the corresponding control group. TTX (1  $\mu$ M) also suppressed MK-801-induced increase in 5-HT ( $F_{1,12} = 136.2$ ,  $p < 0.00001$ ; Figure 1a) and glutamate ( $F_{1,14} = 10.0$ ,  $p < 0.01$ ; Figure 1b) although with different efficacy. Thus, whereas TTX completely abolished the increase in 5-HT elicited by 1 mg/kg MK-801, it reduced glutamate levels to 40% of those induced by MK-801, as calculated using AUC from time = 0 to time = 4 h ( $t = 3.1$ ,  $p < 0.01$ ; Student's *t*-test, two-tailed). When perfused alone, TTX also abolished basal dialysate 5-HT ( $F_{1,10} = 95.5$ ,  $p < 0.00001$ ; Figure 1a), whereas it was without effect on basal dialysate glutamate (Figure 1b).

### Effects of Systemic Administration of Antipsychotic Drugs

The administration of haloperidol (1 mg/kg, s.c.) failed to block the increase in 5-HT elicited by MK-801 (Figure 2a), but effectively blocked that of glutamate (Figure 2b) as demonstrated by the significant effect of treatment ( $F_{3,20} = 12.5$ ,  $p < 0.0001$ ), time ( $F_{15,300} = 4.7$ ,  $p < 0.00001$ ), and treatment  $\times$  time interaction ( $F_{45,300} = 3.7$ ,  $p < 0.00001$ ). On the other hand, clozapine (1–5 mg/kg, s.c.) reduced MK-801-induced increase in dialysate 5-HT in a dose-dependent manner (Figure 3a), as demonstrated by the significant effect of treatment ( $F_{3,24} = 7.3$ ,  $p < 0.002$ ), time ( $F_{15,360} = 7.3$ ,  $p < 0.00001$ ), and the interaction between both factors ( $F_{45,360} = 4.2$ ,  $p < 0.00001$ ). Clozapine (1–5 mg/kg, s.c.) also decreased MK-801-induced increase in dialysate glutamate in a dose-dependent manner (Figure 3b), as demonstrated by the significant effect of treatment ( $F_{3,19} = 9.4$ ,  $p < 0.001$ ), time ( $F_{15,285} = 8.0$ ,  $p < 0.000001$ ), and treatment  $\times$  time interaction ( $F_{45,285} = 3.2$ ,  $p < 0.000001$ ). The effects of systemic clozapine were significant only at the dose of 5 mg/kg ( $p < 0.05$  for 5-HT and  $p < 0.005$  for glutamate; Newman-Keuls test), although the effect of the lowest dose almost reached significance for glutamate ( $p = 0.051$ ; Newman-Keuls test). When administered alone, haloperidol



**Figure 1** Effects of MK-801 (0.5 and 1 mg/kg, i.p.) and of the local perfusion of NBQX (300  $\mu$ M) and TTX (1  $\mu$ M) on the MK-801 (1 mg/kg, i.p.)-induced efflux of 5-HT (a) and glutamate (b) in the mPFC. Data (mean  $\pm$  SEM) are expressed as percentage changes of the four basal predrug values. Number of animals is given in parentheses. NBQX or TTX was perfused from time 0 to time 4 h (line). The effects of the local perfusion for 80 min of three different concentrations of MK-801 in the mPFC on dialysate 5-HT and glutamate are depicted in (c). Data in (c) are expressed as percentage of AUC calculated from four consecutive samples of 4 (5-HT) and 5 animals (glutamate). The effects of the local perfusion of 300  $\mu$ M MK-801 for 4 h in the mPFC on dialysate 5-HT and glutamate (Glu) are depicted in (d).

(1 mg/kg, s.c.; Figure 2) and clozapine (1–5 mg/kg, s.c.; Figure 3) failed to alter dialysate 5-HT or glutamate.

**Effects of Local Application of Antipsychotic Drugs in the mPFC**

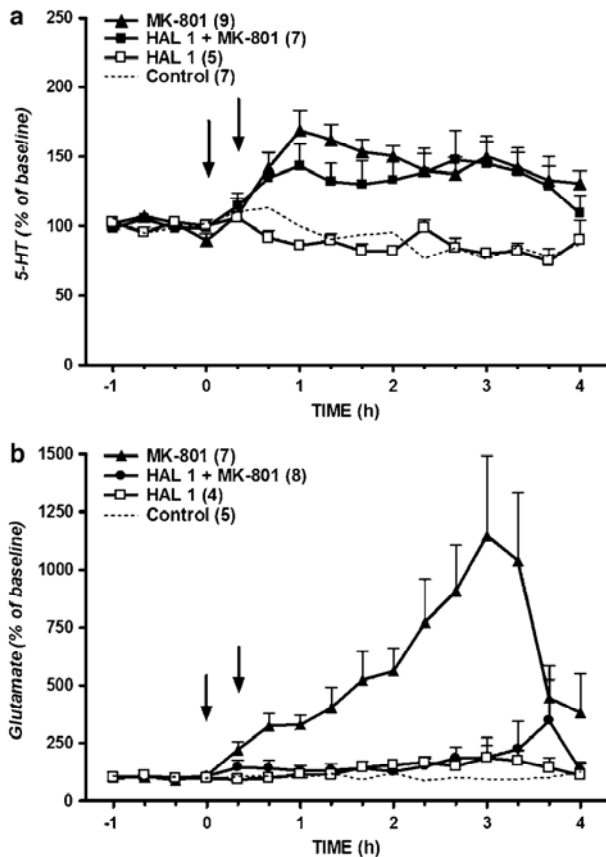
The intra-mPFC perfusion of haloperidol (3, 30  $\mu$ M) failed to modify the MK-801-induced increase in dialysate 5-HT (Figure 4a). However, the same concentrations of haloperidol suppressed the MK-801-induced increase in glutamate in a concentration-dependent manner (Figure 4b), as demonstrated by the significant effect of treatment ( $F_{2,19} = 13.2$ ,  $p < 0.001$ ), time ( $F_{15,285} = 11.0$ ,  $p < 0.00001$ ), and the interaction between both factors ( $F_{30,285} = 5.5$ ,  $p < 0.00001$ ). *Post hoc* comparisons showed that only 30  $\mu$ M haloperidol significantly blocked the effects of MK-801 on glutamate ( $p < 0.001$ ; Newman–Keuls test). Intra-mPFC perfusion of clozapine (30, 100, and 300  $\mu$ M) reduced MK-801-evoked increase in dialysate 5-HT in a concentration-dependent manner (Figure 5a), as demonstrated by the significant effect of treatment ( $F_{4,33} = 7.0$ ,  $p < 0.0005$ ), time ( $F_{15,495} = 15.9$ ,  $p < 0.00001$ ), and treatment  $\times$  time interaction ( $F_{60,495} = 4.3$ ,  $p < 0.00001$ ). *Post hoc* comparisons showed that only 300  $\mu$ M clozapine produced a significant effect ( $p < 0.05$ ; Newman–Keuls test). In contrast, the three

concentrations of clozapine were equipotent in blocking the MK-801-induced increase in glutamate (Figure 5b), as demonstrated by the significant effect of treatment ( $F_{4,29} = 12.7$ ,  $p < 0.00001$ ), time ( $F_{15,435} = 7.0$ ,  $p < 0.000001$ ), and their interaction ( $F_{60,435} = 4.9$ ,  $p < 0.000001$ ).

When perfused alone, haloperidol (3 and 30  $\mu$ M) had no effect on dialysate 5-HT (Figure 6a) and glutamate (Figure 6b). Intra-mPFC perfusion of clozapine (30, 100, and 300  $\mu$ M) decreased dialysate 5-HT in a concentration-dependent manner (Figure 7a), as demonstrated by the significant effect of treatment ( $F_{3,21} = 3.7$ ,  $p < 0.03$ ), time ( $F_{15,315} = 2.3$ ,  $p < 0.005$ ), and the interaction between both factors ( $F_{45,315} = 1.6$ ,  $p < 0.02$ ). Clozapine had also a significant effect on dialysate glutamate (Figure 7b), as demonstrated by the significant effect of treatment ( $F_{3,20} = 3.3$ ,  $p < 0.05$ ), time ( $F_{15,300} = 2.3$ ,  $p < 0.005$ ), and the interaction of both factors ( $F_{45,300} = 1.7$ ,  $p < 0.01$ ). *Post hoc* comparisons showed that only 300  $\mu$ M clozapine increased significantly the concentration of glutamate ( $p < 0.05$ ; Newman–Keuls test).

**DISCUSSION**

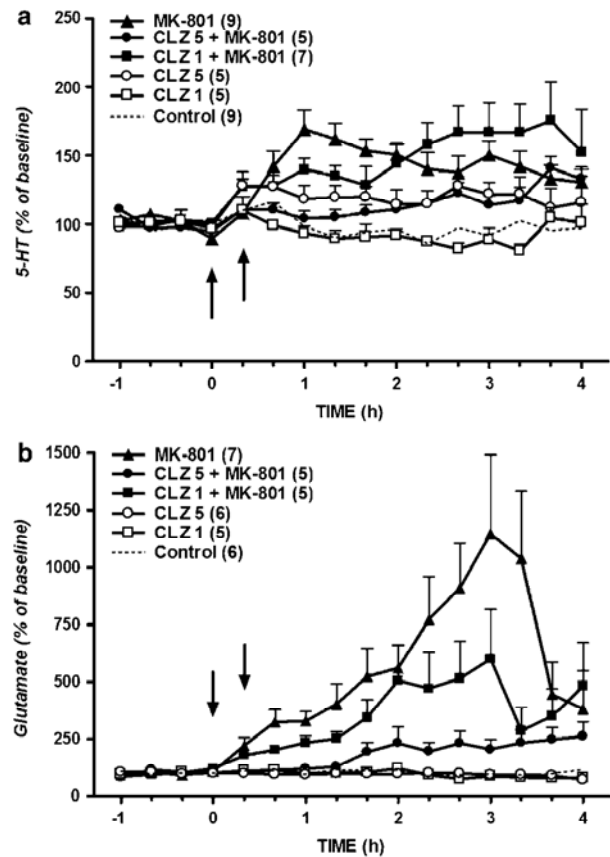
The first finding of the present study is that systemic administration of the NMDA receptor antagonist, MK-801,



**Figure 2** Effects of pretreatment (first arrow) with haloperidol (1 mg/kg, s.c.; HAL 1) on the efflux of 5-HT (a) and glutamate (b) in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg, i.p.; second arrow). Data (mean  $\pm$  SEM) are expressed as percentage changes of the four basal predrug values. Number of animals is given in parentheses. The control group received two injections (saline and vehicle) and, for the sake of clarity, is depicted as a dotted line.

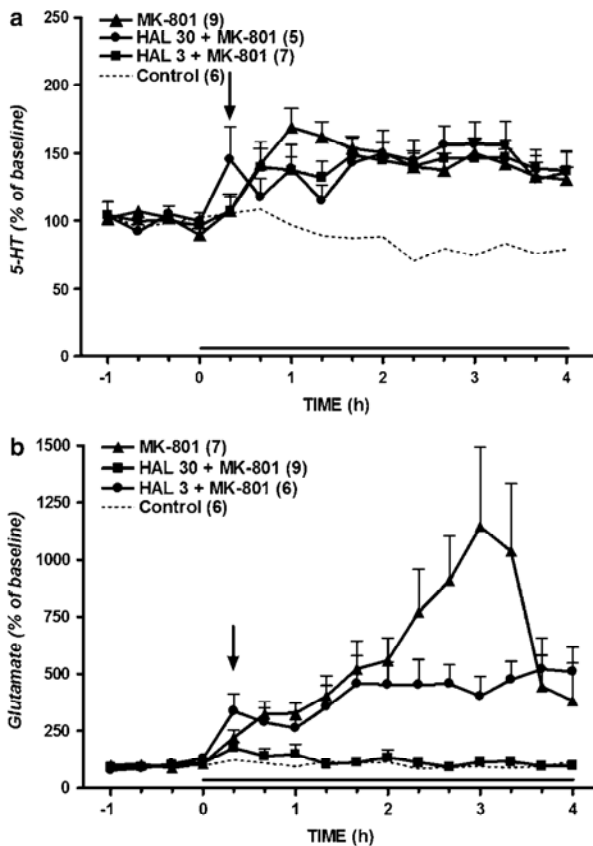
enhanced the extracellular concentration of 5-HT and glutamate in the mPFC. This was previously shown for PCP (Adams and Moghaddam, 2001). The kinetics of MK-801-induced changes in glutamate strongly paralleled those of induction of cortical c-fos mRNA, which also peaked at 3–4 h after the administration of MK-801 (Väisänen *et al*, 1999). This coincidence suggests that induction of c-fos mRNA synthesis would likely result from increased cortical glutamate efflux. These increases in 5-HT and glutamate are dependent on nerve impulse because they were inhibited by TTX, although to a different extent. Thus, basal and MK-801-induced elevation of 5-HT were both completely dependent on nerve impulse. However, basal dialysate glutamate in the mPFC was not blocked by TTX, in good agreement with prior work (Moghaddam, 1993; Timmerman *et al*, 1999), which pointed out that only a minor portion of basal extracellular glutamate is indeed exocytotically released (Timmerman and Westerink, 1997).

Nevertheless, the present study evidenced that MK-801-stimulated glutamate efflux is largely TTX dependent, that is released from neurons in an impulse-dependent manner. This is in line with previous work showing that the efflux of glutamate elicited by ketamine was also fully dependent on

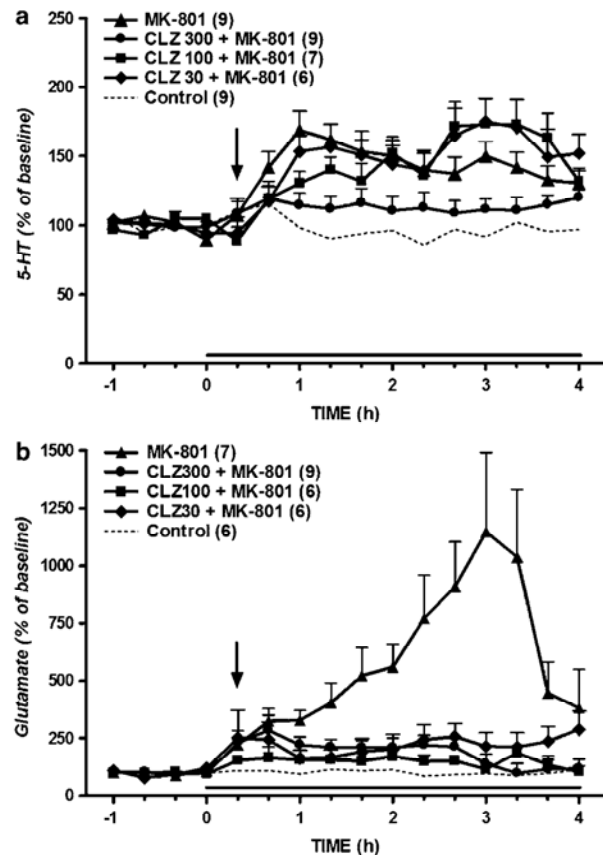


**Figure 3** Effects of pretreatment (first arrow) with clozapine (1 or 5 mg/kg, s.c.; CLZ 1 or CLZ 5) on the efflux of 5-HT (a) and glutamate (b) in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg, i.p.; second arrow). Data (mean  $\pm$  SEM) are expressed as percentage changes of the four basal predrug values. Number of animals is given in parentheses. The control group received two injections (saline and vehicle) and, for the sake of clarity, is depicted as a dotted line.

nerve impulse (Lorrain *et al*, 2003). It remains to be determined, however, the provenance of NMDA receptor antagonist-stimulated extracellular glutamate in the mPFC. The fact that local perfusion of PCP, ketamine, and MK-801 in the mPFC failed to elicit the increase in glutamate and/or 5-HT (Lorrain *et al*, 2003; Amargós-Bosch *et al*, 2006, this study) indicates that the NMDA receptors responsible for these effects are located outside the mPFC. Our results are consistent with other data showing that the increased locomotion and firing or EPSCs of putative pyramidal neurons of the mPFC following systemic administration of NMDA receptor antagonists (Suzuki *et al*, 2002; Jodo *et al*, 2003; Jackson *et al*, 2004) were not mimicked by intra-mPFC application of these compounds (Aghajanian and Marek, 2000; Suzuki *et al*, 2002; Jodo *et al*, 2005). What is the actual localization of these NMDA receptors and the source of the cortical hyperglutamatergic transmission induced by their blockade? Two of the well-known ascending glutamatergic inputs to the mPFC arise from the hippocampus (Carr and Sesack, 1996; Dégenétais *et al*, 2003) and the mediodorsal nucleus of the thalamus (Kuroda *et al*, 1998), and in both areas glutamatergic neurons are under the control of GABAergic cells (Gigg *et al*, 1994;



**Figure 4** Effects of the intra-mPFC perfusion (line) of haloperidol (3 and 30  $\mu$ M; HAL 3 and HAL 30, respectively) on the efflux of 5-HT (a) and glutamate (b) in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg, i.p.; arrow). Data (mean  $\pm$  SEM) are expressed as percentage changes of the four basal predrug values. Number of animals is given in parentheses. The control group received an injection of saline and, for the sake of clarity, is depicted as a dotted line.



**Figure 5** Effects of the intra-mPFC perfusion (line) of clozapine (30, 100, and 300  $\mu$ M; CLZ 30, CLZ 100, and CLZ 300, respectively) on the efflux of 5-HT (a) and glutamate (b) in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg, i.p.; arrow). Data (mean  $\pm$  SEM) are expressed as percentage changes of the four basal predrug values. Number of animals is given in parentheses. The control group received an injection of saline and, for the sake of clarity, is depicted as a dotted line.

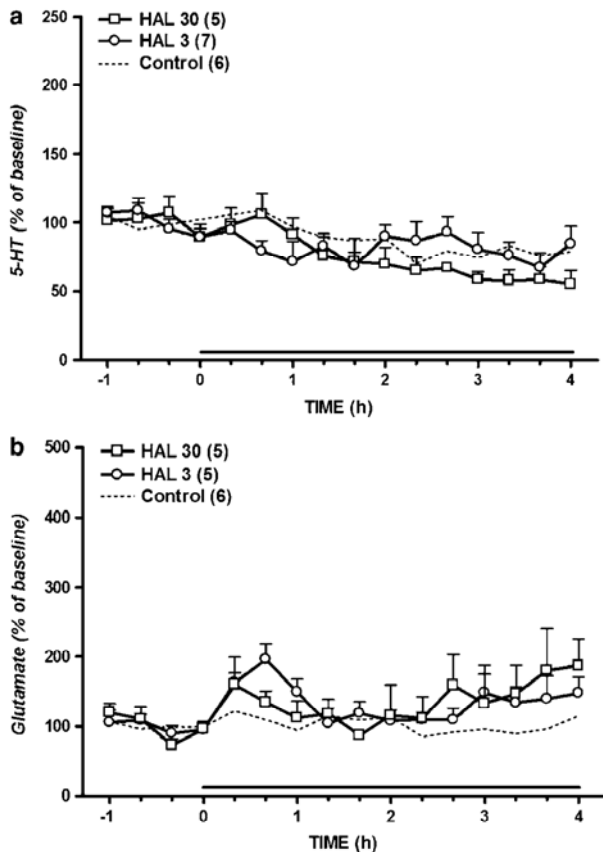
Krimer and Goldman-Rakic, 2001). In accordance with these findings, it has been shown that the local application of PCP into the hippocampus increases locomotion and the firing of pyramidal neurons of the mPFC in freely moving rats (Jodo *et al*, 2005). Furthermore, Sharp and coworkers have described that the blockade of NMDA receptors in the anterior thalamus by MK-801 resulted in injury of cortical pyramidal neurons measured by an increased synthesis of heat-shock protein 70 (HSP-70) in limbic cortex (Tomitaka *et al*, 2000; Sharp *et al*, 2001). Thus, all these findings suggest that NMDA receptor antagonists would attenuate the tonic activation of inhibitory (GABA) neurons (possibly, though not exclusively, in the hippocampus and/or the thalamus), which would result in a disinhibition of glutamatergic input to the mPFC (Olney and Farber, 1995; Moghaddam *et al*, 1997; Krystal *et al*, 2003). In fact, GABAergic neurons are very sensitive to NMDA antagonism (Grunze *et al*, 1996; Li *et al*, 2002), and PCP and MK-801 are able to reduce dialysate GABA in the mPFC (Yonezawa *et al*, 1998) and striatum (Hondo *et al*, 1995). Our results would suggest that the GABAergic control of glutamate efflux within the mPFC would not have a tonic nature.

On the other hand, the increased extracellular concentrations of 5-HT and glutamate elicited by MK-801 are mediated by a stimulation of cortical AMPA receptors because they were suppressed by intra-mPFC perfusion of NBQX. Consistent with our findings, it has been shown that blockade of AMPA/kainate receptors in the prefrontal cortex inhibited PCP-induced locomotion and stereotypy (Takahata and Moghaddam, 2003). Thus, in line with previous reports (Moghaddam *et al*, 1997; Adams and Moghaddam, 2001; Lorrain *et al*, 2003), MK-801 increases glutamate release onto AMPA/kainate receptors, which, in turn, elicit an enhanced glutamatergic output from mPFC neurons, including those projecting to the dorsal raphe nucleus, thereby increasing serotonergic cell firing and cortical 5-HT efflux. Although this functional interplay between the mPFC and the dorsal raphe nucleus is well documented (Hajós *et al*, 1998; Celada *et al*, 2001; Martín-Ruiz *et al*, 2001; Amargós-Bosch *et al*, 2003; Lucas *et al*, 2005), we presently cannot rule out the possibility of a direct effect of MK-801 on serotonergic neurons of the dorsal raphe nucleus (Callado *et al*, 2000; Tao and Auerbach, 2000) and its blockade downstream by NBQX acting on AMPA receptors putatively located in serotonergic terminals

## Effect of clozapine and haloperidol

X López-Gil *et al*

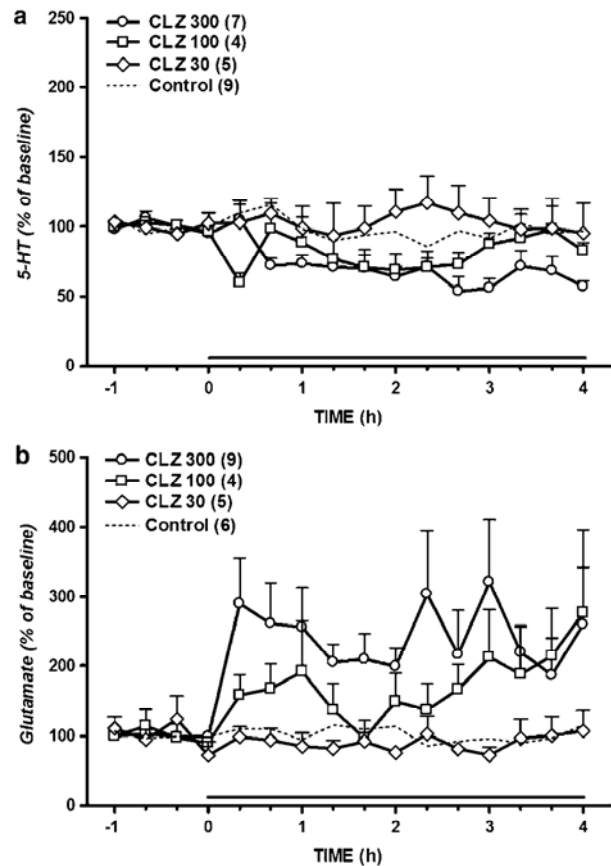
2093



**Figure 6** Effects of the local perfusion of haloperidol (3 and 30  $\mu\text{M}$ ; HAL 3 and HAL 30, respectively) on the efflux of 5-HT (a) and glutamate (b) in the mPFC. Data (mean  $\pm$  SEM) are expressed as percentage changes of the four basal predrug values. Number of animals is given in parentheses.

(Maione *et al*, 1997). With regard to glutamate, however, although presynaptic AMPA receptors have been described in striatal glutamatergic axon terminals (Patel *et al*, 2001; Fujiyama *et al*, 2004), they do not seem to be present in the cortical counterparts (Fujiyama *et al*, 2004). Interestingly, the effect of NBQX on MK-801-induced increase in 5-HT appeared to be biphasic. Thus, NBQX was able to completely prevent the effect of MK-801 on 5-HT in the first phase (0–2 h), but not in the second (2–4 h). Although further research is warranted to know the mechanisms underlying these effects, it is possible that the late increase in cortical serotonergic transmission may result from a direct stimulation of 5-HT cells within the dorsal raphe nucleus by MK-801 (Callado *et al*, 2000; Tao and Auerbach, 2000), or from the activation of a different brain circuitry not including the mPFC (for instance hippocampus  $\rightarrow$  amygdala  $\rightarrow$  raphe).

Taken together that the effects of MK-801 mostly depends on glutamatergic projections from regions outside the mPFC, and that AMPA/kainate receptors are located predominantly in pyramidal cells, it was expected that NBQX would have blocked the MK-801-induced increase in 5-HT, but not that of glutamate. Unexpectedly, however, NBQX was able to block both actions of MK-801. It is conceivable that MK-801 could have elicited an initial subtle



**Figure 7** Effects of the local perfusion of clozapine (30, 100, and 300  $\mu\text{M}$ ; CLZ 30, CLZ 100, and CLZ 300, respectively) on the efflux of 5-HT (a) and glutamate (b) in the mPFC. Data (mean  $\pm$  SEM) are expressed as percentage changes of the four basal predrug values. Number of animals is given in parentheses.

(not measurable in the present conditions) increase in glutamate from external sources. This glutamate could have been able to stimulate pyramidal cells immediately and the subsequent increase in glutamate measured would have resulted from a cascade of excitation within pyramidal cells, instead of directly from an external glutamatergic input. This proposal is consistent with our finding that a lower dose of MK-801 (0.5 mg/kg) was able to increase 5-HT without altering cortical glutamate. Therefore, the present results imply that the stimulation of cortical AMPA/kainate receptors can be achieved by subtle changes in glutamate level, which cannot be detected in the experimental conditions used because the stimulation of subcortical glutamatergic afferents immediately leads to the activation of pyramidal neurons. Overall, our results suggest that extracellular glutamate measured after MK-801 administration would partly arise from mPFC or at least depend on activation of mPFC output.

The second main finding of the present study is that clozapine and haloperidol differently blocked the MK-801-induced increase in 5-HT and glutamate. Thus, in line with our previous work with PCP and ketamine (Amargós-Bosch *et al*, 2006), the systemic administration of clozapine suppressed the increase of serotonin in the mPFC, whereas

haloperidol did not. The fact that a higher dose of clozapine (5 mg/kg) was needed to block the effects of MK-801 in comparison with those of PCP and ketamine (Amargós-Bosch *et al*, 2006) could be related to the higher potency of MK-801 in binding to the NMDA receptor channel. In contrast, systemic haloperidol completely abolished the MK-801-induced increase in glutamate. In a previous study, Adams and Moghadam (2001) showed that clozapine (10 mg/kg) and haloperidol (0.1 mg/kg) failed to block the increase in dialysate glutamate elicited by PCP. However, in this study clozapine was administered *i.p.*, which presumably result in a lower brain concentration of the drug, possibly insufficient to block the effect of PCP. On the other hand, it is possible that the blocking actions of clozapine on glutamate would be more prominent when the stimulated efflux is higher, which is the case of MK-801 (this study) compared to PCP (Adams and Moghadam, 2001). In fact, both clozapine and haloperidol are able to block the effect of MK-801 on extracellular glutamate. In line with this, Homayoun and Moghaddam (2007) have recently shown that clozapine and haloperidol share the ability to markedly inhibit a small subset of mPFC neurons. Furthermore, only around 5% of projection neurons in the V layer of the mPFC project to the dorsal raphe nucleus, according to Gabbott *et al.* (2005). Thus, it is conceivable that under the conditions of the present study (increased 5-HT and glutamate transmission in the mPFC) haloperidol may be able to inhibit a subpopulation of pyramidal cells (blockade of increased glutamate efflux), though sparing cortico-raphe projections. Alternatively, it could be also possible that cortico-raphe projecting cells might be inhibited by haloperidol, but not to the extent needed to suppress serotonergic firing distally in the dorsal raphe nucleus and subsequent cortical 5-HT release. Differences in the receptor population present in pyramidal cells and the distinct pharmacological profile of clozapine, acting on different transmitter receptors particularly abundant in layer V mPFC neurons, could provide the anatomical substrate for this differential effect. It thus appears that serotonergic transmission in the mPFC is regulated by the concurrent participation of multiple transmitter receptors, whereas glutamatergic transmission is strongly dependent on dopamine D2 receptor activation. Further evidence of the regulation of glutamate release in the mPFC by dopamine D2 receptors is provided by electrophysiological studies. Thus, the augmented efflux of dopamine elicited by the blockade of NMDA receptors (Moghaddam and Adams, 1998; Mathé *et al*, 1999; Schmidt and Fadaye, 1996) may promote dopamine D2-induced burst firing only in a small subset of pyramidal cells of the mPFC (Wang and Goldman-Rakic, 2004), possibly in those cells enriched in dopamine D2 receptors. In summary, it appears that dopamine D2 antagonism in the mPFC may be pathway specific, affecting only a reduced number of pyramidal cells (Wang and Goldman-Rakic, 2004). In line with our results, both clozapine and haloperidol inhibit MK-801-induced induction of cortical *c-fos* mRNA (Väisänen *et al*, 1999), which further suggests that this effect may result from blockade of glutamate efflux. When administered alone, neither clozapine nor haloperidol, given systemically, altered the concentrations of 5-HT and glutamate, which is consistent with previous results (Daly and Moghaddam,

1993; Yamamoto *et al*, 1994; Cartmell *et al*, 2001; Heidbreder *et al*, 2001). Although recent data from our lab showed that the dose of 1 mg/kg of both antipsychotics elicited a maximal reduction of dialysate 5-HT in the mPFC to ~70% of basal values (Amargós-Bosch *et al*, 2006), such weak effect was comparable to that reported herein (~80%). The ability of clozapine to attenuate MK-801-evoked change in cortical 5-HT may be related to its superior effects in negative/cognitive symptoms. Actually, clozapine but not haloperidol effectively blocks the hyperactivity, metabolic activation, neurotoxic cell damage, as well as the deficits in prepulse inhibition and social interaction induced by NMDA receptor antagonists (Corbett *et al*, 1995; Gleason and Shannon, 1997; Abi-Saab *et al*, 1998; Duncan *et al*, 1998; Olney *et al*, 1999; Geyer *et al*, 2001; Farber *et al*, 2006). Further research is needed to ascertain the transmitter receptors responsible for such differences between clozapine and haloperidol.

In good accordance with the effects of systemic administration, the intra-mPFC perfusion of clozapine was able to block the increases of both 5-HT and glutamate evoked by MK-801, whereas haloperidol was only effective in blocking the increased efflux of glutamate. To the best of our knowledge, this is the first report that shows the effects of antipsychotic drugs applied locally into the mPFC on the neurochemical changes elicited by the systemic administration of noncompetitive NMDA receptor antagonists. The intra-mPFC action of clozapine and haloperidol paralleled those of their systemic administration, which underscores the important role of the mPFC in the pharmacological effects of these antipsychotic drugs. This was not unexpected given that the prefrontal cortex is involved in goal-directed actions, such as working memory and cognitive tasks (Goldman-Rakic, 1995; Ellenbroek *et al*, 1996; Carli *et al*, 2006), and these functions are disrupted after NMDA receptor antagonism (Abi-Saab *et al*, 1998; Olney *et al*, 1999; Geyer *et al*, 2001; Jackson *et al*, 2004) and in schizophrenia (Weinberger and Gallhofer, 1997; Park *et al*, 1999). The mechanisms underlying these differential effects of clozapine and haloperidol remain unknown, but might be the basis of their differential effectiveness on negative/cognitive symptoms (Lieberman, 1996). The finding that clozapine produces opposite effects on glutamatergic transmission depending on the activity of mPFC neurons is not new. In fact, clozapine has been shown to increase the activity of neurons with low baseline firing rates and reduce that of neurons with higher firing rates (Homayoun and Moghaddam, 2007). It is, thus, possible that the local reduction of 5-HT in the mPFC may be mediated through the action of clozapine on a multiplicity of receptors, such as dopamine D1, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>,  $\alpha$ -adrenergic, histamine H1, and/or muscarinic M1 receptors (Bymaster *et al*, 1996; Arnt and Skarsfeldt, 1998). On the other hand, the clozapine-induced increase in glutamate efflux (albeit only at high concentration) has been postulated to result from its potentiation of NMDA transmission through an inhibition of glycine reuptake and/or a direct agonist action on the glycine recognition site of NMDA receptors (see Millan, 2005 for review). Alternatively, extracellular concentration of glutamate may also be secondary to inhibition of GABA efflux elicited by clozapine (Bourdelaís and Deutch, 1994). Altogether, these findings suggest that abnormally high



## Effect of clozapine and haloperidol

X López-Gil et al



2095

glutamate levels in the mPFC (caused by a primary NMDA receptor hypofunction) may be related, at least in part, with some of the psychotic/positive symptoms of schizophrenia that are generally alleviated by all antipsychotics, probably through a blockade of dopamine D2 receptors (Coyle and Tsai, 2004). In contrast, a disruption of 5-HT in the mPFC could rather be associated to negative symptoms and/or cognitive impairment, conditions for which clozapine depicts a superior efficacy. Although further research is needed to verify this hypothesis, it is interesting to note that some of the atypical antipsychotic drugs (characterized by their antiserotonergic properties together with a relatively weaker dopamine D2 antagonism) have been reported to display a better outcome in the control of negative symptoms compared with typical antipsychotics (Meltzer, 1999).

In summary, the results of the present study indicate that MK-801 (and possibly other noncompetitive NMDA receptor antagonists) increases the efflux of glutamate and 5-HT in the mPFC through the blockade of NMDA receptors located outside the mPFC (or at least, outside the area sampled by dialysis probes), and the activation of AMPA receptors present in the mPFC. The local effects of clozapine and haloperidol paralleled those observed after systemic administration, which emphasizes the relevance of the mPFC as a site of action of these antipsychotic drugs in offsetting the neurochemical effects of MK-801. Both clozapine and haloperidol blocked the effects of MK-801 on cortical glutamate, but only clozapine showed a unique ability in suppressing an excessive serotonergic activity in the mPFC. Although this latter action is shared by olanzapine (Amargós-Bosch *et al*, 2006), further research is needed to determine whether this is a distinct feature of atypicality of antipsychotic drugs.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science Grants SAF 2004-05525 and SAF 2003-04930 and by the Generalitat de Catalunya (SGR2005/00758 and SGR2005/00826). XL-G, ZB, and MA-B were recipients of predoctoral fellowships from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Spanish Ministry of Education and Science, and Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), respectively. We gratefully acknowledge the skillful technical assistance of Leticia Campa and Judith Ballart.

## DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no competing financial interests.

## REFERENCES

Abi-Saab W, D'Souza DC, Moghaddam B, Krystal JH (1998). The NMDA antagonist model for schizophrenia: promises and pitfalls. *Pharmacopsychiatry* 31: 104–109.  
Adams BW, Moghaddam B (2001). Effect of clozapine, haloperidol, or M100907 on phencyclidine-activated glutamate efflux in the prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 50: 750–757.

Adell A, Artigas F (1998). A microdialysis study of the *in vivo* release of 5-HT in the median raphe nucleus of the rat. *Br J Pharmacol* 125: 1361–1367.  
Adell A, Celada P, Abellán MT, Artigas F (2002). Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res Rev* 39: 154–180.  
Aghajanian GK, Marek GJ (2000). Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res Rev* 31: 302–312.  
Amargós-Bosch M, Adell A, Bortolozzi A, Artigas F (2003). Stimulation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors in the rat medial prefrontal cortex increases the local *in vivo* 5-hydroxytryptamine release: reversal by antipsychotic drugs. *J Neurochem* 87: 831–842.  
Amargós-Bosch M, López-Gil X, Artigas F, Adell A (2006). Clozapine and olanzapine, but not haloperidol, suppress serotonin efflux in the medial prefrontal cortex elicited by phencyclidine and ketamine. *Int J Neuropsychopharmacol* 9: 565–573.  
Arnt J, Skarsfeldt T (1998). Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. *Neuropsychopharmacology* 18: 63–101.  
Babot Z, Cristófol R, Suñol C (2005). Excitotoxic death induced by released glutamate in depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABA<sub>A</sub> receptors and niflumic acid-sensitive chloride channels. *Eur J Neurosci* 21: 103–112.  
Bakshi VP, Swerdlow NR, Geyer MA (1994). Clozapine antagonizes phencyclidine-induced deficits in sensorimotor gating of the startle response. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 787–794.  
Bourdelaís AJ, Deutch AY (1994). The effects of haloperidol and clozapine on extracellular GABA levels in the prefrontal cortex of the rat: an *in vivo* microdialysis study. *Cereb Cortex* 4: 69–77.  
Bymaster FP, Calligaro DO, Falcone JF, Marsh RD, Moore NA, Tye NC *et al* (1996). Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacology* 14: 87–96.  
Callado LF, Hopwood SE, Hancock PJ, Stamford JA (2000). Effects of dizocilpine (MK 801) on noradrenaline, serotonin and dopamine release and uptake. *Neuroreport* 11: 173–176.  
Carli M, Baviera M, Invernizzi RW, Balducci C (2006). Dissociable contribution of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the medial prefrontal cortex to different aspects of executive control such as impulsivity and compulsive perseveration in rats. *Neuropsychopharmacology* 31: 757–767.  
Carr DB, Sesack SR (1996). Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals. *J Comp Neurol* 369: 1–15.  
Cartmell J, Perry KW, Salhoff CR, Monn JA, Schoepp DD (2001). Acute increases in monoamine release in the rat prefrontal cortex by the mGlu2/3 agonist LY379268 are similar in profile to risperidone, not locally mediated, and can be elicited in the presence of uptake blockade. *Neuropharmacology* 40: 847–855.  
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<sub>A</sub>, and glutamate receptors. *J Neurosci* 21: 9917–9929.  
Corbett R, Camacho F, Woods AT, Kerman LL, Fishkin RJ, Brooks K *et al* (1995). Antipsychotic agents antagonize non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonist-induced behaviors. *Psychopharmacology* 120: 67–74.  
Coyle JT, Tsai G (2004). The NMDA receptor glycine modulatory site: a therapeutic target for improving cognition and reducing negative symptoms in schizophrenia. *Psychopharmacology* 174: 32–38.  
Daly DA, Moghaddam B (1993). Actions of clozapine and haloperidol on the extracellular levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex and striatum of conscious rats. *Neurosci Lett* 152: 61–64.

- Dégenétais E, Thierry A-M, Glowinski J, Gioanni Y (2003). Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: an *in vivo* intracellular recording study. *Cereb Cortex* 13: 782–792.
- Duncan GE, Leipzig JN, Mailman RB, Lieberman JA (1998). Differential effects of clozapine and haloperidol on ketamine-induced metabolic activation. *Brain Res* 812: 65–75.
- Ellenbroek BA, Budde S, Cools AR (1996). Prepulse inhibition and latent inhibition: the role of dopamine in the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 75: 535–542.
- Farber NB, Nemmers B, Noguchi KK (2006). Acute D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> dopaminergic agonism but chronic D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> antagonism prevents NMDA antagonist neurotoxicity. *Biol Psychiatry* 60: 630–638.
- Fujiyama F, Kuramoto E, Okamoto K, Hioki H, Furuta T, Zhou L et al (2004). Presynaptic localization of an AMPA-type glutamate receptor in corticostriatal and thalamostriatal axon terminals. *Eur J Neurosci* 20: 3322–3330.
- 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.
- Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR (2001). Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology* 156: 117–154.
- Gigg J, Tan AM, Finch DM (1994). Glutamatergic hippocampal formation projections to prefrontal cortex in the rat are regulated by GABAergic inhibition and show convergence with glutamatergic projections from the limbic thalamus. *Hippocampus* 4: 189–198.
- Giros B, Jaber M, Jones SR, Wightman RM, Caron MG (1996). Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature* 379: 606–612.
- Gleason SD, Shannon HE (1997). Blockade of phencyclidine-induced hyperlocomotion by olanzapine, clozapine and serotonin receptor subtype selective antagonists in mice. *Psychopharmacology* 129: 79–84.
- Goldman-Rakic PS (1995). Cellular basis of working memory. *Neuron* 14: 477–485.
- Grunze HCR, Rainnie DG, Hasselmo ME, Barkai E, Hearn EF, McCarley RW et al (1996). NMDA-dependent modulation of CA1 local circuit inhibition. *J Neurosci* 16: 2034–2043.
- Hajós M, Richards CD, Székely AD, Sharp T (1998). An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projections to the midbrain raphe nuclei in the rat. *Neuroscience* 87: 95–108.
- Heidbreder CA, Foxton R, Cilia J, Hughes ZA, Shah AJ, Atkins A et al (2001). Increased responsiveness of dopamine to atypical, but not typical antipsychotics in the medial prefrontal cortex of rats reared in isolation. *Psychopharmacology* 156: 338–351.
- Hertel P, Mathé JM, Nomikos GG, Iurlo M, Mathé AA, Svensson TH (1996). Effects of D-amphetamine and phencyclidine on behavior and extracellular concentrations of neurotensin and dopamine in the ventral striatum and the medial prefrontal cortex of the rat. *Behav Brain Res* 72: 103–114.
- Homayoun H, Moghaddam B (2007). Fine-tuning of awake prefrontal cortex neurons by clozapine: comparison with haloperidol N-desmethylclozapine. *Biol Psychiatry* 61: 679–687.
- Homayoun H, Stefani MR, Adams BW, Tamagan GD, Moghaddam B (2004). Functional interaction between NMDA and mGlu5 receptors: effects on working memory, instrumental learning, motor behaviors, and dopamine release. *Neuropsychopharmacology* 29: 1259–1269.
- Hondo H, Nakahara T, Nakamura K, Hirano M, Uchimura H, Tashiro N (1995). The effect of phencyclidine on the basal and high potassium evoked extracellular GABA levels in the striatum of freely-moving rats: an *in vivo* microdialysis study. *Brain Res* 671: 54–62.
- Iravani MM, Muscat R, Kruk ZL (1999). MK-801 interaction with the 5-HT transporter: a real-time study in brain slices using fast cyclic voltammetry. *Synapse* 32: 212–224.
- 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 USA* 101: 8467–8472.
- Javitt DC, Zukin SR (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148: 1301–1308.
- Jentsch JD, Roth RH (1999). The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20: 201–225.
- Jentsch JD, Tran A, Taylor JR, Roth RH (1998). Prefrontal cortical involvement in phencyclidine-induced activation of the mesolimbic dopamine system: behavioral and neurochemical evidence. *Psychopharmacology* 138: 89–95.
- Jodo E, Suzuki Y, Katayama T, Hoshino KY, Takeuchi S, Niwa SI et al (2005). Activation of medial prefrontal cortex by phencyclidine is mediated via a hippocampo-prefrontal pathway. *Cereb Cortex* 15: 663–669.
- Jodo E, Suzuki Y, Takeuchi S, Niwa SI, Kayama Y (2003). Different effects of phencyclidine and methamphetamine on firing activity of medial prefrontal cortex neurons in freely moving rats. *Brain Res* 962: 226–231.
- Krimer LS, Goldman-Rakic PS (2001). Prefrontal microcircuits: membrane properties and excitatory input of local, medium, and wide arbor interneurons. *J Neurosci* 21: 3788–3796.
- Krystal JH, D'Souza DC, Mathalon D, Perry E, Belger A, Hoffman R (2003). NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology* 169: 215–233.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD et al (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51: 199–214.
- Kuroda M, Yokofujita J, Murakami K (1998). An ultrastructural study of the neural circuit between the prefrontal cortex and the mediodorsal nucleus of the thalamus. *Prog Neurobiol* 54: 417–458.
- Langman NJ, Smith CGS, Whitehead KJ (2006). Selective serotonin re-uptake inhibition attenuates evoked glutamate release in the dorsal horn of the anaesthetised rat *in vivo*. *Pharmacol Res* 53: 149–155.
- Li Q, Clark S, Lewis DW, Wilson WA (2002). NMDA receptor antagonists disinhibit rat posterior cingulate and retrosplenial cortices: a potential mechanism of neurotoxicity. *J Neurosci* 22: 3070–3080.
- Lieberman JA (1996). Atypical antipsychotic drugs as a first-line treatment of schizophrenia: a rationale and hypothesis. *J Clin Psychiatry* 57(Suppl 11): 68–71.
- Lorrain DS, Baccéi CS, Bristow LJ, Anderson JJ, Varney MA (2003). Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience* 117: 697–706.
- Lucas G, Compan V, Charnay Y, Neve RL, Nestler EJ, Bockaert J et al (2005). Frontocortical 5-HT<sub>4</sub> receptors exert a positive feedback on serotonergic activity: viral transfections, subacute and chronic treatments with 5-HT<sub>4</sub> agonists. *Biol Psychiatry* 57: 918–925.
- Lucki I (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* 44: 151–162.
- Maione S, Rossi F, Biggs CS, Fowler LJ, Whitton PS (1997). AMPA receptors modulate extracellular 5-hydroxytryptamine concentration and metabolism in rat striatum *in vivo*. *Neurochem Int* 30: 299–304.

- Malhotra AK, Adler CM, Kennison SD, Elman I, Pickar D, Breier A (1997). Clozapine blunts *N*-methyl-D-aspartate antagonist-induced psychosis: a study with ketamine. *Biol Psychiatry* 42: 664–668.
- Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D et al (1994). NMDA receptor function and human cognition: the effects of ketamine in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 14: 301–307.
- Martin P, Carlsson ML, Hjorth S (1998). Systemic PCP treatment elevates brain extracellular 5-HT: a microdialysis study in awake rats. *Neuroreport* 9: 2985–2988.
- Martín-Ruiz R, Puig MV, Celada P, Shapiro DA, Roth BL, Mengod G et al (2001). Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. *J Neurosci* 21: 9856–9866.
- Mathé JM, Nomikos GG, Blakeman KH, Svensson TH (1999). Differential actions of dizocilpine (MK-801) on the mesolimbic and mesocortical dopamine systems: role of neuronal activity. *Neuropharmacology* 38: 121–128.
- Maurel-Remy S, Bervoets K, Millan MJ (1995). Blockade of phencyclidine-induced hyperlocomotion by clozapine and MDL 100,907 in rats reflects antagonism of 5-HT<sub>2A</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* 280: R9–R11.
- Meltzer HY (1999). The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* 21(Suppl 2): 106S–115S.
- Millan MJ (2005). *N*-methyl D-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: novel insights and clinical perspectives. *Psychopharmacology* 179: 30–53.
- Millan MJ, Brocco M, Gobert A, Joly F, Bervoets K, Rivet J-M et al (1999). Contrasting mechanisms of action and sensitivity to antipsychotics of phencyclidine versus amphetamine: importance of nucleus accumbens 5-HT<sub>2A</sub> sites for PCP-induced locomotion in the rat. *Eur J Neurosci* 11: 4419–4432.
- Moghaddam B (1993). Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J Neurochem* 60: 1650–1657.
- Moghaddam B, Adams BW (1998). Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science* 281: 1349–1352.
- Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D (1997). Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 17: 2921–2927.
- Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH (1999). Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 98: 427–436.
- Newcomer JW, Farber NB, Jevtovic-Todorovic V, Selke G, Melson AK, Hershey T et al (1999). Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology* 20: 106–118.
- Olney JW, Farber NB (1995). Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 52: 998–1007.
- Olney JW, Newcomer JW, Farber NB (1999). NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiat Res* 33: 523–533.
- Park S, Püschel J, Sauter BH, Rentsch M, Hell D (1999). Spatial working memory deficits and clinical symptoms in schizophrenia: a 4-month follow-up study. *Biol Psychiatry* 46: 392–400.
- Patel DR, Young AMJ, 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.
- Paxinos G, Watson C (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press: San Diego.
- Schmidt CJ, Fadaye GM (1996). Regional effects of MK-801 on dopamine release: effects of competitive NMDA or 5-HT<sub>2A</sub> receptor blockade. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 1541–1549.
- Sharp FR, Tomitaka M, Bernaudin M, Tomitaka S (2001). Psychosis: pathological activation of limbic thalamocortical circuits by psychomimetics and schizophrenia? *Trends Neurosci* 24: 330–334.
- Suzuki Y, Jodo E, Takeuchi S, Niwa S, Kayama Y (2002). Acute administration of phencyclidine induces tonic activation of medial prefrontal cortex neurons in freely moving rats. *Neuroscience* 114: 769–779.
- Takahata R, Moghaddam B (2003). Activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex sustains the motoric and dopaminergic effects of phencyclidine. *Neuropsychopharmacology* 28: 1117–1124.
- Tamminga CA (1998). Schizophrenia and glutamatergic transmission. *Crit Rev Neurobiol* 12: 21–36.
- Tao R, Auerbach SB (2000). Regulation of serotonin release by GABA and excitatory amino acids. *J Psychopharmacol* 14: 100–113.
- Timmerman W, Cisci G, Nap A, de Vries JB, Westerink BHC (1999). Effects of handling on extracellular levels of glutamate and other amino acids in various areas of the brain measured by microdialysis. *Brain Res* 833: 150–160.
- Timmerman W, Westerink BHC (1997). Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse* 27: 242–261.
- Tomitaka S, Tomitaka M, Tolliver BK, Sharp FR (2000). Bilateral blockade of NMDA receptors in anterior thalamus by dizocilpine (MK-801) injures pyramidal neurons in rat retrosplenial cortex. *Eur J Neurosci* 12: 1420–1430.
- Väisänen J, Lindén A-M, Lakso M, Wong G, Heinemann U, Castrén E (1999). Excitatory actions of NMDA receptor antagonists in rat entorhinal cortex and cultured entorhinal cortical neurons. *Neuropsychopharmacology* 21: 137–146.
- Wang Y, Goldman-Rakic PS (2004). D2 receptor regulation of synaptic burst firing in prefrontal cortical pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 5093–5098.
- Weinberger DR, Gallhofer B (1997). Cognitive function in schizophrenia. *Int Clin Psychopharmacol* 12(Suppl 4): S29–S36.
- Yamamoto BK, Pehek EA, Meltzer HY (1994). Brain region effects of clozapine on amino acid and monoamine transmission. *J Clin Psychiatry* 55(Suppl B): 8–14.
- Yonezawa Y, Kuroki T, Kawahara T, Tashiro N, Uchimura H (1998). Involvement of  $\gamma$ -aminobutyric acid neurotransmission in phencyclidine-induced dopamine release in the medial prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol* 341: 45–56.



Trabajo 3:

**Role of different monoamine receptors controlling MK-801-induced release of serotonin and glutamate in the medial prefrontal cortex: relevance for antipsychotic action.**

López-Gil X., Artigas F. and Adell A.

*International Journal of Neuropsychopharmacology, 12, 487-499 (2009)*

Se ha demostrado que la administración sistémica de MK-801 provoca un incremento en los niveles corticales de serotonina (5-HT) y glutamato. Con el objetivo de profundizar el mecanismo de acción de los antipsicóticos, se estudió la contribución de diferentes receptores monoaminérgicos al efecto de estos fármacos. Los resultados sugieren que los antagonistas D2 así como los agonistas D1 estarían realizando su acción sobre la neurona GABAérgica, aumentando su actividad ya sea por un efecto activador directo, ya sea liberándola de una excesiva inhibición consecuencia de una hiperdopaminergia cortical provocada por el antagonismo NMDA. Esto permitiría la recuperación de su función inhibitoria, frenando así la hiperactividad de las neuronas piramidales. En cambio, los efectos sobre los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y  $\alpha_1$ -adrenérgico estarían mediados por una acción directa sobre la neurona piramidal (incluyendo aquellas de proyección a los núcleos del rafe), inhibiendo así su hiperexcitación tras la administración de MK-801. Como se ha sugerido anteriormente, es posible que una excesiva transmisión glutamatérgica cortical esté relacionada con los síntomas positivos de la esquizofrenia, tratados por fármacos con un común antagonismo D2. En cambio, las alteraciones en la transmisión serotoninérgica estarían asociadas con los síntomas negativos/cognitivos, donde fármacos con afinidad por los receptores serotoninérgicos y adrenérgicos, como los antipsicóticos, muestran mejorías.



# Role of different monoamine receptors controlling MK-801-induced release of serotonin and glutamate in the medial prefrontal cortex: relevance for antipsychotic action

Xavier López-Gil<sup>1,2</sup>, Francesc Artigas<sup>1,2</sup> and Albert Adell<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC (IDIBAPS), Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)

## Abstract

Several studies have demonstrated that systemically administered *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists increase serotonin (5-HT) and glutamate release in the medial prefrontal cortex (mPFC). Previously we showed that the perfusion of clozapine in the mPFC prevented the MK-801-induced increase in extracellular glutamate and 5-HT whereas haloperidol blocked only the effect of MK-801 on glutamate. To study the contribution of different monoaminergic receptors (for which clozapine and haloperidol exhibit distinct affinities) to these effects, here we used *in-vivo* microdialysis to examine the role of local blockade of dopamine D<sub>2</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors as well as agonism at dopamine D<sub>1</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the mPFC on the increased efflux of glutamate and 5-HT elicited by MK-801. The results show that M100907 (5-HT<sub>2A</sub> antagonist), BAY x 3702 (5-HT<sub>1A</sub> agonist) and prazosin ( $\alpha_1$ -adrenergic antagonist) blocked the MK-801-induced increase of 5-HT and glutamate in the mPFC. However, raclopride, eticlopride (dopamine D<sub>2</sub> antagonists) and SKF-38393 (dopamine D<sub>1</sub> agonist) were able to prevent the increased efflux of glutamate (but not that of 5-HT) elicited by MK-801. We propose that D<sub>2</sub> receptor antagonists and D<sub>1</sub> agonists would act predominantly on a subpopulation of GABAergic interneurons of the mPFC, thus leading to an enhanced cortical inhibition that would prevent an excessive glutamatergic transmission. On the other hand, atypical antipsychotic drugs might further act upon 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>1A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenoceptors present in pyramidal cells (including those projecting to the dorsal raphe nucleus), which would directly inhibit an excessive excitability of these cells.

Received 8 May 2008; Reviewed 13 June 2008; Revised 7 July 2008; Accepted 9 July 2008;  
First published online 28 August 2008

**Key words:** MK-801, dopamine D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub> receptors, 5-HT<sub>2A</sub> receptor, 5-HT<sub>1A</sub> receptor,  $\alpha_1$ -adrenoceptor.

## Introduction

Non-competitive *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists such as phencyclidine (PCP) and ketamine have been used as a pharmacological model of schizophrenia because they can mimic psychotic and negative symptoms as well as cognitive impairment in healthy individuals (Javitt and Zukin, 1991; Krystal et al., 1994). In rats, NMDA antagonists have

also been shown to increase extracellular glutamate (Calcagno et al., 2006; Ceglia et al., 2004; López-Gil et al., 2007; Lorrain et al., 2003; Moghaddam et al., 1997), dopamine (Adams and Moghaddam, 1998; Schmidt and Fadaye, 1996), and serotonin (5-HT) (Adams and Moghaddam, 2001; Amargós-Bosch et al., 2006; Calcagno et al., 2006; Ceglia et al., 2004; López-Gil et al., 2007; Millan et al., 1999) in the medial prefrontal cortex (mPFC). It has been proposed that non-competitive NMDA receptor antagonists might impair GABAergic inhibition of glutamatergic neurons in the mPFC (Homayoun and Moghaddam, 2007b; Krystal et al., 2003; Moghaddam et al., 1997), leading to downstream changes in other transmitters. Indeed, GABAergic interneurons in limbic cortex and

Address for correspondence: A. Adell, Ph.D., Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC (IDIBAPS), Carrer Rosselló 161, 6th floor, Room 630, E-08036 Barcelona, Spain.  
Tel.: +34 93 3638321 Fax: +34 93 3638301  
E-mail: aacnqi@iibb.csic.es

hippocampus are more sensitive to the action of NMDA receptor antagonists than pyramidal neurons (Grunze et al., 1996).

Numerous studies have demonstrated that dopamine, 5-HT and glutamate play an important role in schizophrenia and that receptors for these transmitters are involved in the action of antipsychotic drugs. It is generally accepted that all available antipsychotic drugs possess some degree of dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonism and that blockade of limbic D<sub>2</sub> receptors improves positive symptoms (Kapur et al., 2000). However, this has been challenged recently by the finding that drugs that attenuate glutamate release without acting directly on dopamine receptors are beneficial for positive and negative symptoms (Patil et al., 2007). With regard to clozapine, the prototypical atypical antipsychotic drug, it has been suggested that its superior efficacy and tolerability is partly due to its lower occupancy of D<sub>2</sub> receptors (Kapur et al., 1999) together with an additional interaction with 5-HT<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>1</sub> receptors (Lundberg et al., 1996). Therefore, it has been proposed that a weak D<sub>2</sub> receptor blockade coupled to a relatively stronger 5-HT<sub>2A</sub> inhibition is the key feature of atypical antipsychotic drugs (see Meltzer, 2004 for review), responsible for causing fewer extrapyramidal side-effects (EPS). On the other hand, the relationship found between cognitive/negative symptoms in schizophrenia and a reduction of prefrontal dopamine D<sub>1</sub> receptor binding (Okubo et al., 1997) prompted some investigators to suggest that dopamine D<sub>1</sub> receptor agonists might be helpful in alleviating negative symptoms and cognitive deficits of schizophrenia (see Goldman-Rakic et al., 2004 for review). There is also evidence underpinning the importance of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in certain aspects of the pharmacotherapy of schizophrenia (Millan, 2000; Sumiyoshi et al., 2001). Furthermore, 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists reduce the incidence of EPS in schizophrenia patients treated with haloperidol (Goff et al., 1991; Moss et al., 1993). Finally, many clinically effective antipsychotic drugs (both classical and atypical) exhibit  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonism (Arnt and Skarsfeldt, 1998; Bymaster et al., 1996), which has been postulated to be involved in their clinical action (Svensson, 2003). However, although central  $\alpha_1$ -adrenoceptors may regulate sensorimotor gating altered in schizophrenia (Alsene et al., 2006), there are not studies dealing with the occupancy of  $\alpha_1$ -adrenoceptors in individuals under antipsychotic treatment.

In the preclinical setting, it has been shown that the local administration of antipsychotic drugs decrease extracellular 5-HT in the mPFC (Amargós-Bosch et al., 2003, 2007). Activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors and

blockade of 5-HT<sub>2A</sub> receptors might contribute to this effect since both types of compounds were able to prevent the increases in 5-HT and glutamate, as well as cognitive deficits induced by NMDA receptor antagonists (Calcagno et al., 2006; Carli et al., 2006; Ceglia et al., 2004). Furthermore, clozapine and haloperidol attenuated PCP-induced increase in cortical glutamate (Abekawa et al., 2006) as well as the elevated firing of a population of mPFC pyramidal neurons elicited by PCP or MK-801 (Homayoun and Moghaddam, 2007a; Kargieman et al., 2007). Interestingly, clozapine exhibited a levelling effect on the firing of pyramidal cells in the mPFC (Homayoun and Moghaddam, 2007a). This fine-tuning effect might contribute to the unique therapeutic efficacy of clozapine in schizophrenia.

In a previous study we showed that the perfusion of clozapine in the mPFC prevented the MK-801-induced increase in extracellular glutamate and 5-HT whereas haloperidol blocked only the effect of MK-801 on glutamate (López-Gil et al., 2007). To study the contribution of different monoaminergic receptors (for which clozapine and haloperidol exhibit distinct affinities) to these effects, in the present study we examined the role of blockade of dopamine D<sub>2</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors as well as agonism at dopamine D<sub>1</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the mPFC on the increased efflux of glutamate and 5-HT elicited by MK-801.

## Materials and methods

### Animals

Male Wistar rats (Charles River Laboratories, Cerdanyola del Vallès, Spain) weighing 250–280 g were used. They were maintained on a 12 h light/dark cycle (lights on 07:00) and housed three per cage before surgery and individually after surgery. Food and water were available ad libitum. All experimental procedures followed European Union regulations (Official Journal of the European Communities L358/1, 18 December 1986), and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees. To reduce the influence of between-day variations on drug effects, most experimental groups were not completed at once, but throughout the duration of the whole work instead.

### Drugs and reagents

All the HPLC reagents were of analytical grade and obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Dizocipine maleate (MK-801), 5-hydroxytryptamine



oxalate, glutamate, and ready-made *o*-phthalaldehyde (OPA) reagent, made up of 1 mg OPA per ml solution with 2-mercaptoethanol as the sulphhydryl moiety, were purchased from Sigma-Aldrich (Tres Cantos, Spain). Raclopride, eticlopride hydrochloride, prazosin hydrochloride, and SKF-38393 were from Tocris (Bristol, UK). Citalopram hydrobromide, BAY x 3707, and M100907 (formerly MDL-100907) were generously donated by H. Lundbeck A/S (Copenhagen-Valby, Denmark), Bayer AG (Wuppertal, Germany) and Pierre-Fabre (Castres, France), respectively.

MK-801 was dissolved in saline for intraperitoneal (i.p.) administration. The dose of MK-801 was taken from our previous study (López-Gil et al., 2007). It is possible that lower doses of MK-801 are sufficient to induce stereotypies and increases in pyramidal cell firing (Jackson et al., 2004), but they failed to induce changes in extracellular glutamate (López-Gil et al., 2007). All other drugs were dissolved in the perfusion fluid for local application through dialysis probes. Concentrated solutions (1 mM) were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  and working solutions were prepared immediately before the experiments by dilution in the perfusion fluid. Concentrations are expressed as free bases. Because of the difficulty in obtaining the real extracellular concentration of the drugs perfused through the dialysis fluid, we tested the least effective concentrations (i.e. within the low micromolar range) in order to gain selectivity for the specific receptors studied.

#### Microdialysis procedures

Concentric microdialysis probes were constructed with a 4-mm-long membrane. Following anaesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg i.p.), rats were placed in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA), and dialysis probes were implanted in the mPFC and secured to the skull with anchor screws and dental cement. Stereotaxic coordinates from Bregma and skull surface were: AP +3.2 mm, L -0.8 mm, DV -6.0 mm; according to Paxinos and Watson (1986). Microdialysis experiments were conducted 20–24 h after surgery in freely moving rats by continuously perfusing probes with a fluid containing 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.26 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.18 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 1  $\mu\text{M}$  citalopram. The addition of a 5-HT uptake blocker to the perfusion fluid is used in some microdialysis experiments to reduce clearance from the extracellular space, thus enhancing the release component of extracellular 5-HT (Adell et al., 2002). On the other hand, low concentrations of 5-HT uptake blockers, such as used in the present study,

are without effect on dialysate glutamate in vivo (Langman et al., 2006; C. M. T. Queiroz and F. Artigas, unpublished results). Furthermore, voltammetric studies have shown that MK-801 may interact with the serotonin transporter (Callado et al., 2000; Iravani et al., 1999), thereby underscoring the importance of including citalopram in the perfusion fluid.

The artificial cerebrospinal fluid was perfused at 1.5  $\mu\text{l}/\text{min}$  with a Harvard model 22 syringe pump (Harvard Apparatus, South Natick, MA, USA) attached to an overhead liquid swivel (Instech, Plymouth Meeting, PA, USA). Dialysate samples of 30  $\mu\text{l}$  were collected every 20 min and divided into two fractions for the determination of 5-HT (20  $\mu\text{l}$ ) and glutamate (10  $\mu\text{l}$ ). The in-vitro dialysis probe recoveries for 5-HT and glutamate were 16% and 17%, respectively. Owing to the incidental occurrence of chromatographic problems, for some rats data on only one transmitter (glutamate or 5-HT) were available. After an initial 1 h sample of dialysate was discarded, four samples were collected to establish stable baseline levels of 5-HT and glutamate (expressed as concentration of transmitter in a 30- $\mu\text{l}$  sample) before any pharmacological treatment. At the completion of dialysis experiments, rats were given an overdose of sodium pentobarbital and a Fast Green solution was perfused through the dialysis probes to stain the surrounding tissue for subsequent histological examination.

#### Biochemical determinations

The concentration of 5-HT in dialysate samples was determined by an HPLC system consisting of a Waters 717plus autosampler (Waters Cromatografía, Cerdanyola, Spain), a Hewlett-Packard series 1050 pump (Agilent Technologies, Las Rozas, Spain), a 3 $\mu$  octadecylsilica (ODS) column (7.5 cm  $\times$  0.46 cm; Beckman, San Ramon, CA, USA), and an amperometric detector Hewlett-Packard 1049 (Agilent Technologies) set at an oxidation potential of 0.6 V. The mobile phase consisted of 0.15 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.8 mM octyl sodium sulfate, 0.2 mM EDTA (pH 2.8, adjusted with phosphoric acid), and 30% methanol, and was pumped at 0.7 ml/min (López-Gil et al., 2007). For the determination of glutamate, another HPLC system was used, which consisted of a Waters 717plus autosampler, a Waters 600 quaternary gradient pump, and a Nucleosil 5 $\mu$  ODS column (10 cm  $\times$  0.4 cm; Teknokroma, Spain). Dialysate samples were precolumn-derivatized with OPA reagent and the entire process was carried out by the autosampler. Briefly, 90  $\mu\text{l}$  distilled water was added to the 10  $\mu\text{l}$  dialysate sample

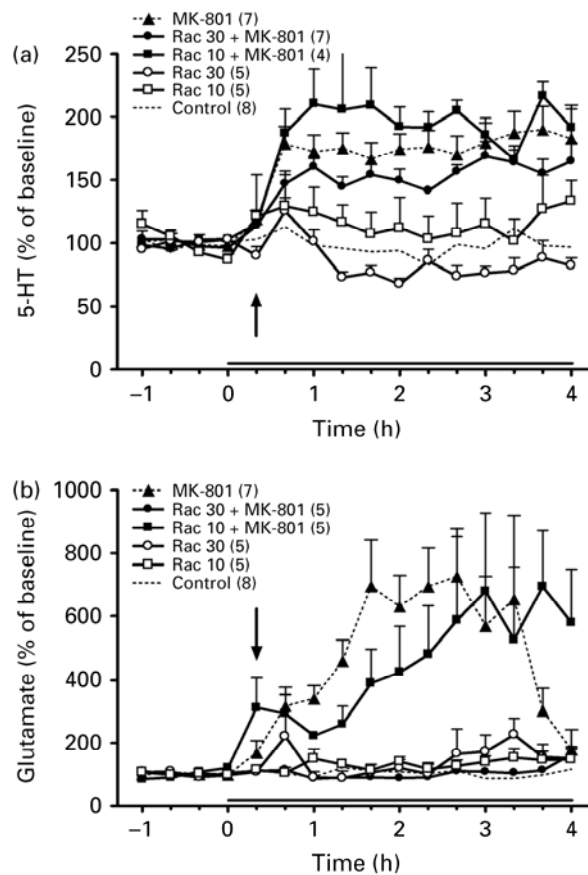
and this was followed by the addition of 15  $\mu$ l OPA reagent. After 2.5 min reaction, 80  $\mu$ l of this mixture was injected into the column. Detection was carried out with a Waters 470 scanning fluorescence detector using excitation and emission wavelengths of 360 nm and 450 nm, respectively. The mobile phase was pumped at 0.8 ml/min and consisted of two components (Calcagno et al., 2006): solution A, made up of 0.05 m  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 28% methanol, adjusted to pH 6.4 with 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , and solution B, made up of 100% methanol/ $\text{H}_2\text{O}$  (8:2 ratio). After the elution of glutamate peak at 3 min with 100% solution A, a gradient was established going from 100% solution A to 100% solution B in 2 min. After washing out late-eluting peaks (3 min), mobile phase returned to initial conditions (100% solution A) in 2 min. The detection limits for 5-HT and glutamate were 4 fmol and 0.2 pmol, respectively (signal-to-noise ratio 3). Quantification of 5-HT and glutamate was carried out by comparison to a daily standard curve comprising the concentrations of transmitters expected in dialysate samples.

**Statistics**

Data (mean  $\pm$  S.E.M.) are expressed as fmol/30  $\mu$ l for 5-HT and pmol/30  $\mu$ l for glutamate, and shown in the figures as percentages of basal values, averaged from four fractions collected before treatment. The changes in dialysate 5-HT and glutamate for each drug were analysed by two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) with time and treatment as factors. When significant effects were found, post-hoc Newman-Keuls (NK) multiple comparison tests were used to compare effects of different treatment groups. The level of significance was set at  $p < 0.05$ .

**Results**

The basal (pre-drug) concentrations of 5-HT and glutamate in dialysate samples of the mPFC, not corrected for in-vitro recovery, were  $49.8 \pm 1.4$  fmol/30  $\mu$ l ( $n = 168$ ) and  $28.3 \pm 3.7$  pmol/30  $\mu$ l ( $n = 168$ ), respectively. Although the basal concentration of glutamate is higher than that in our previous study (López-Gil et al., 2007), it falls within the range reported by other authors (Adams and Moghaddam, 2001; Lorrain et al., 2003; Moghaddam et al., 1997). The systemic administration of MK-801 to rats increased the extracellular concentration of 5-HT in comparison to the saline-injected group, as demonstrated by the significant effect of treatment ( $F_{1,13} = 33.91$ ,  $p < 0.0001$ ), time ( $F_{15,195} = 7.99$ ,  $p < 0.00001$ ), and treatment  $\times$  time interaction ( $F_{15,195} = 8.65$ ,  $p < 0.00001$ ). MK-801 also elevated

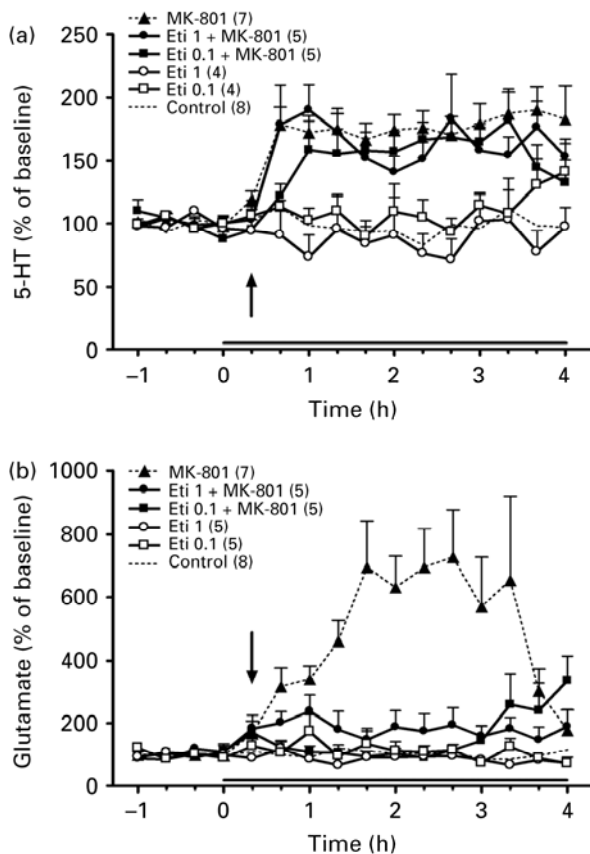


**Figure 1.** Effects of the intra-medial prefrontal cortex (mPFC) perfusion (line at foot of panels) of raclopride (Rac) (10 and 30  $\mu$ M; Rac 10 and Rac 30, respectively) on the efflux of (a) 5-HT and (b) glutamate in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg i.p., arrow). Data (mean  $\pm$  S.E.M.) are expressed as percentage changes of the four basal pre-drug values. Number of animals given in parentheses. The control group received an injection of saline (1 ml/kg i.p.). Groups given saline and MK-801 are the same in all figures and are depicted as dotted lines.

extracellular glutamate in the mPFC as shown by the significant effect of treatment ( $F_{1,13} = 31.12$ ,  $p < 0.0001$ ), time ( $F_{15,195} = 7.18$ ,  $p < 0.00001$ ), and treatment  $\times$  time interaction ( $F_{15,195} = 7.16$ ,  $p < 0.00001$ ).

**Effects of dopamine  $D_2$  antagonists**

Two different  $D_2$ -like antagonists were used, raclopride and eticlopride, which possesses 10-fold greater affinity than raclopride for dopamine  $D_2/D_3$  receptors (Assié et al., 2006). Raclopride, which by itself had no effect on 5-HT and glutamate in saline-injected animals, was unable to block the MK-801-induced increase in dialysate 5-HT (Figure 1a). However, it prevented the effect of MK-801 on glutamate ( $F_{3,21} = 12.08$ ,  $p < 0.0001$ ; Figure 1b) in a concentration-dependent manner. Post-hoc comparisons showed



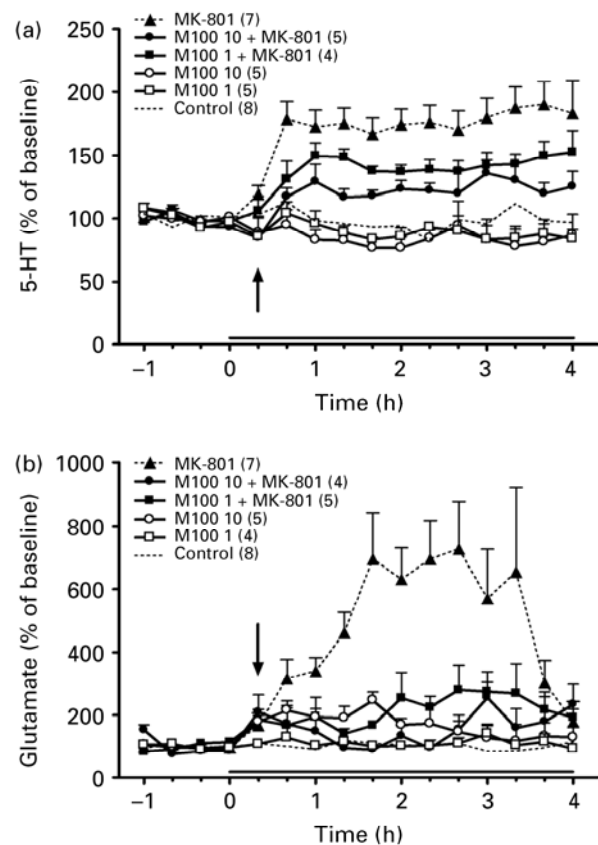
**Figure 2.** Effects of the intra-medial prefrontal cortex (mPFC) perfusion (line at foot of panels) of eticlopride (Eti) (0.1 and 1  $\mu\text{M}$ ; Eti 0.1 and Eti 1, respectively) on the efflux of (a) 5-HT and (b) glutamate in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg i.p., arrow). Data (mean  $\pm$  S.E.M.) are expressed as percentage changes of the four basal pre-drug values. Number of animals given in parentheses. The control group received an injection of saline (1 ml/kg i.p.). Groups given saline and MK-801 are the same in all figures and are depicted as dotted lines.

that only the concentration of 30  $\mu\text{M}$  raclopride significantly abolished the increase in cortical glutamate elicited by MK-801 ( $p < 0.002$ , NK test). At 100  $\mu\text{M}$ , raclopride was also unable to block the MK-801-induced increase in cortical 5-HT (data not shown).

In a similar way, eticlopride did not alter basal levels of 5-HT and glutamate when perfused in saline-injected animals and failed to reduce the effects of MK-801 on cortical 5-HT (Figure 2a). It blocked only the effects of MK-801 on glutamate ( $F_{15,315} = 5.22$ ,  $p < 0.00001$ ; Figure 2b). Both concentrations of eticlopride were equally effective in this respect ( $p < 0.0005$ , NK test).

#### Effects of 5-HT<sub>2A</sub> antagonists and 5-HT<sub>1A</sub> agonists

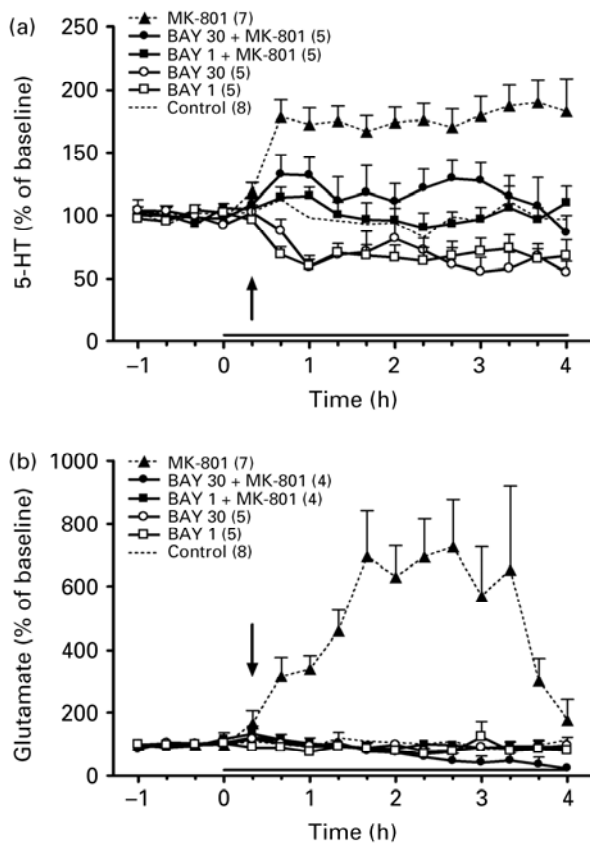
In contrast to dopamine D<sub>2</sub> antagonists, the selective 5-HT<sub>2A</sub> antagonist, M100907, prevented the increase in



**Figure 3.** Effects of the intra-medial prefrontal cortex (mPFC) perfusion (line at foot of panels) of M100907 (M100) (1 and 10  $\mu\text{M}$ ; M100 1 and M100 10, respectively) on the efflux of (a) 5-HT and (b) glutamate in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg i.p., arrow). Data (mean  $\pm$  S.E.M.) are expressed as percentage changes of the four basal pre-drug values. Number of animals given in parentheses. The control group received an injection of saline (1 ml/kg i.p.). Groups given saline and MK-801 are the same in all figures and are depicted as dotted lines.

5-HT ( $F_{3,20} = 15.08$ ,  $p < 0.0001$ ; Figure 3a) and glutamate ( $F_{3,20} = 15.72$ ,  $p < 0.00002$ ; Figure 3b) elicited by MK-801. Post-hoc comparisons showed that both concentrations of M100907 had similar effects on 5-HT ( $p < 0.02$ , NK test) and glutamate ( $p < 0.0005$ ; Newman-Keuls test). When administered to saline-injected animals, M100907 did not change the basal extracellular concentration of 5-HT, but a significant increase in cortical glutamate was observed ( $F_{2,14} = 10.67$ ,  $p < 0.002$ ) although this was only statistically significant after the perfusion of 10  $\mu\text{M}$  M100907 ( $p < 0.003$ , NK test).

The selective 5-HT<sub>1A</sub> agonist, BAY x 3702, also abolished the increase in 5-HT ( $F_{3,21} = 12.92$ ,  $p < 0.0001$ ; Figure 4a) and glutamate ( $F_{3,19} = 20.30$ ,  $p < 0.00001$ ; Figure 4b) elicited by MK-801. Post-hoc comparisons showed that both concentrations of BAY x 3702 had

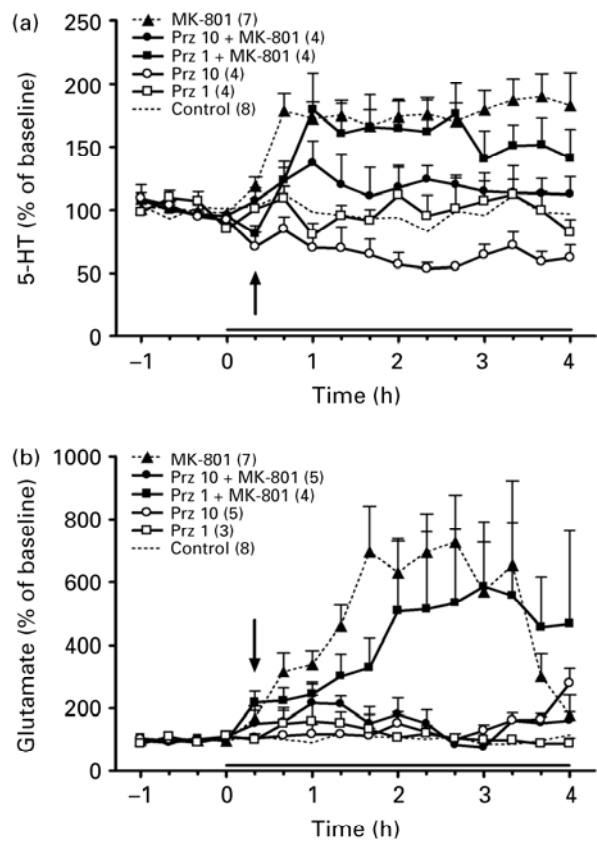


**Figure 4.** Effects of the intra-medial prefrontal cortex (mPFC) perfusion (line at foot of panels) of BAY  $\times$  3702 (BAY) (1 and 30  $\mu$ M; BAY 1 and BAY 30, respectively) on the efflux of (a) 5-HT and (b) glutamate in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg i.p., arrow). Data (mean  $\pm$  S.E.M.) are expressed as percentage changes of the four basal pre-drug values. Number of animals given in parentheses. The control group received an injection of saline (1 ml/kg i.p.). Groups given saline and MK-801 are the same in all figures and are depicted as dotted lines.

comparable effects on 5-HT ( $p < 0.002$ , NK test) and glutamate ( $p < 0.0005$ , NK test). Although it seemed that the concentration of 1  $\mu$ M BAY  $\times$  3702 was more effective than that of 30  $\mu$ M in blocking the MK-801-induced increase of 5-HT (Figure 4a), this difference was not statistically significant. When applied alone in saline-injected animals, BAY  $\times$  3702 failed to change the concentration of glutamate, but reduced that of 5-HT ( $F_{2,15} = 8.24$ ,  $p < 0.005$ ; Figure 4a). Post-hoc comparisons showed that both concentrations of BAY  $\times$  3702 were equally effective ( $p < 0.02$ , NK test).

**Effects of  $\alpha_1$ -adrenergic antagonists**

Similar to 5-HT<sub>2A</sub> antagonists and 5-HT<sub>1A</sub> agonists, the intra-mPFC perfusion of the selective  $\alpha_1$ -adrenergic antagonist, prazosin, blocked the increases in 5-HT

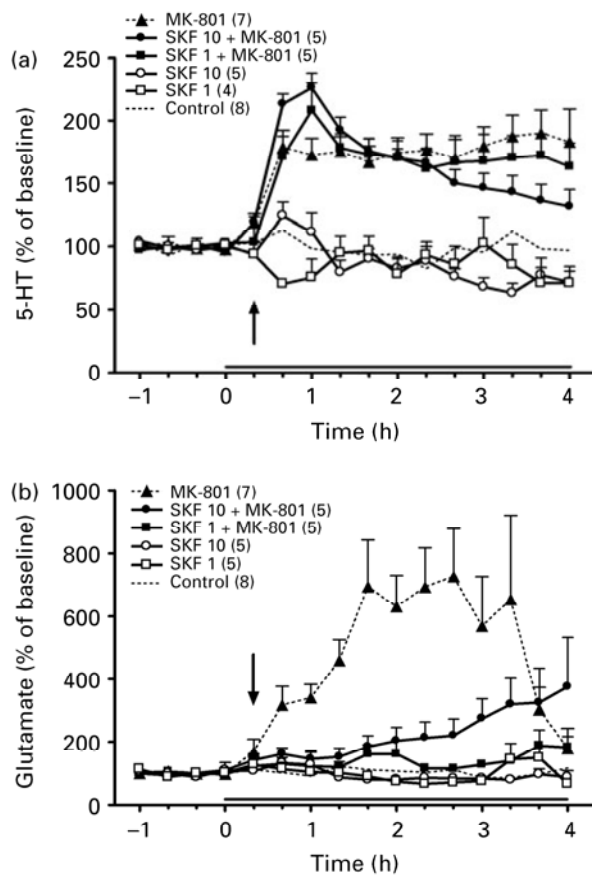


**Figure 5.** Effects of the intra-medial prefrontal cortex (mPFC) perfusion (line at foot of panels) of prazosin (Prz) (1 and 10  $\mu$ M; Prz 1 and Prz 10, respectively) on the efflux of (a) 5-HT and (b) glutamate in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg i.p., arrow). Data (mean  $\pm$  S.E.M.) are expressed as percentage changes of the four basal pre-drug values. Number of animals given in parentheses. The control group received an injection of saline (1 ml/kg i.p.). Groups given saline and MK-801 are the same in all figures and are depicted as dotted lines.

( $F_{3,19} = 10.38$ ,  $p < 0.003$ ; Figure 5a) and glutamate ( $F_{3,20} = 11.44$ ,  $p < 0.001$ ; Figure 5b) evoked by MK-801, in a concentration-dependent manner. Post-hoc comparisons showed that only 10  $\mu$ M prazosin was required to prevent the MK-801-induced increases in 5-HT ( $p < 0.02$ , NK test) and glutamate ( $p < 0.005$ , NK test). When applied alone in saline-injected animals, prazosin did not alter the concentration of glutamate, but reduced that of 5-HT ( $F_{2,13} = 5.69$ ,  $p < 0.02$ ; Figure 5a). Post-hoc comparisons showed that only the concentration of 10  $\mu$ M prazosin reduced basal 5-HT levels in the mPFC ( $p < 0.02$ , NK test).

**Effects of dopamine D<sub>1</sub> agonists**

SKF-38393 has similar affinity for dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>5</sub> receptors. Like dopamine D<sub>2</sub> antagonists, the dopamine D<sub>1</sub> agonist, SKF-38393, which by itself had



**Figure 6.** Effects of the intra-medial prefrontal cortex (mPFC) perfusion (line at foot of panels) of SKF-38393 (1 and 10  $\mu\text{M}$ ; SKF 1 and SKF 10, respectively) on the efflux of 5-HT (a) and glutamate (b) in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg i.p.; arrow). Data (mean  $\pm$  S.E.M.) are expressed as percentage changes of the four basal pre-drug values. Number of animals given in parentheses. The control group received an injection of saline (1 ml/kg i.p.). Groups given saline and MK-801 are the same in all figures and are depicted as dotted lines.

no effect on 5-HT and glutamate in saline-injected animals, was unable to block the MK-801-induced increase in dialysate 5-HT (Figure 6a). However, it prevented the effect of MK-801 on glutamate ( $F_{3,21} = 15.07$ ,  $p < 0.0002$ ; Figure 6b). Post-hoc comparisons showed that both concentrations of SKF-38393 (1 and 10  $\mu\text{M}$ ) significantly abolished the increase in cortical glutamate elicited by MK-801 ( $p < 0.02$ , NK test). Although it seemed that the concentration of 1  $\mu\text{M}$  SKF-38393 was more effective than that of 10  $\mu\text{M}$  in blocking the MK-801-induced increase of glutamate (Figure 6b), this difference was not statistically significant.

## Discussion

In a previous study, we showed that the perfusion of clozapine in the mPFC prevented the MK-801-induced

increase in glutamate and 5-HT, whereas haloperidol blocked only the effects on glutamate (López-Gil et al., 2007). In view of those results we proposed that serotonergic transmission in the mPFC is regulated by multiple monoamine receptors (for which clozapine exhibits moderate to high affinity), whereas glutamatergic transmission is regulated predominantly by dopamine  $D_2$  receptor blockade (a key feature of antipsychotic action that prevails in typical antipsychotic drugs such as haloperidol). The present work was therefore aimed at testing the veracity of this proposition, using selective agonists and antagonists for monoamine receptors.

## Effects of dopaminergic drugs

In very good accordance with our hypothesis, two different dopamine  $D_2$  receptor antagonists, raclopride and eticlopride, replicate the results of haloperidol, i.e. both drugs prevented the MK-801-induced increase of glutamate, but not that of 5-HT. Because only  $\sim 5\%$  of projection neurons in layer V of the mPFC project to the dorsal raphe nucleus (Gabbott et al., 2005), it is conceivable that, under conditions of increased 5-HT and glutamate transmission in the mPFC following MK-801 administration, blockade of  $D_2$  receptors by raclopride and eticlopride might be able to inhibit cortical output (blockade of increased glutamate efflux), although sparing cortico-raphe projections.

Tyrosine hydroxylase-positive terminals are in apposition with GABA interneurons (Benes et al., 2000; Sesack et al., 1998), and dopamine  $D_2$  receptors are abundant in GABA interneurons of deep cortical layers of the rat (Khan et al., 1998; Le Moine and Gaspar, 1998; Vincent et al., 1995). Furthermore, dopamine exerts a tonic inhibitory effect on fast-spiking GABA cells that target the perisomatic domain of pyramidal cells through  $D_2$  receptors (Gao et al., 2003; Seamans et al., 2001). Therefore, an excessive release of dopamine following MK-801 administration (Schmidt and Fadaye, 1996) might lead to a further reduction in GABAergic inhibition, which would result in an impairment of the intrinsic cortical circuitry. In fact, this has been postulated to occur in the schizophrenia brain (Beasley et al., 2002; Benes, 1997; Egan and Weinberger, 1997). Dopamine  $D_2$  antagonists would relieve the inhibitory action of dopamine overflow on GABA-containing neurons, thus promoting GABA release and reducing cortical glutamatergic output induced by MK-801. An important question that can be raised here is whether dopamine  $D_2$  antagonists would act on the same population of GABAergic neurons impaired by MK-801 and/or on another

subset of interneurons. Further research is needed to answer this question.

The regulation of prefrontal function by dopamine involves not only  $D_2$ , but also  $D_1$  receptors. Our results show that dopamine  $D_1$  agonism elicits comparable effects to those of dopamine  $D_2$  antagonists. It is difficult to reconcile the effects of SKF-38393 with an action on  $D_1$  receptors located on pyramidal neurons (Bergson et al., 1995; Davidoff and Benes, 1998) because this receptor is excitatory. Since mPFC  $D_1$  receptors are also present on inhibitory GABA interneurons (Davidoff and Benes, 1998; Le Moine and Gaspar, 1998), one possibility for the effect of SKF-38393 is activation of GABAergic inhibition, which would block the increase in glutamate efflux induced by MK-801. The lack of effects of raclopride, eticlopride and SKF-38393 on mPFC 5-HT suggests that these two dopamine receptors could regulate distinct inhibitory circuits, except those that control the prefrontal projection to the raphe nuclei, at least in the conditions of the present study.

Altogether our results suggest that dopamine can regulate the efflux of glutamate by means of an action on GABAergic interneurons in the mPFC. Because of the different nature of dopamine  $D_1$  (excitatory) vs.  $D_2$  (inhibitory) receptors,  $D_2$  antagonists and  $D_1$  agonists might end up with the same final response, i.e. to restore cortical GABA efflux in order to block an excessive glutamatergic transmission following MK-801 administration. Furthermore, our results are also coincident with the proposal that  $D_1$  receptor activation requires phasic dopamine release whereas  $D_2$  receptors are continuously driven by basal, tonic dopamine release (Grace, 1991).

#### *Effects of serotonergic and adrenergic drugs*

In contrast to dopaminergic compounds, the selective 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist, M100907, was able to prevent the increase of 5-HT and glutamate evoked by MK-801, which is in line with previous work using a competitive NMDA antagonist (Ceglia et al., 2004). This effect can be accounted for by a reduction of the increased excitability of prefrontal pyramidal neurons (including those that project to the dorsal raphe nucleus) produced by an exacerbated glutamatergic transmission. In good accord with the present work, previous studies from our laboratory have demonstrated that M100907 also blocked the increased serotonergic transmission caused by the intra-mPFC perfusion of *S*- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-4-propionate (*S*-AMPA), 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) and the  $\alpha_1$ -adrenoceptor

antagonist cirazoline (Amargós-Bosch et al., 2003, 2004), as well as thalamic disinhibition (Amargós-Bosch et al., 2007). 5-HT<sub>2A</sub> receptors are predominantly localized to apical dendrites of pyramidal neurons (Cornea-Hébert et al., 1999; Willins et al., 1997), a cellular zone that receives inputs from different cortical layers, allowing cross-layer integration. Consequently, 5-HT<sub>2A</sub> antagonists are in a unique position to cancel the increased cortico-cortical transmission that probably occurs after MK-801 administration and the pharmacological conditions mentioned above. Although there is evidence that 5-HT<sub>2A</sub> receptors are also present in cortical GABAergic interneurons of the rat mPFC (Santana et al., 2004; Willins et al., 1997), our results point to a predominant effect of M100907 on those receptors located in pyramidal neurons following MK-801 administration.

The local perfusion of BAY x 3702 in the mPFC also prevented the increased efflux of 5-HT and glutamate following MK-801 administration with a potency similar to that of M100907. Similarly, the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-OH-DPAT, prevents the increase in extracellular 5-HT and glutamate evoked by a competitive NMDA antagonist (Calcagno et al., 2006). The reduction of 5-HT is probably accounted for by a decrease in the activity of pyramidal cells (Araneda and Andrade, 1991; Ashby et al., 1994), which would result in a reduction of a tonic excitatory input on the dorsal raphe nucleus, thereby decreasing the activity of 5-HT cells (Celada et al., 2001). Similarly to the action of 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonists (see above), previous work has also shown that 5-HT<sub>1A</sub> agonists reverse the increased cortical 5-HT efflux induced by intra-mPFC perfusion of *S*-AMPA, DOI and cirazoline (Amargós-Bosch et al., 2003, 2004), as well as thalamic disinhibition (Amargós-Bosch et al., 2007). In the present study we show that BAY x 3702 also blocks the effects of MK-801 on glutamate. This suggests that 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation in the mPFC potently attenuates the action of agents that increase the activity of pyramidal neurons, an effect shared by several different treatments and involving the stimulation of AMPA/kainate receptors in the mPFC (Katayama et al., 2007; López-Gil et al., 2007). Furthermore, the pivotal localization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the perisomatic region of cortical pyramidal neurons of the rat (Czyrak et al., 2003) might be the basis of the powerful effect of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonism. In addition, the high level of expression of 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in pyramidal cells labelled by vGluT1 (Santana et al., 2004) together with the high co-localization of both receptors in the mPFC (~80%; Amargós-Bosch et al., 2004) provides further support for the neurochemical

changes described. Although 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors are also expressed in cortical GABAergic interneurons of the rat (Aznar et al., 2003; Santana et al., 2004; Willins et al., 1997), they do not seem to play a role in the control of cortical 5-HT and glutamate in the conditions of the present work.

The local perfusion of the  $\alpha_1$ -adrenergic antagonist, prazosin, in the mPFC was also able to prevent the MK-801-induced increase in 5-HT and glutamate. The effect of prazosin probably involves the blockade of  $\alpha_1$ -adrenoceptors located on pyramidal neurons, including those in layer V that project to the dorsal raphe nucleus, as previously observed for 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors. The mechanism of action of prazosin is probably similar to that of M100907 inasmuch as both 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenoceptors share the same signal transduction mechanism and mediate the excitatory actions of 5-HT and noradrenaline, respectively, on pyramidal neurons of the mPFC (Araneda and Andrade, 1991; Marek and Aghajanian, 1999). Moreover, they are localized to the same cortical areas (Day et al., 1997; Domyancic and Morilak, 1997; Pieribone et al., 1994). In line with the present work, previous studies in our laboratory have demonstrated that intra-mPFC perfusion of prazosin reversed the increase of 5-HT elicited by the cortical application of cirazoline, DOI and S-AMPA (Amargós-Bosch et al., 2003), as well as thalamic disinhibition (Amargós-Bosch et al., 2007).

Altogether these effects need to be interpreted at the cellular (pyramidal) and not at receptor level because all these compounds do not interact directly with each other's receptors. It is therefore suggested that antagonism at  $\alpha_1$ -adrenergic and 5-HT<sub>2A</sub> receptors, as well as agonism at 5-HT<sub>1A</sub> receptors are able to prevent an excessive glutamatergic transmission in the mPFC produced by different treatments and conditions.

#### *Implications for antipsychotic action*

The findings of the present and previous (López-Gil et al., 2007) work from our laboratory suggest that excessive glutamate transmission in the mPFC, secondary to a NMDA receptor blockade, may be associated with some positive symptoms of schizophrenia, particularly those that are better responsive to dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonism (a feature shared by most antipsychotic drugs). In contrast, an impairment of serotonergic pathways in the mPFC might rather be related to negative symptoms and/or cognitive deficits, conditions for which clozapine and some other atypical antipsychotics possess superior efficacy.

It remains to be established, however, whether this antiserotonergic effect may confer the atypical profile of such drugs. There is a general consensus that dopamine D<sub>2</sub> blockers (typical neuroleptics) are less effective in treating negative/cognitive symptoms, which, are better palliated by drugs with a strong antagonism at 5-HT<sub>2A</sub> receptors and a weak blockade of dopamine D<sub>2</sub> receptors (see Meltzer, 2004 for review). Thus, there is a clear need for targeting different transmitter receptors to achieve an effective treatment for schizophrenia. Our results indicate that 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>1A</sub>, dopamine D<sub>1</sub> and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors may play an important role. Drugs showing 5-HT<sub>2A</sub> antagonism and/or 5-HT<sub>1A</sub> agonism, such as clozapine, increase dopamine efflux in the mPFC of rodents (Assié et al., 2005; Ichikawa et al., 2001; Pehek and Yamamoto, 1994; Rollema et al., 1997), an effect that appears to be dependent on the presence of intact 5-HT<sub>1A</sub> receptors (Bortolozzi et al., 2007; Díaz-Mataix et al., 2005). This selectivity on cortical dopamine transmission together with a lesser occupancy of limbic dopamine D<sub>2</sub> receptors (Kapur et al., 1999) appears to confer a better side-effect profile of antipsychotics. However, selective 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists do not appear to provide a distinct antipsychotic-like action, and their possible benefit in the clinic may rather be related to a lower appearance of EPS (Millan, 2000).

The intra-mPFC administration of M100907, BAY × 3702 and prazosin prevents MK-801-induced increase in 5-HT and glutamate, effects that are comparable to those obtained with clozapine (López-Gil et al., 2007). It is possible that this may relate to a better treatment of most symptoms of schizophrenia. In fact, preclinical studies have shown that antagonism at 5-HT<sub>2A</sub> receptors and agonism at 5-HT<sub>1A</sub> receptors can ameliorate cognitive deficits induced by NMDA receptor antagonists (Carli et al., 2006). Because each of these receptor components do not confer antipsychotic properties individually, it is conceivable that a combined effect is necessary to achieve this goal.

Dopamine D<sub>1</sub> receptors are associated with sustained activity of mPFC neurons and have been postulated to be essential for working-memory performance (see Goldman-Rakic et al., 2004 for review). Clozapine may enhance dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated neurotransmission (Ahlenius, 1999; Oerther and Ahlenius, 2000). Therefore, the pro-cognitive action of clozapine could also result from its action on dopamine D<sub>1</sub> receptors or, alternatively, through potentiation of NMDA transmission (see Millan, 2005 for review). If psychosis is modelled in animals by an increased glutamatergic transmission in the mPFC

(Adams and Moghaddam, 2001; López-Gil et al., 2007; Lorrain et al., 2003; Moghaddam et al., 1997), the blockade of the effect of MK-801 by SKF-38393 (present study) may argue in favour of the use of dopamine D<sub>1</sub> agonists in the treatment of the illness.

In summary, our results suggest that the combination of blockade of dopamine D<sub>2</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors as well as agonism at dopamine D<sub>1</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the mPFC may be beneficial in antipsychotic-like action. It appears that dopamine D<sub>2</sub> antagonists and dopamine D<sub>1</sub> agonists would activate cortical GABA inhibition. The lack of effect of dopaminergic compounds on the efflux of 5-HT implies that not all subtypes of GABAergic interneurons are regulated in a similar way by dopamine (Seamans and Yang, 2004). Atypical antipsychotic drugs might further act upon 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>1A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenoceptors present in pyramidal cells (including those projecting to the dorsal raphe nucleus), which would inhibit directly an excessive excitability of these cells. This would contribute to the fine-tuning of discrete cortical circuits impaired in schizophrenia. As we have suggested previously, it is possible that an excessive glutamate transmission in the mPFC may be related with positive symptoms of schizophrenia that are generally alleviated by an antagonism at D<sub>2</sub> receptors whereas an impaired serotonergic transmission might rather be associated to negative symptoms and/or cognitive impairment.

The conclusions raised in the present study are based on the analogies between the action of antipsychotic drugs and that of selective agonists and antagonists for monoaminergic receptors. However, it remains to be determined if there is any possible effect resulting from a combination of multiple interactions among these receptors.

### Acknowledgements

This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (Grant SAF 2007-62378 to F.A.), the Spanish Ministry of Health (FIS Grant PI070111 to A.A.) and by the Generalitat de Catalunya (SGR2005/00758). X.L.-G. is the recipient of a predoctoral fellowship from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). We gratefully acknowledge the skilful technical assistance of Leticia Campa and Verónica Paz.

### Statement of Interest

None.

### References

- Abekawa T, Ito K, Koyama T** (2006). Role of the simultaneous enhancement of NMDA and dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated neurotransmission in the effects of clozapine on phencyclidine-induced acute increases in glutamate levels in the rat medial prefrontal cortex. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 374, 177–193.
- Adams B, Moghaddam B** (1998). Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. *Journal of Neuroscience* 18, 5545–5554.
- Adams BW, Moghaddam B** (2001). Effect of clozapine, haloperidol, or M100907 on phencyclidine-activated glutamate efflux in the prefrontal cortex. *Biological Psychiatry* 50, 750–757.
- Adell A, Celada P, Abellán MT, Artigas F** (2002). Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Research. Brain Research Reviews* 39, 154–180.
- Ahlenius S** (1999). Clozapine: dopamine D1 receptor agonism in the prefrontal cortex as the code to decipher a Rosetta stone of antipsychotic drugs. *Pharmacology and Toxicology* 84, 193–196.
- Alsene KM, Carasso BS, Connors EE, Bakshi VP** (2006). Disruption of prepulse inhibition after stimulation of central but not peripheral  $\alpha$ -1 adrenergic receptors. *Neuropsychopharmacology* 31, 2150–2161.
- Amargós-Bosch M, Adell A, Artigas F** (2007). Antipsychotic drugs reverse the AMPA receptor-stimulated release of 5-HT in the medial prefrontal cortex. *Journal of Neurochemistry* 102, 550–561.
- Amargós-Bosch M, Adell A, Bortolozzi A, Artigas F** (2003). Stimulation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors in the rat medial prefrontal cortex increases the local *in vivo* 5-hydroxytryptamine release: reversal by antipsychotic drugs. *Journal of Neurochemistry* 87, 831–842.
- 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<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2A</sub> receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cerebral Cortex* 14, 281–299.
- Amargós-Bosch M, López-Gil X, Artigas F, Adell A** (2006). Clozapine and olanzapine, but not haloperidol, suppress serotonin efflux in the medial prefrontal cortex elicited by phencyclidine and ketamine. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 9, 565–573.
- Araneda R, Andrade R** (1991). 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub> and 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> 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.
- Ashby Jr. CR, Edwards E, Wang RY** (1994). Electrophysiological evidence for a functional interaction between 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the rat medial



- prefrontal cortex: an iontophoretic study. *Synapse* 17, 173–181.
- Assié MB, Dominguez H, Consul-Denjean N, Newman-Tancredi A** (2006). In vivo occupancy of dopamine D<sub>2</sub> receptors by antipsychotic drugs and novel compounds in the mouse striatum and olfactory tubercles. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 373, 441–450.
- Assié MB, Ravailhe V, Faucillon V, Newman-Tancredi A** (2005). Contrasting contribution of 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation to neurochemical profile of novel antipsychotics: frontocortical dopamine and hippocampal serotonin release in rat brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315, 265–272.
- Aznar S, Qian Z, Shah R, Rahbek B, Knudsen GM** (2003). The 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptor is located on calbindin- and parvalbumin-containing neurons in the rat brain. *Brain Research* 959, 58–67.
- Beasley CL, Zhang ZJ, Patten I, Reynolds GP** (2002). Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium-binding proteins. *Biological Psychiatry* 52, 708–715.
- Benes FM** (1997). The role of stress and dopamine-GABA interactions in the vulnerability for schizophrenia. *Journal of Psychiatric Research* 31, 257–275.
- Benes FM, Taylor JB, Cunningham MC** (2000). Convergence and plasticity of monoaminergic systems in the medial prefrontal cortex during the postnatal period: implications for the development of psychopathology. *Cerebral Cortex* 10, 1014–1027.
- Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS** (1995). Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *Journal of Neuroscience* 15, 7821–7836.
- Bortolozzi A, Díaz-Mataix L, Toth M, Celada P, Artigas F** (2007). In vivo actions of aripiprazole on serotonergic and dopaminergic systems in rodent brain. *Psychopharmacology* 191, 745–758.
- Bymaster FP, Calligaro DO, Falcone JF, Marsh RD, Moore NA, Tye NC, Seeman P, Wong DT** (1996). Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacology* 14, 87–96.
- Calcagno E, Carli M, Invernizzi RW** (2006). The 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT prevents prefrontocortical glutamate and serotonin release in response to blockade of cortical NMDA receptors. *Journal of Neurochemistry* 96, 853–860.
- Callado LF, Hopwood SE, Hancock PJ, Stamford JA** (2000). Effects of dizocilpine (MK 801) on noradrenaline, serotonin and dopamine release and uptake. *NeuroReport* 11, 173–176.
- Carli M, Baviera M, Invernizzi RW, Balducci C** (2006). Dissociable contribution of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the medial prefrontal cortex to different aspects of executive control such as impulsivity and compulsive perseveration in rats. *Neuropsychopharmacology* 31, 757–767.
- Ceglia I, Carli M, Baviera M, Renoldi G, Calcagno E, Invernizzi RW** (2004). The 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonist M100,907 prevents extracellular glutamate rising in response to NMDA receptor blockade in the mPFC. *Journal of Neurochemistry* 91, 189–199.
- 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<sub>A</sub>, and glutamate receptors. *Journal of Neuroscience* 21, 9917–9929.
- Cornea-Hébert V, Riad M, Wu C, Singh SK, Descarries L** (1999). Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the central nervous system of adult rat. *Journal of Comparative Neurology* 409, 187–209.
- Czyrak A, Czepiel K, Mackowiak M, Chocyk A, Wedzony K** (2003). Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors might control the output of cortical glutamatergic neurons in rat cingulate cortex. *Brain Research* 989, 42–51.
- Davidoff SA, Benes FM** (1998). High-resolution scatchard analysis shows D<sub>1</sub> receptor binding on pyramidal and nonpyramidal neurons. *Synapse* 28, 83–90.
- Day HE, Campeau S, Watson Jr. SJ, Akil H** (1997). Distribution of  $\alpha_{1a}$ -,  $\alpha_{1b}$ - and  $\alpha_{1d}$ -adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 13, 115–139.
- Díaz-Mataix L, Scorza MC, Bortolozzi A, Toth M, Celada P, Artigas F** (2005). Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action. *Journal of Neuroscience* 25, 10831–10843.
- Domyancic AV, Morilak DA** (1997). Distribution of  $\alpha_{1A}$  adrenergic receptor mRNA in the rat brain visualized by in situ hybridization. *Journal of Comparative Neurology* 386, 358–378.
- Egan MF, Weinberger DR** (1997). Neurobiology of schizophrenia. *Current Opinion in Neurobiology* 7, 701–707.
- Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ** (2005). Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *Journal of Comparative Neurology* 492, 145–177.
- Gao WJ, Wang Y, Goldman-Rakic PS** (2003). Dopamine modulation of perisomatic and peridendritic inhibition in prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience* 23, 1622–1630.
- Goff DC, Midha KK, Brotman AW, McCormick S, Waites M, Amico ET** (1991). An open trial of buspirone added to neuroleptics in schizophrenic patients. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 11, 193–197.
- Goldman-Rakic PS, Castner SA, Svensson TH, Siever LJ, Williams GV** (2004). Targeting the dopamine D<sub>1</sub> receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology* 174, 3–16.
- 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.
- Grunze HC, Rainnie DG, Hasselmo ME, Barkai E, Hearn EF, McCarley RW, Greene RW** (1996). NMDA-dependent

- modulation of CA1 local circuit inhibition. *Journal of Neuroscience* 16, 2034–2043.
- Homayoun H, Moghaddam B** (2007a). Fine-tuning of awake prefrontal cortex neurons by clozapine: comparison with haloperidol and N-desmethylozapine. *Biological Psychiatry* 61, 679–687.
- Homayoun H, Moghaddam B** (2007b). NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience* 27, 11496–11500.
- Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, Fowler WL, O’Laughlin IA, Meltzer HY** (2001). 5-HT<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. *Journal of Neurochemistry* 76, 1521–1531.
- Iravani MM, Muscat R, Kruk ZL** (1999). MK-801 interaction with the 5-HT transporter: a real-time study in brain slices using fast cyclic voltammetry. *Synapse* 32, 212–224.
- Jackson ME, Homayoun H, Moghaddam B** (2004). NMDA receptor hypofunction produces concomitant firing rate potentiation and burst activity reduction in the prefrontal cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101, 8467–8472.
- Javitt DC, Zukin SR** (1991). Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 148, 1301–1308.
- Kapur S, Zipursky R, Jones C, Remington G, Houle S** (2000). Relationship between dopamine D<sub>2</sub> occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 157, 514–520.
- Kapur S, Zipursky RB, Remington G** (1999). Clinical and theoretical implications of 5-HT<sub>2</sub> and D<sub>2</sub> receptor occupancy of clozapine, risperidone, and olanzapine in schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 156, 286–293.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104, 14843–14848.
- Katayama T, Jodo E, Suzuki Y, Hoshino KY, Takeuchi S, Kayama Y** (2007). Activation of medial prefrontal cortex neurons by phencyclidine is mediated via AMPA/kainate glutamate receptors in anesthetized rats. *Neuroscience* 150, 442–448.
- Khan ZU, Gutiérrez A, Martín R, Peñafiel A, Rivera A, De La Calle A** (1998). Differential regional and cellular distribution of dopamine D<sub>2</sub>-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *Journal of Comparative Neurology* 402, 353–371.
- Krystal JH, D’Souza DC, Mathalon D, Perry E, Belger A, Hoffman R** (2003). NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology* 169, 215–233.
- Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers Jr. MB, Charney DS** (1994). Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Archives of General Psychiatry* 51, 199–214.
- Langman NJ, Smith CG, Whitehead KJ** (2006). Selective serotonin re-uptake inhibition attenuates evoked glutamate release in the dorsal horn of the anaesthetised rat in vivo. *Pharmacological Research* 53, 149–155.
- Le Moine C, Gaspar P** (1998). Subpopulations of cortical GABAergic interneurons differ by their expression of D1 and D2 dopamine receptor subtypes. *Brain Research. Molecular Brain Research* 58, 231–236.
- López-Gil X, Babot Z, Amargós-Bosch M, Suñol C, Artigas F, Adell A** (2007). Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801-increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology* 32, 2087–2097.
- Lorrain DS, Baccei CS, Bristow LJ, Anderson JJ, Varney MA** (2003). Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience* 117, 697–706.
- Lundberg T, Lindström L, Hartvig P, Reibring L, Ågren H, Lundqvist H, Fasth KJ, Antoni G, Langström B** (1996). Serotonin-2 and dopamine-1 binding components of clozapine in frontal cortex and striatum in the human brain visualized by positron emission tomography. *Psychiatry Research (Neuroimaging Section)* 67, 1–10.
- Marek GJ, Aghajanian GK** (1999). 5-HT<sub>2A</sub> receptor or  $\alpha_1$ -adrenoceptor activation induces excitatory postsynaptic currents in layer V pyramidal cells of the medial prefrontal cortex. *European Journal of Pharmacology* 367, 197–206.
- Meltzer HY** (2004). What’s atypical about atypical antipsychotic drugs? *Current Opinion in Pharmacology* 4, 53–57.
- Millan MJ** (2000). Improving the treatment of schizophrenia: focus on serotonin (5-HT)<sub>1A</sub> receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295, 853–861.
- Millan MJ** (2005). N-Methyl-D-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: novel insights and clinical perspectives. *Psychopharmacology* 179, 30–53.
- Millan MJ, Brocco M, Gobert A, Joly F, Bervoets K, Rivet J, Newman-Tancredi A, Audinot V, Maurel S** (1999). Contrasting mechanisms of action and sensitivity to antipsychotics of phencyclidine versus amphetamine: importance of nucleus accumbens 5-HT<sub>2A</sub> sites for PCP-induced locomotion in the rat. *European Journal of Neuroscience* 11, 4419–4432.
- Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D** (1997). Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *Journal of Neuroscience* 17, 2921–2927.

- Moss LE, Neppe VM, Drevets WC** (1993). Buspirone in the treatment of tardive dyskinesia. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 13, 204–209.
- Oerther S, Ahlenius S** (2000). Atypical antipsychotics and dopamine D<sub>1</sub> receptor agonism: an in vivo experimental study using core temperature measurements in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 292, 731–736.
- Okubo Y, Suhara T, Suzuki K, Kobayashi K, Inoue O, Terasaki O, Someya Y, Sassa T, Sudo Y, Matsushima E, et al.** (1997). Decreased prefrontal dopamine D<sub>1</sub> receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature* 385, 634–636.
- Patil ST, Zhang L, Martenyi F, Lowe SL, Jackson KA, Andreev BV, Avedisova AS, Bardenstein LM, Gurovich IY, Morozova MA, et al.** (2007). Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nature Medicine* 13, 1102–1107.
- Paxinos G, Watson C** (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pehek EA, Yamamoto BK** (1994). Differential effects of locally administered clozapine and haloperidol on dopamine efflux in the rat prefrontal cortex and caudate-putamen. *Journal of Neurochemistry* 63, 2118–2124.
- Pieribone VA, Nicholas AP, Dagerlind Å, Hökfelt T** (1994). Distribution of  $\alpha_1$  adrenoceptors in rat brain revealed by *in situ* hybridization experiments utilizing subtype-specific probes. *Journal of Neuroscience* 14, 4252–4268.
- Rollema H, Lu Y, Schmidt AW, Zorn SH** (1997). Clozapine increases dopamine release in prefrontal cortex by 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation. *European Journal of Pharmacology* 338, R3–R5.
- Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F** (2004). Expression of serotonin<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2A</sub> receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cerebral Cortex* 14, 1100–1109.
- Schmidt CJ, Fadayeel GM** (1996). Regional effects of MK-801 on dopamine release: effects of competitive NMDA or 5-HT<sub>2A</sub> receptor blockade. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 277, 1541–1549.
- Seamans JK, Gorelova N, Durstewitz D, Yang CR** (2001). Bidirectional dopamine modulation of GABAergic inhibition in prefrontal cortical pyramidal neurons. *Journal of Neuroscience* 21, 3628–3638.
- Seamans JK, Yang CR** (2004). The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Progress in Neurobiology* 74, 1–58.
- Seasack SR, Hawrylak VA, Melchitzky DS, Lewis DA** (1998). Dopamine innervation of a subclass of local circuit neurons in monkey prefrontal cortex: ultrastructural analysis of tyrosine hydroxylase and parvalbumin immunoreactive structures. *Cerebral Cortex* 8, 614–622.
- Sumiyoshi T, Matsui M, Yamashita I, Nohara S, Kurachi M, Uehara T, Sumiyoshi S, Sumiyoshi C, Meltzer HY** (2001). The effect of tandospirone, a serotonin<sub>1A</sub> agonist, on memory function in schizophrenia. *Biological Psychiatry* 49, 861–868.
- Svensson TH** (2003).  $\alpha$ -Adrenoceptor modulation hypothesis of antipsychotic atypicality. *Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry* 27, 1145–1158.
- Vincent SL, Khan Y, Benes FM** (1995). Cellular colocalization of dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors in rat medial prefrontal cortex. *Synapse* 19, 112–120.
- Willins DL, Deutch AY, Roth BL** (1997). Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. *Synapse* 27, 79–82.



Trabajo 4:

**Unraveling monoamine receptors involved in the action of typical and atypical antipsychotic on glutamatergic and serotonergic transmission in prefrontal cortex.**

López-Gil X., Artigas F. and Adell A.

*Current Pharmaceutical Design [Accepted]*

Nuestros trabajos previos han mostrado el efecto de la administración de los antagonistas NMDA sobre los niveles de serotonina y glutamato en la corteza prefrontal y cómo clozapina y haloperidol, así como determinados compuestos, eran capaces de revertir estas alteraciones. Siguiendo esta línea, en el presente estudio se ampliaron estas observaciones con el uso de dos antipsicóticos más (olanzapina y clorpromacina) y otros compuestos como el antagonista de los receptores D<sub>4</sub> L-745870. Los resultados obtenidos sugieren que una excesiva transmisión glutamatérgica cortical, fuertemente regulada por el receptor D<sub>2</sub>, podría estar relacionada con algunos de los síntomas positivos de la esquizofrenia, tratados por todos los antipsicóticos. En cambio, la alteración de la transmisión serotoninérgica en corteza estaría asociada con los síntomas negativos/cognitivos los cuales son mejor tratados por los antipsicóticos atípicos, los cuales presentan una gran afinidad por los receptores serotoninérgicos. Los efectos del antagonista D<sub>4</sub> coinciden con la hipótesis propuesta de que los antagonistas D<sub>2</sub> y agonistas D<sub>1</sub> actúan sobre la interneurona GABAérgica, incrementando la inhibición cortical. En el caso del agonismo D<sub>1</sub>, a dosis elevadas podemos observar un bloqueo del incremento de 5-HT cortical, sugiriendo un efecto sobre interneuronas que regularían la conexión corteza prefrontal-núcleos del rafe. En cambio, el agonismo 5-HT<sub>1A</sub>, antagonismo 5-HT<sub>2A</sub> y antagonismo  $\alpha_1$ -adrenérgico estarían mediados por una acción directa sobre la neurona piramidal, reduciendo su excesiva actividad debida al antagonismo NMDA. Estos resultados muestran el papel de estos receptores en el mecanismo de acción de los antipsicóticos y podrían explicar las diferencias terapéuticas existentes entre los fármacos clásicos y los atípicos, su diferente capacidad para tratar los síntomas de la esquizofrenia.



*Current Pharmaceutical Design*

**UNRAVELING MONOAMINE RECEPTORS INVOLVED IN THE ACTION OF TYPICAL AND ATYPICAL ANTIPSYCHOTICS ON GLUTAMATERGIC AND SEROTONERGIC TRANSMISSION IN PREFRONTAL CORTEX**

**Xavier López-Gil<sup>1,2</sup>, Francesc Artigas<sup>1,2</sup> and Albert Adell<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>*Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC (IDIBAPS), Barcelona, Spain*

<sup>2</sup>*Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)*

**Running title:** Monoamine receptors and antipsychotic action

\* *Corresponding author:*

Albert Adell, Ph.D.

Department of Neurochemistry and Neuropharmacology

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC (IDIBAPS)

Carrer Rosselló 161, 6th floor, Room 630

E-08036 Barcelona, Spain

Phone: +34 93 3638321

Fax: +34 93 3638301

E-mail: [aacnqi@iibb.csic.es](mailto:aacnqi@iibb.csic.es)





**ABSTRACT**

The systemic administration of noncompetitive *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists has been considered as a pharmacological model of schizophrenia. In the present work, we used *in vivo* microdialysis to examine: *first*, the effects of MK-801, on the efflux of glutamate and serotonin (5-HT) in the medial prefrontal cortex (mPFC) of the rat; *second*, whether the MK-801-induced changes in the cortical efflux of both transmitters could be blocked by atypical (clozapine and olanzapine) and classical (haloperidol and chlorpromazine) antipsychotic drugs given intra-mPFC; and *third*, the role of local blockade of dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>/D<sub>4</sub>, serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors as well as agonism at dopamine D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the mPFC on the increased efflux of glutamate and 5-HT elicited by MK-801. The four antipsychotic drugs blocked the MK-801-induced increase in glutamate, whereas only clozapine and olanzapine were able to block the increased efflux of 5-HT. Furthermore, M100907 (5-HT<sub>2A</sub> antagonist), BAY x 3702 (5-HT<sub>1A</sub> agonist) and prazosin ( $\alpha_1$ -adrenergic antagonist) blocked the MK-801-induced increase of 5-HT and glutamate in the mPFC. In contrast, raclopride (D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> antagonist) and L-745,870 (D<sub>4</sub> antagonist) were able to prevent the increased efflux of glutamate (but not that of 5-HT) elicited by MK-801. SKF-38393 (dopamine D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> agonist) also prevented the MK-801-induced increase of glutamate in the mPFC, but the same effect on cortical 5-HT was reached only at the highest concentration tested. We suggest that the blockade of an exacerbated 5-HT release in the mPFC induced by NMDA antagonists can be a characteristic of atypical antipsychotic drugs. Moreover, we propose that D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>/D<sub>4</sub> receptor antagonists would act predominantly on a subpopulation of GABAergic interneurons of the mPFC, thus enhancing cortical inhibition, which would prevent an excessive glutamatergic transmission. Dopamine D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> agonists would further stimulate GABA release from other subpopulation of interneurons controlling cortical output to the dorsal raphe nucleus. Atypical antipsychotic drugs might further act upon 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>1A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenoceptors present in pyramidal cells (including those projecting to the dorsal raphe nucleus), which would directly inhibit an excessive excitability of these cells.

## **INTRODUCTION**

The NMDA receptor hypofunction hypothesis of schizophrenia was established after the observation that NMDA receptor antagonists such as phencyclidine (PCP) and ketamine can induce, in healthy individuals, altered behavioral states that resemble the positive and negative symptoms as well as the cognitive deficits seen in schizophrenia [1-3]. In addition, ketamine can heighten psychotic episodes in patients with schizophrenia [4-6]. In rodents, PCP and the more potent and selective noncompetitive NMDA receptor antagonist, dizocilpine (MK-801), cause hyperlocomotion and stereotypies [7-9]. The hyperactivity is considered to be due predominantly to activation of D<sub>2</sub> receptors in the nucleus accumbens, whereas stereotypies are caused by stimulation of D<sub>2</sub> receptors in the caudate-putamen [10]. These behaviors have been potentially related to positive symptoms of schizophrenia [11-13]. Acute NMDA receptor antagonism has also been reported to increase the release of glutamate [14-18], dopamine [19, 20], and serotonin (5-HT) [8, 16-18, 21, 22] in the medial prefrontal cortex (mPFC). It has been proposed that stimulation of NMDA receptors on the GABA inhibitory interneurons within the cortex leads to the release of GABA, which would inhibit glutamatergic neurons and the subsequent release of glutamate. Blockade of such NMDA receptors would therefore decrease GABAergic inhibitory tone and result in an enhanced activity of pyramidal neurons within the cortex [14, 23, 24] leading to downstream changes in other transmitters. Indeed, GABAergic interneurons in limbic cortex and hippocampus are more sensitive than pyramidal neurons to the action of NMDA receptor antagonists [25, 26]. In addition, reduced GABAergic function would alter the synchronous firing patterns of cortical neurons, which may underlie information-processing deficits present in patients with schizophrenia [27].

Various studies have demonstrated that the interactions among dopamine, 5-HT and glutamate play an important role in the pathophysiology of schizophrenia and that receptors for these transmitters are involved in the action of antipsychotic drugs. Increased activity of the mesolimbic dopamine system is believed to underlie the positive or psychotic symptoms of schizophrenia and decreased activity within the mesocortical dopamine system is believed to reflect negative symptoms and cognitive function also seen in this illness [28-32]. All available antipsychotic drugs possess some degree of dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> receptor antagonism, and blockade of dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> receptors within the mesolimbic pathway reduces psychotic symptoms [33]. As a matter of fact, a good correlation exists between the clinical efficacy of antipsychotic drug and their affinity for D<sub>2</sub> receptor [34, 35]. Furthermore, most antipsychotic drugs display a dose-dependent threshold of D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> receptor occupancy for their therapeutic effects [36]. However, the necessity of D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> receptor blockade for therapeutic action has been challenged recently by the finding that drugs that attenuate glutamate release, without acting directly on dopamine receptors, are beneficial for positive and negative symptoms [37].

Several atypical antipsychotic drugs, on the other hand, are characterized by a lower affinity for D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> and higher affinity for 5-HT<sub>2A</sub> receptors, which has been proposed to confer a superior efficacy and tolerability [38, 39]. The lower occupancy of dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> receptors appears to be responsible for causing fewer extrapyramidal side-effects (EPS) [40]. In addition to the predominant role of the D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> receptor in the current treatment of psychotic symptoms, dopamine D<sub>1</sub> receptors have been implicated in schizophrenia [41, 42]. This line of evidence has been recently highlighted by the finding that cognitive/negative symptoms in schizophrenia are associated with a reduction of prefrontal dopamine D<sub>1</sub> receptor binding [43]. Some atypical antipsychotic drugs may also have affinity for other transmitter receptors such as serotonin 5-HT<sub>1A</sub>,  $\alpha$ -adrenergic, histamine H<sub>1</sub>, and muscarinic receptors, which may affect their efficacy and side-effect profile [44, 45]. Thus, there is some evidence for the importance of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists in certain aspects of the pharmacotherapy of schizophrenia [46-49]. Furthermore, 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists have been shown to reduce the incidence of EPS in schizophrenia patients treated with haloperidol [50, 51]. With regard to  $\alpha$ -adrenergic mechanisms, many clinically effective antipsychotic drugs (both classical and atypical) possess  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist properties [44, 52], which has been postulated to be clinically relevant [53]. However, although central  $\alpha_1$ -adrenoceptors may regulate sensorimotor gating altered in schizophrenia [54], there are not studies dealing with the occupancy of  $\alpha_1$ -adrenoceptors in individuals under antipsychotic treatment.

In the animal setting, most studies have shown that atypical, but not typical, antipsychotics block the effects of NMDA receptor antagonists on prepulse inhibition (PPI) of the startle response [55]. In addition, atypical antipsychotic drugs, but not haloperidol, increases extracellular DA concentration in the PFC [56, 57] and prevent the brain increase in regional 2-deoxyglucose uptake induced by ketamine [58]. We have shown recently that the local perfusion of antipsychotic drugs decreased extracellular 5-HT in the mPFC [59, 60]. Stimulation of 5-HT<sub>1A</sub> and blockade of 5-HT<sub>2A</sub> receptors might contribute to this effect since both types of compounds were able to prevent the increases in 5-HT and glutamate, as well as cognitive deficits induced by NMDA receptor antagonists [16, 17, 61, 62]. In contrast, raclopride and eticlopride (dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> antagonists) and SKF 38393 (dopamine D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> agonist) prevented the increase of glutamate (but not that of 5-HT) induced by MK-801 [62]. Furthermore, clozapine and haloperidol attenuated PCP-induced increase in cortical glutamate [63], as well as the elevated firing of a population of mPFC pyramidal neurons elicited by PCP or MK-801 [64, 65]. Interestingly, clozapine exhibited a leveling effect on the firing of pyramidal cells in the mPFC, increasing the activity of neurons with low baseline firing rates and decreasing the activity of neurons with higher firing rates [64]. This fine-tuning effect might contribute to the unique therapeutic efficacy of clozapine in schizophrenia.

In a previous study we showed that both clozapine and haloperidol blocked the MK-801-induced increase in glutamate in rat mPFC, whereas only clozapine was able to block

the increased efflux of 5-HT [18]. In addition, we also showed that antagonism at dopamine D<sub>2</sub> receptors and agonism at dopamine D<sub>1</sub> receptors resulted in blockade of the effects of MK-801 on mPFC glutamate but not 5-HT. In contrast, 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenergic receptor antagonists, as well as 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, were able to prevent the increase in 5-HT and glutamate elicited by MK-801 [62]. In the present study we set out to replicate such findings using a wider range of concentrations and extend them to other typical (chlorpromazine) and atypical (olanzapine) antipsychotic drugs. To this end, intracerebral microdialysis in the mPFC was used under the same experimental conditions described previously [18, 63]. The choice of prefrontal cortex was accounted for by its pivotal involvement in higher brain functions such as executive tasks and cognition [66] known to be disrupted in schizophrenia [67] and in animal models [68]. Despite the importance of mPFC in the etiology and pharmacotherapy of schizophrenia, it is worth noting that the effects of such compounds in other brain regions may also be crucial for the treatment of the illness. From a methodological point of view it is also important to note that antipsychotic drugs and selective compounds were delivered in the mPFC by reverse dialysis. Despite the *in vitro* affinity ( $10^{-8}$ - $10^{-9}$  M) of antipsychotics and selective compounds used in the present study for serotonergic and adrenergic receptors, the use of concentrations in the micromolar range is required in *in vivo* microdialysis to significantly affect neurotransmitter receptors (e.g. [69, 70]). This is due to the fact that effective concentration at receptors is limited by the low application rate (in the low nmol/h range) and the continuous clearance of the applied drug by the cerebrospinal fluid. Moreover, a substantial number of post-synaptic receptors in mPFC neurons must be recruited to activate/inhibit the mPFC-raphé circuit and elicit changes in mPFC 5-HT release [71, 130].

### **IS CORTICAL 5-HT TRANSMISSION RELATED TO “ATYPICALITY”?**

The term “atypical” referred to an antipsychotic drug was first applied to clozapine because this drug was devoid of the overt EPS and increased prolactin secretion seen in humans treated with neuroleptics. By comparison with the pharmacological profile of clozapine, it is considered that atypical antipsychotic drugs are relatively more potent serotonin 5-HT<sub>2A</sub> antagonists than dopamine D<sub>2</sub> antagonists (see [39] for review). More recently, the multi-receptor pharmacology of atypical antipsychotics has included other features such as serotonin 5-HT<sub>1A</sub> and dopamine D<sub>1</sub> agonism, dopamine D<sub>2</sub> partial agonism as well as  $\alpha_1$ -adrenergic antagonism [46, 53, 72, 73].

The effects of antipsychotic drugs on extracellular 5-HT in the mPFC are far from conclusive [18, 61, 74, 75]. In general, both typical and atypical antipsychotics seem to decrease or leave unchanged cortical 5-HT although the particular effect might depend on the experimental conditions and/or dose of the drug. However, there seems to be a concurrence of results showing that risperidone increases cortical dialysate 5-HT, an effect which is probably related to its antagonistic action at  $\alpha_2$ -adrenoceptor, and seems to take place at the nerve terminal level [74]. In line with this assumption, Hertel and coworkers [76]

demonstrated that idazoxan, an  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonist, in combination with raclopride (dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> receptor antagonist), exerted a clozapine-like antipsychotic effect on phencyclidine-treated animals. Thus, the role of mPFC 5-HT in the mechanism of action of atypical antipsychotic drugs appears equivocal. Nevertheless, a different issue that has been addressed in the present study is the role of cortical 5-HT in the action of antipsychotics in an animal model of schizophrenia.

Previous studies have demonstrated that NMDA receptor antagonists augment the firing rate of putative pyramidal neurons within the mPFC [65, 77, 78], which results in an increased efflux of glutamate and 5-HT. These effects are accounted for by an overstimulation of cortical AMPA-dependent glutamatergic transmission because they were abolished by intra-mPFC perfusion of an AMPA receptor antagonist [18, 79]. In line with previous research [8, 14, 15], MK-801 increases glutamate release onto AMPA/kainate receptors leading to an enhanced glutamatergic output from mPFC neurons (including those projecting to the dorsal raphe nucleus) thereby increasing serotonergic cell firing and cortical 5-HT release. Furthermore, it has been shown that blockade of AMPA/kainate receptors in the prefrontal cortex inhibited PCP-induced locomotion and stereotypy [80]. The antipsychotic action would therefore result from a prevention of the effects resulting from this cortical hyperglutamatergia.

In an initial study carried out in our lab we showed that pretreatment with atypical antipsychotic drugs such as clozapine and olanzapine suppressed the increased release of 5-HT in the mPFC elicited by phencyclidine (PCP) and ketamine whereas haloperidol failed to do so [22]. Subsequently we demonstrated that clozapine and haloperidol were able to block the increase in cortical glutamate produced by MK-801, but only clozapine reduced the increase in 5-HT [18]. In addition, the mPFC appeared to be the preferential site of action of these drugs inasmuch as their effects were seen after local infusion through a dialysis probe. As shown in Fig. (1), this differential action has been replicated and confirmed also for chlorpromazine (typical antipsychotic) and olanzapine (atypical antipsychotic). The fact that all four antipsychotic drugs tested are able to block the effect of MK-801 on extracellular glutamate is in line with recent results showing that both clozapine and haloperidol possess the ability to markedly inhibit a subset of mPFC neurons [64]. The most prominent features of the pharmacological profile shared by these antipsychotics are dopamine D<sub>2</sub> receptor and  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonism [44, 45, 52, 81-83]. However, since prazosin can also prevent the increase in dialysate 5-HT produced by NMDA antagonists ([22]; Fig. (7) of this study), it was suggested that glutamatergic transmission in the mPFC is predominantly dependent on dopamine D<sub>2</sub> receptors, but not on  $\alpha_1$ -adrenoceptors. Unlike the actions of clozapine and olanzapine, the lack of effect of haloperidol and chlorpromazine on cortical 5-HT points to a different regulation of the pyramidal cells projecting to the dorsal raphe nucleus (DR). Because only 5% of pyramidal neurons in layer V of the mPFC project to the dorsal raphe nucleus [84], it is conceivable that, under conditions of increased 5-HT and glutamate transmission in the mPFC following the administration of NMDA antagonists,

blockade of D2 receptors by antipsychotic drugs might be able to inhibit cortical output (blockade of increased glutamate efflux), although sparing mPFC → DR projections. An alternative explanation could be that cortico-raphe projecting neurons might be inhibited by both typical antipsychotics, but not to the extent needed to suppress serotonergic firing distally in the DR and the subsequent cortical 5-HT release. On the other hand, we hypothesized that 5-HT concentration in the mPFC appears to be under the control of multiple monoamine receptors, which is coincident with the multi-receptor profile of atypical antipsychotics.

### **EFFECTS OF DOPAMINERGIC COMPOUNDS**

In accord with our hypothesis, we have shown that two different dopamine D2 receptor antagonists, raclopride and eticlopride, elicited the same effect than that of haloperidol and chlorpromazine ([62]; present study). Raclopride binds with equal affinity to D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> receptors and has negligible affinity for D<sub>4</sub> receptors [85], and eticlopride possesses equal selectivity for D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> receptors [86], but 10-fold greater affinity than raclopride for both receptors [87]. Eticlopride also interacts with D<sub>4</sub> receptors [83]. It could be argued that the lack of effect of D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> antagonists on cortical 5-HT can be accounted for by the low concentration of antagonists used. However, as shown in Fig (2), a higher concentration of raclopride (100 μM) produced similar results, i.e. blockade of MK-801-induced effects on glutamate but not on 5-HT. Differences in the receptor populations present in layer V of the mPFC and the distinct pharmacological profile of clozapine, olanzapine, chlorpromazine and haloperidol (Table 1), could provide the anatomical substrate for this differential effect. Altogether, it appears that serotonergic transmission in the mPFC is regulated by the concurrent participation of multiple transmitter receptors, whereas glutamatergic transmission is strongly dependent on dopamine D2 receptor activation. Further evidence of the regulation of glutamate release in the mPFC by dopamine D2 receptors is provided by electrophysiological studies. Thus, the augmented efflux of dopamine elicited by the blockade of NMDA receptors [11, 19, 88] may promote dopamine D2-induced burst firing only in a small subset of pyramidal cells of the mPFC [89], possibly in those cells enriched in dopamine D2 receptors. However, dopamine D2 receptors are located not only in pyramidal cells, but also in GABA interneurons [90-93]. Further, tyrosine hydroxylase-positive terminals have been observed in apposition with GABA interneurons [94, 95]. Among the different types of cortical GABA interneurons, it has been shown that dopamine acts almost exclusively on those containing parvalbumin (PV) [92, 96], which target the perisomatic compartment of pyramidal cells [97, 98]. In addition, immunocytochemistry studies have reported that PV interneurons express both dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> receptors [92]. From a physiological viewpoint, dopamine exerts a tonic inhibitory action on PV interneurons through D2 receptors [99, 100]. In addition, evidence from a postmortem study has indicated that, in the anterior cingulate cortex of schizophrenics, there is a shift of dopaminergic terminals from pyramidal cells to GABA interneurons [101]. This dopamine could then act on

D2 receptors located in these interneurons thereby reducing the release of GABA with the subsequent disinhibition of pyramidal cells. In the animal model setting that we used, an excessive release of dopamine following MK-801 administration [19] might lead to a further reduction in GABAergic inhibition, which would result in an impairment of the intrinsic cortical circuitry. In fact, this has been postulated to occur in the brain of schizophrenics [102-104]. Dopamine D2 antagonists would dampen the inhibitory action of dopamine overflow on GABA interneurons, thus elevating GABA release and reducing cortical glutamatergic output induced by MK-801. The relevance of PV interneurons in this process is underscored by two facts: 1) in rodents 50% of all GABA neurons contain PV [105] and 2) PV neurons are thought to play a predominant role in gamma oscillations [106-108]. A subtype of dopamine D2 receptor that has received attention recently is the D<sub>4</sub> receptor. The dopamine D<sub>4</sub> receptor is of interest because of its localization in limbic structures associated with the regulation of mood and cognition, such as cerebral cortex and hippocampus [109, 110]. In addition, clozapine and olanzapine have significant affinities at the dopamine D<sub>4</sub> receptor (Table 1), which supports the role of this receptor as a potential target for antipsychotic drugs. For these reasons, it was deemed of importance to examine the effects of a dopamine D<sub>4</sub> receptor antagonist (L-745,870) on the MK-801-induced increases in cortical 5-HT and glutamate. Intracortical pretreatment with L-745,870 prevented the effects of MK-801 on glutamate, but not those on 5-HT (Fig (3)). Although there is histological evidence of the presence of dopamine D<sub>4</sub> receptors in the mPFC of rodents, controversy exists as regards to the level of expression [91, 111-115]. There is consensus, however, that the prefrontal cortex depicts a prominent expression of this receptor [91, 110, 114, 115], which is expressed in both pyramidal and GABAergic cells [91, 110, 114]. Our results are consistent with a localization of dopamine D<sub>4</sub> receptors in GABAergic interneurons although it remains to be determined the phenotype of such cells.

The regulation of prefrontal function by dopamine involves not only D2, but also D1 receptors. In fact, dopamine D1 agonists enhance cortical dopaminergic transmission, which is postulated to be good against cognitive and negative symptoms [116]. Indeed, the systemic administration of a low dose of a dopamine D1 receptor agonist ameliorates cognitive dysfunction induced by MK-801 although increases stereotypy and locomotor activity (model of psychotic symptoms) at higher doses [117]. Our results show that dopamine D1 agonism elicits comparable effects to those of dopamine D2 antagonists, i.e. a reduction of MK-801-induced increase of cortical glutamate [62]. However, when the concentration of the dopamine D1 agonist, SKF-38393, was increased to 100 µM, the elevation of 5-HT elicited by MK-801 was abolished (Fig (4)). However, it remains to be determined the potential clinical relevance of this effect. Although dopamine D<sub>1</sub> receptors are expressed by deep layer cortical pyramidal neurons [93, 118, 119,], they are also localized to GABA-containing interneurons [92, 93, 119, 120]. Since the effect of SKF-38393 is difficult to reconcile with an action on excitatory D1 receptors located on pyramidal neurons, a more plausible explanation is that SKF-38393 would bind to dopamine D1

receptors of GABAergic neurons, thereby turning on GABAergic inhibition, which would block the increase in glutamate efflux induced by MK-801. The dopamine D1 receptor family is comprised of two subtypes: D<sub>1</sub> and D<sub>5</sub>. Inasmuch as the D<sub>1</sub> subtype seems to be predominant in cortical PV interneurons [120, 121], it is conceivable that, in the conditions of the present study, the blockade of MK-801-induced increase in cortical glutamate is accounted for by an action of SKF-38393 on D<sub>1</sub> receptors located in PV interneurons. However, the blockade of the effects on 5-HT might also suggest the presence of D<sub>1</sub> receptors in another subpopulation of GABAergic interneurons that influence mPFC output to the raphe nuclei (Fig (8)).

Altogether our results suggest that D2 antagonists and D1 agonists might end up with the same response, i.e. to restore cortical GABA efflux in order to prevent an excessive glutamatergic transmission following MK-801 administration. Furthermore, our results are also consistent with the proposal that D1 receptor activation requires phasic dopamine release whereas D2 receptors are continuously driven by basal, tonic dopamine release [122].

#### **EFFECTS OF SEROTONERGIC COMPOUNDS**

In contrast to dopamine D2 receptor antagonists, the selective 5-HT<sub>2A</sub> antagonist, M100907 [123], prevented the increase in 5-HT and glutamate elicited by MK-801 in a concentration-dependent manner (Fig (5)). This agrees with prior work using a competitive NMDA receptor antagonist [16] and could reflect a reduction of a heightened prefrontal output (including that projecting to the DR) following MK-801. In fact, at the concentration of 300 μM, M100907 decreased MK-801-induced 5-HT level below baseline values. Previous work from our lab has also shown that 5-HT<sub>2A</sub> antagonism is able to prevent other paradigms of higher serotonergic transmission in the mPFC, such as intra-mPFC perfusion of S- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-4-propionic acid (S-AMPA), 2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI) and the  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist cirazoline [59, 124], as well as thalamic disinhibition [60]. 5-HT<sub>2A</sub> receptors are largely localized to apical dendrites of pyramidal neurons [125, 126], a cellular zone that receives inputs from different cortical areas, allowing integration within cortical layers and between different cortical areas. For this reason, 5-HT<sub>2A</sub> antagonists are in a unique position to compensate for the increased cortico-cortical transmission that probably occurs after MK-801 administration and the pharmacological conditions mentioned above. Although there is evidence that 5-HT<sub>2A</sub> receptors are also present in cortical GABAergic interneurons of the rat mPFC [125, 127], our results points to a predominant effect of M100907 on the population of receptors located in pyramidal neurons following MK-801 administration.

Besides 5-HT<sub>2A</sub> receptor antagonism, 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonism is also able to block the increase in 5-HT and glutamate elicited by MK-801 with a comparable potency (Fig (6)). Another study has shown that the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT also prevents the increase in cortical 5-HT and glutamate evoked by a competitive NMDA antagonist [17]. As



for the effects of M100907, the reduction of 5-HT is probably caused by a decrease in the activity of pyramidal cells projecting to the DR [128, 129], which would ease this nucleus from a tonic excitatory input, thereby decreasing the activity of 5-HT cells [130]. The 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist repinotan (BAY x 3702) [131] has proved also effective in blocking the increased 5-HT release induced by intra-mPFC perfusion of S-AMPA, DOI and cirazoline [59, 124], as well as thalamic disinhibition [60]. The additional blockade of increased glutamatergic transmission suggests that 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation in the mPFC potently attenuates the action of agents that enhance the activity of pyramidal neurons, an effect shared by several different treatments and involving the stimulation of AMPA/kainate receptors in the mPFC [18, 79]. Furthermore, the crucial localization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the perisomatic domain of cortical pyramidal neurons of the rat prefrontal cortex [132] might explain the powerful effects of 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists. Both 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors show a ~80% co-localization in the mPFC [124] with a high level of expression in pyramidal cells labeled by vGluT1 [127]. Altogether, this provides the anatomical support for an action of serotonergic compounds on pyramidal cells of the mPFC. Although 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>1A</sub> receptors are also expressed in cortical GABAergic interneurons of the rat [125, 127, 133], they do not seem to play a role in the control of cortical 5-HT and glutamate in the conditions of the present work.

#### **EFFECTS OF $\alpha_1$ -ADRENOCEPTOR ANTAGONISTS**

As for 5-HT<sub>2A</sub> antagonists and 5-HT<sub>1A</sub> agonists, the intra-mPFC administration of the  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist prazosin [134] also blocked the MK-801-induced increase in 5-HT and glutamate (Fig (7)). Although  $\alpha_1$ -adrenoceptors are largely co-expressed with 5-HT<sub>2A</sub> receptors (>80%) and are localized to both pyramidal and GABAergic cells (N. Santana, G. Mengod and F. Artigas, unpublished results) in the mPFC, the effects of prazosin seen in previous [62] and the present study are more congruous with a blockade of  $\alpha_1$ -adrenoceptors located on pyramidal neurons, including those in layer V that project to the dorsal raphe nucleus. The mechanism of action of prazosin is most likely similar to that of M100907 inasmuch as both 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenoceptors are coupled to the same intracellular signaling mechanisms (phospholipase C) and mediate the excitatory actions of 5-HT and noradrenaline on pyramidal neurons of the mPFC [128, 135]. Moreover, the fact that 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenoceptors are localized to the same cortical areas [136-138] provides a neuroanatomical support for the parallel action of 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists. The main difference in the cortical laminar distribution between 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors is that the latter are separated in two bands around layer V [139, 140]. In line with the present work, previous studies carried out in our laboratory have revealed that the perfusion of prazosin in the mPFC prevented the increase of 5-HT elicited by the cortical application of cirazoline, DOI and S-AMPA [60], as well as thalamic disinhibition [60]. Because all these compounds do not interact directly with each other's receptors their effects need to be interpreted not at receptorial level, but at cellular (pyramidal) level. This is

correspondence with the role of pyramidal cells of the mPFC in integrating multiple inputs from cortical as well as subcortical areas [141-143].

### **IMPLICATIONS FOR ANTIPSYCHOTIC ACTION**

The findings of the present and previous [18, 62] work from our laboratory suggest that excessive glutamate transmission in the mPFC (resulting from NMDA receptor blockade) may be associated with some positive symptoms of schizophrenia, inasmuch as they are better treated by drugs that possess some degree of dopamine D2 receptor antagonism (a characteristic of the great majority of marketed antipsychotic drugs). In contrast, impairment of serotonergic pathways in the mPFC might rather be related to negative symptoms and/or cognitive deficits, conditions for which atypical antipsychotic drugs (e.g. clozapine and olanzapine) seem to display superior therapeutic efficacy. However, several recent studies have somehow challenged this purported higher efficacy in the clinic. Thus, the Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) study has shown that the typical drug perphenazine is as effective as other atypical drugs in terms of PANSS scores. However, olanzapine was the medication that patients stayed on the longest in the trial [144]. In similar terms, the Cost Utility of the Latest Antipsychotics in Severe Schizophrenia (CUtLASS) study also concluded that second-generation (atypical) antipsychotics do not offer significant clinical benefits over first-generation (typical) drugs when prescribed to patients with schizophrenia [145]. Altogether these studies illustrate the difficulty of translating from experimentally-observable pharmacological differences in the preclinical setting to therapeutic advantages.

Thus, there is a clear need for targeting different transmitter receptors in order to achieve better treatment (as well as a lower side-effect profile) of schizophrenia. Pharmacological models of schizophrenia based on NMDA antagonism, dopaminergic stimulants or serotonergic agonists point to an exacerbated glutamatergic transmission, at least in the mPFC. Our results suggest that, antagonism at 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors, as well as agonism at 5-HT<sub>1A</sub> receptors, are able to prevent the excessive glutamatergic transmission in the mPFC produced by such different conditions. In line with these results, it has been shown that 5-HT and selective receptor agonists modulate the excitability of cortical neurons and their discharge rate through the activation of several receptor subtypes: namely 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A/2C</sub> and 5-HT<sub>3</sub> [128, 146-152]. Atypical antipsychotic drugs that exhibit 5-HT<sub>2A</sub> antagonism and/or 5-HT<sub>1A</sub> agonism, such as clozapine, increase dopamine efflux in the mPFC of rodents [57, 153-157], which is potentially involved in the improvement of negative symptoms and cognitive dysfunction in schizophrenia [154, 155, 158, 159]. This effect appears to be dependent on the presence of intact 5-HT<sub>1A</sub> receptors [57, 157]. Given that some of these drugs (e.g. olanzapine) do not depict affinity for 5-HT<sub>1A</sub> receptors (Table 1), it would seem that the 5-HT<sub>1A</sub> receptor has a permissive role in this action, rather than being directly responsible. However, the increase in dopamine efflux produced by atypical antipsychotic drugs, including olanzapine, is inhibited by the 5-HT<sub>1A</sub>

receptor antagonist WAY 100635 [155] and absent in 5-HT<sub>1A</sub> receptor knockout mice [57], which suggests a pivotal role for 5-HT<sub>1A</sub> agonism in some of the key properties desired for novel antipsychotic drugs. This concept is supported by clinical trials with partial 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonists, which report the ability of these compounds not only to reduce the incidence of EPS [46] but also to enhance some domains of cognitive function [47]. However, inconsistent results have been found depending on the antipsychotic drug and the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist used (reviewed in [160]).

With regard to  $\alpha_1$ -adrenoceptors, preclinical studies have revealed that the blockade of  $\alpha_1$ -adrenoceptors by prazosin potentiated the antipsychotic-like effect of dopamine D2 receptor antagonists [161]. In addition, all antipsychotic drugs used in this study display high *in vitro* affinity for  $\alpha_1$ -adrenoceptors (Table 1), which suggests a potential antipsychotic role of  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonism in the pharmacotherapy of schizophrenia. However, the use of drugs that possess a high  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonism *in vivo* is limited because their cardiovascular side-effects (hypotension, arrhythmia).

In summary, the intra-mPFC administration of M100907, repinotan and prazosin prevents MK-801-induced increase in 5-HT and glutamate, effects that are comparable to those obtained with clozapine and olanzapine [62; present study], and can be associated to a direct reduction the excitability of a subpopulation of pyramidal neurons in the mPFC (Fig (8)). Thus, it is possible that 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenergic receptor antagonism, as well as 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonism, may relate to a better treatment of most symptoms of schizophrenia. In fact, preclinical studies have shown that 5-HT<sub>2A</sub> antagonists and 5-HT<sub>1A</sub> agonists can alleviate cognitive deficits induced by NMDA receptor antagonists [61]. Because each of these receptor components do not confer antipsychotic properties individually, it is conceivable that a combined effect is necessary to achieve this goal.

In a recent work, Homayoun and Moghaddam demonstrated that clozapine has the unique feature of increasing the activity of putative pyramidal neurons with low baseline firing rates and decreasing the activity of neurons with higher firing rates in prefrontal cortex [64]. Given that antagonists at D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> receptors and a dopamine D1 receptor antagonist are all able to increase basal extracellular glutamate on their own (Table 2), but they prevent the increase of glutamate release evoked by MK-801, the dual effect of clozapine can result from its interaction with such monoamine receptors, and this might be related to the pro-cognitive effects of the drug. It would be interesting to examine whether this effect of clozapine is shared by other atypical antipsychotic drugs with a similar pharmacological profile.

Unlike serotonergic and adrenergic compounds, the effects of dopaminergic compounds have been attributed to an increase in cortical inhibition responsible for a reduction of an excessive glutamatergic stimulation following NMDA antagonism ([62; present study). This implies the localization of dopamine D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>, D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> and D<sub>4</sub> receptors in a subpopulation of GABA interneurons (possibly those containing PV). Interestingly, the finding that a high concentration of the SKF 38393 is also able to prevent the MK-801-

induced increase of cortical 5-HT seems to suggest that D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> receptors are also located in a different set of GABA interneurons, perhaps those containing cholecystinin [162, 163]. Clozapine has been shown to enhance dopamine D1 receptor-mediated neurotransmission [72, 164]. Therefore, the pro-cognitive action of clozapine could also result from its action on dopamine D1 receptors. Alternatively, it has also been suggested that the action of clozapine could involve potentiation of NMDA transmission (see [165] for review). Our results support a similar view for olanzapine. On the other hand, blockade of dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> receptors may be in the front line of the pharmacological treatment of schizophrenia because dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> antagonists would increase GABA inhibition directly, thus restoring cortical synchrony.

The conclusions raised in previous [62] and the present study are established as a result of the analogies present in the action of antipsychotic drugs and selective agonists and antagonists for monoaminergic receptors. However, it remains to be determined if different effects may emerge from a combination of multiple interactions among these receptors. Furthermore, as a general rule for psychiatric illnesses, caution must be taken in extrapolating the results obtained in an animal model to a clinical setting.

#### **FUTURE TRENDS**

From the beginning of pharmacotherapy of schizophrenia, medicine cases have been filled with drugs that shared the characteristic of being dopamine D2 receptor antagonists. First generation typical antipsychotics like haloperidol and chlorpromazine potently block dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>/D<sub>4</sub> and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors. The blockade of dopamine D2 receptors in the PFC and the nucleus accumbens appears to be beneficial for psychotic symptoms (delusions, hallucinations). However, the same action in other areas of the brain can cause severe EPS and hyperprolactinemia [33]. Second generation atypical antipsychotic drugs like clozapine and olanzapine keep some degree of dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>/D<sub>4</sub> antagonism, but they display a higher antagonism at 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptors. These features seem to be more effective for negative symptoms and cognitive deficits although some side-effects (weight gain, impairment of glucose and lipid metabolism) may appear [166]. However, this group of drugs is not homogeneous, and a recent meta-analysis of randomized controlled trials has shown that only four of these second-generation drugs (amisulpride, clozapine, olanzapine and risperidone) were better than first-generation antipsychotic drugs for overall efficacy [167]. The other second-generation drugs (quetiapine, sertindole, ziprasidone, zotepine) were not more efficacious than the first-generation drugs, even for negative symptoms. Therefore, efficacy on negative symptoms does not seem to be a core component of atypicality. Third generation antipsychotic drugs like aripiprazole and bifeprunox improve both positive and negative symptoms of schizophrenia without producing EPS or increases in serum prolactin [168, 169]. The unifying features of this third generation antipsychotics are the association of D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> interaction (antagonism or partial agonism) with 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation without the requirement for 5-HT<sub>2A</sub> receptor blockade. More recently it has been

shown that drugs that interact with mGluR also have potential for the treatment of schizophrenia [37, 170, 171]. However, a significant proportion of patients still do not experience complete remission of their positive symptoms and negative/cognitive symptoms remain poorly treated. In recent years, research and development efforts have sought novel "atypical" antipsychotic drugs that would offer the therapeutic advantages of clozapine without the associated risk of side effects.

In the search for reliable biomarkers to be used in R+D of newer drugs, our results first suggest that the blockade of an exacerbated 5-HT release in the mPFC induced by NMDA antagonists can be a useful biochemical marker of "atypicality" of antipsychotic drugs. Although this has been established for clozapine and olanzapine (drugs that display a similar pharmacological profile), further research is needed to determine whether this is a distinct feature of other second generation antipsychotic drugs and, most interestingly, if this holds also true for third generation antipsychotics (which represents receptor mechanisms that include dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> receptor partial agonism).

GABAergic interneurons in prefrontal cortex play a critical role in cortical circuits by providing feedforward and feedback inhibition and synchronizing neuronal activity [172, 173]. In this regard, we also propose that blockade of dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>/D<sub>4</sub> as well as dopamine D<sub>1</sub> agonism in the mPFC may lead to a restoration of cortical GABA inhibition and synchrony alleged to be impaired in schizophrenia [102-104, 174]. Further support for this hypothesis has been obtained recently in our lab showing that both clozapine and haloperidol have the ability of reverse the effects of PCP on pyramidal cell firing and cortical synchronization [65]. However, it is also possible that the same effect is caused by different mechanisms, i.e. blockade of dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>/D<sub>4</sub> receptors (haloperidol) or 5-HT<sub>2A</sub> receptors (clozapine). Further research is needed to verify such different alternatives.

On the other hand, antagonism at 5-HT<sub>2A</sub> and  $\alpha_1$ -adrenergic receptors, as well as agonism at 5-HT<sub>1A</sub> receptors may also be helpful by suppressing an excessive stimulation of pyramidal cells. One of the most important issues in this field is the fact that all these monoamine receptors implicated in the pharmacological treatment of schizophrenia are present in both pyramidal cells and GABA interneurons in the mPFC [93, 127]. Therefore, the question arises as to what factors determine the binding of a drug predominantly to one of these cellular populations. With this in mind, newer antipsychotics would target receptors responsible for stimulating cortical GABA inhibition and diminishing excessive excitability of pyramidal cells without the undesired effects of similar actions in other areas of the brain. In addition, the regulatory changes of the complex formed by 5-HT<sub>2A</sub> and mGluR2 receptors presumed to be involved in the altered cortical processes [175] also suggests that this receptor complex is a promising new target for the treatment of psychosis.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Spanish Ministry of Health (FIS Grant PI070111 to A.A.), the Spanish Ministry of Education and Science (Grant SAF 2007-62378 to F.A.), and the

Generalitat de Catalunya (SGR2005/00758). X.L.-G. is the recipient of a predoctoral fellowship from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). We gratefully acknowledge the skilful technical assistance of Leticia Campa and Verónica Paz. Thanks are also given to Bayer, Lundbeck and Pierre-Fabre for the generous supply of repinotan, citalopram and M100907, respectively.

## REFERENCES

- [1] Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1991; 148: 1301-1308.
- [2] Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr., Charney DS. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 1994; 51: 199-214.
- [3] Tamminga CA. Schizophrenia and glutamatergic transmission. *Crit Rev Neurobiol* 1998; 12: 21-36.
- [4] Lahti AC, Koffel B, LaPorte D, Tamminga CA. Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1995; 13: 9-19.
- [5] Lahti AC, Weiler MA, Tamara Michaelidis BA, Parwani A, Tamminga CA. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25: 455-467.
- [6] Malhotra AK, Pinals DA, Weingartner H, Sirocco K, Missar CD, Pickar D, Breier A. NMDA receptor function and human cognition: the effects of ketamine in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 1996; 14: 301-307.
- [7] Hertel P, Mathé JM, Nomikos GG, Iurlo M, Mathé AA, Svensson TH. Effects of D-amphetamine and phencyclidine on behavior and extracellular concentrations of neurotensin and dopamine in the ventral striatum and the medial prefrontal cortex of the rat. *Behav Brain Res* 1995; 72: 103-114.
- [8] Adams BW, Moghaddam B. Effect of clozapine, haloperidol, or M100907 on phencyclidine-activated glutamate efflux in the prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 2001; 50: 750-757.
- [9] Homayoun H, Stefani MR, Adams BW, Tamagan GD, Moghaddam B. Functional interaction between NMDA and mGlu5 receptors: effects on working memory, instrumental learning, motor behaviors, and dopamine release. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 1259-1269.
- [10] Ellenbroek BA. Treatment of schizophrenia: a clinical and preclinical evaluation of neuroleptic drugs. *Pharmacol Ther* 1993; 57: 1-78.
- [11] Moghaddam B, Adams BW. Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science* 1998; 281: 1349-1352.
- [12] Jentsch JD, Roth RH. The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1999; 20: 201-225.
- [13] Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH. Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 1999; 98: 427-436.
- [14] Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 1997; 17: 2921-2927.
- [15] Lorrain DS, Baccei CS, Bristow LJ, Anderson JJ, Varney MA. Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience* 2003; 117: 697-706.
- [16] Ceglia I, Carli M, Baviera M, Renoldi G, Calcagno E, Invernizzi RW. The 5-HT receptor antagonist M100,907 prevents extracellular glutamate rising in response to NMDA receptor blockade in the mPFC. *J Neurochem* 2004; 91: 189-199.
- [17] Calcagno E, Carli M, Invernizzi RW. The 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT prevents prefrontocortical glutamate and serotonin release in response to blockade of cortical NMDA receptors. *J Neurochem* 2006; 96: 853-8.
- [18] López-Gil X, Babot Z, Amargós-Bosch M, Suñol C, Artigas F, Adell A. Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801-increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32: 2087-2097.
- [19] Schmidt CJ, Fadayel GM. Regional effects of MK-801 on dopamine release: effects of competitive NMDA or 5-HT<sub>2A</sub> receptor blockade. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 1541-1549.
- [20] Adams B, Moghaddam B. Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. *J Neurosci* 1998; 18: 5545-5554.
- [21] Millan MJ, Brocco M, Gobert A, Joly F, Bervoets K, Rivet J, Newman-Tancredi A, Audinot V, Maurel S. Contrasting mechanisms of action and sensitivity to antipsychotics of phencyclidine versus amphetamine: importance of nucleus accumbens 5-HT<sub>2A</sub> sites for PCP-induced locomotion in the rat. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 4419-4432.
- [22] Amargós-Bosch M, López-Gil X, Artigas F, Adell A. Clozapine and olanzapine, but not haloperidol, suppress serotonin efflux in the medial prefrontal cortex elicited by phencyclidine and ketamine. *Int J Neuropsychopharmacol* 2006; 9: 565-573.
- [23] Krystal JH, D'Souza DC, Mathalon D, Perry E, Belger A, Hoffman R. NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology* 2003; 169: 215-233.
- [24] Homayoun H, Moghaddam B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci* 2007; 27: 11496-11500.

- [25] Grunze HC, Rainnie DG, Hasselmo ME, Barkai E, Hearn EF, McCarley RW, Greene RW. NMDA-dependent modulation of CA1 local circuit inhibition. *J Neurosci* 1996; 16: 2034-2043.
- [26] Li Q, Clark S, Lewis DV, Wilson WA. NMDA receptor antagonists disinhibit rat posterior cingulate and retrosplenial cortices: a potential mechanism of neurotoxicity. *J Neurosci* 2002; 22: 3070-3080.
- [27] Hajós M. Targeting information-processing deficit in schizophrenia: a novel approach to psychotherapeutic drug discovery. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27: 391-398.
- [28] Andreasen NC, Rezaei K, Alliger R, Swayze VW, Flaum M, Kirchner P, Cohen G, O'Leary DS. Hypofrontality in neuroleptic-naive patients and in patients with chronic schizophrenia. Assessment with xenon 133 single-photon emission computed tomography and the Tower of London. *Arch Gen Psychiatry* 1992; 49: 943-958.
- [29] Siegel BV, Jr., Buchsbaum MS, Bunney WE, Jr., Gottschalk LA, Haier RJ, Lohr JB, Lottenberg S, Najafi A, Nuechterlein KH, Potkin SG. Cortical-striatal-thalamic circuits and brain glucose metabolic activity in 70 unmedicated male schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 1993; 150: 1325-1336.
- [30] Gur RE, Mozley PD, Resnick SM, Mozley LH, Shtasel DL, Gallacher F, Arnold SE, Karp JS, Alavi A, Reivich M. Resting cerebral glucose metabolism in first-episode and previously treated patients with schizophrenia relates to clinical features. *Arch Gen Psychiatry* 1995; 52: 657-667.
- [31] Norman RM, Malla AK, Morrison-Stewart SL, Helmes E, Williamson PC, Thomas J, Cortese L. Neuropsychological correlates of syndromes in schizophrenia. *Br J Psychiatry* 1997; 170: 134-139.
- [32] Abi-Dargham A, Mawlawi O, Lombardo I, Gil R, Martinez D, Huang Y, Hwang DR, Keilp J, Kochan L, Van Heertum R, Gorman JM, Laruelle M. Prefrontal dopamine D<sub>1</sub> receptors and working memory in schizophrenia. *J Neurosci* 2002; 22: 3708-3719.
- [33] Kapur S, Zipursky R, Jones C, Remington G, Houle S. Relationship between dopamine D<sub>2</sub> occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am J Psychiatry* 2000; 157: 514-520.
- [34] Seeman P, Lee T, Chau-Wong M, Wong K. Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 1976; 261: 717-719.
- [35] Creese I, Burt DR, Snyder SH. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1996; 8: 223-226.
- [36] Kapur S, Mamo D. Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D<sub>2</sub> receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27: 1081-1090.
- [37] Patil ST, Zhang L, Martenyi F, Lowe SL, Jackson KA, Andreev BV, Avedisova AS, Bardenstein LM, Gurovich IY, Morozova MA, Mosolov SN, Neznanov NG, Reznik AM, Smulevich AB, Tochilov VA, Johnson BG, Monn JA, Schoepp DD. Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nat Med* 2007; 13: 1102-1107.
- [38] Kapur S, Seeman P. Does fast dissociation from the dopamine D<sub>2</sub> receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. *Am J Psychiatry* 2001; 158: 360-369.
- [39] Meltzer HY. What's atypical about atypical antipsychotic drugs? *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 53-57.
- [40] Kapur S, Zipursky RB, Remington G. Clinical and theoretical implications of 5-HT<sub>2</sub> and D<sub>2</sub> receptor occupancy of clozapine, risperidone, and olanzapine in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 1999; 156: 286-293.
- [41] Abi-Dargham A, Moore H. Prefrontal DA transmission at D<sub>1</sub> receptors and the pathology of schizophrenia. *Neuroscientist* 2003; 9: 404-416.
- [42] Goldman-Rakic PS, Castner SA, Svensson TH, Siever LJ, Williams GV. Targeting the dopamine D<sub>1</sub> receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology* 2004; 174: 3-16.
- [43] Okubo Y, Suhara T, Suzuki K, Kobayashi K, Inoue O, Terasaki O, Someya Y, Sassa T, Sudo Y, Matsushima E, Iyo M, Tateno Y, Toru M. Decreased prefrontal dopamine D<sub>1</sub> receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature* 1997; 385: 634-636.
- [44] Bymaster FP, Calligaro DO, Falcone JF, Marsh RD, Moore NA, Tye NC, Seeman P, Wong DT. Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacology* 1996; 14: 87-96.
- [45] Schotte A, Janssen PF, Gommeren W, Luyten WH, Van Gompel P, Lesage AS, De Loore K, Leysen JE. Risperidone compared with new and reference antipsychotic drugs: in vitro and in vivo receptor binding. *Psychopharmacology* 1996; 124: 57-73.
- [46] Millan MJ. Improving the treatment of schizophrenia: focus on serotonin (5-HT)<sub>1A</sub> receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295: 853-861.
- [47] Sumiyoshi T, Matsui M, Yamashita I, Nohara S, Kurachi M, Uehara T, Sumiyoshi S, Sumiyoshi C, Meltzer HY. The effect of tandospirone, a serotonin(1A) agonist, on memory function in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2001; 49: 861-868.
- [48] McCreary AC, Glennon JC, Ashby CR, Jr., Meltzer HY, Li Z, Reinders JH, Hesselink MB, Long SK, Herremans AH, van Stuijvenberg H, Feenstra RW, Kruse CG. SLV313 (1-(2,3-dihydro-benzo[1,4]dioxin-5-yl)-4-[5-(4-fluoro-phenyl)-pyridin-3-ylmethyl]-piperazine monohydrochloride): a novel dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonist and 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist potential antipsychotic drug. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32: 78-94.
- [49] Jones CA, McCreary AC. Serotonergic approaches in the development of novel antipsychotics. *Neuropharmacology* 2008; 55: 1056-1065.
- [50] Goff DC, Midha KK, Brotman AW, McCormick S, Waites M, Amico ET. An open trial of buspirone added to neuroleptics in schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol* 1991; 11: 193-197.
- [51] Moss LE, Neppe VM, Drevets WC. Buspirone in the treatment of tardive dyskinesia. *J Clin Psychopharmacol* 1993; 13: 204-209.
- [52] Arnt J, Skarsfeldt T. Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. *Neuropsychopharmacology* 1998; 18: 63-101.
- [53] Svensson TH. Alpha-adrenoceptor modulation hypothesis of antipsychotic atypicality. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003; 27: 1145-1158.
- [54] Alsene KM, Carasso BS, Connors EE, Bakshi VP. Disruption of prepulse inhibition after stimulation of central but not peripheral  $\alpha$ -1 adrenergic receptors. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 2150-2161.

- [55] Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology* 2001; 156: 117-154.
- [56] Li XM, Perry KW, Wong DT, Bymaster FP. Olanzapine increases in vivo dopamine and norepinephrine release in rat prefrontal cortex, nucleus accumbens and striatum. *Psychopharmacology* 1998; 136: 153-161.
- [57] Díaz-Mataix L, Scorza MC, Bortolozzi A, Toth M, Celada P, Artigas F. Involvement of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action. *J Neurosci* 2005; 25: 10831-10843.
- [58] Duncan GE, Leipzig JN, Mailman RB, Lieberman JA. Differential effects of clozapine and haloperidol on ketamine-induced brain metabolic activation. *Brain Res* 1998; 812: 65-75.
- [59] Amargós-Bosch M, Adell A, Bortolozzi A, Artigas F. Stimulation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors in the rat medial prefrontal cortex increases the local *in vivo* 5-hydroxytryptamine release: reversal by antipsychotic drugs. *J Neurochem* 2003; 87: 831-842.
- [60] Amargós-Bosch M, Adell A, Artigas F. Antipsychotic drugs reverse the AMPA receptor-stimulated release of 5-HT in the medial prefrontal cortex. *J Neurochem* 2007; 102: 550-561.
- [61] Carli M, Baviera M, Invernizzi RW, Balducci C. Dissociable contribution of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the medial prefrontal cortex to different aspects of executive control such as impulsivity and compulsive perseveration in rats. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 757-7.
- [62] López-Gil X, Artigas F, Adell A. Role of different monoamine receptors controlling MK-801-induced release of serotonin and glutamate in the medial prefrontal cortex: relevance for antipsychotic action. *Int J Neuropsychopharmacol* 2009; 12: 487-499.
- [63] Abekawa T, Ito K, Koyama T. Role of the simultaneous enhancement of NMDA and dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated neurotransmission in the effects of clozapine on phencyclidine-induced acute increases in glutamate levels in the rat medial prefrontal cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 374: 177-193.
- [64] Homayoun H, Moghaddam B. Fine-tuning of awake prefrontal cortex neurons by clozapine: comparison with haloperidol and N-desmethylclozapine. *Biol Psychiatry* 2007; 61: 679-687.
- [65] Kargieman L, Santana N, Mengod G, Celada P, Artigas F. Antipsychotic drugs reverse the disruption in prefrontal cortex function produced by NMDA receptor blockade with phencyclidine. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 14843-14848.
- [66] Fuster JM. The prefrontal cortex-an update: time is of the essence. *Neuron* 2001; 30: 319-333.
- [67] Lewis DA, Lieberman JA. Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 2000; 28: 325-334.
- [68] Celada P, Castañé A, Adell A, Artigas F. Modeling schizophrenia in experimental animals. In: Buschmann H, Díaz JL, Holenz J, Párraga A, Torrens A, Vela JM (Eds) *Antidepressants, Antipsychotics, Anxiolytics. From Chemistry and Pharmacology to Clinical Application*, Vol 1. Weinheim, Wiley-VCH. 2007; 449-489.
- [69] Hervás I, Queiroz CM, Adell A, Artigas F. Role of uptake inhibition and autoreceptor activation in the control of 5-HT release in the frontal cortex and dorsal hippocampus of the rat. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 160-166.
- [70] West AR, Grace AA. Opposite influences of endogenous dopamine D1 and D2 receptor activation on activity states and electrophysiological properties of striatal neurons: studies combining *in vivo* intracellular recordings and reverse microdialysis. *J Neurosci* 2002; 22: 294-304.
- [71] Martín-Ruiz R, Puig MV, Celada P, Shapiro DA, Roth BL, Mengod G, Artigas F. Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. *J Neurosci* 2001; 21: 9856-9866.
- [72] Oerther S, Ahlenius S. Atypical antipsychotics and dopamine D<sub>1</sub> receptor agonism: an *in vivo* experimental study using core temperature measurements in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 292: 731-736.
- [73] Roth BL, Sheffler D, Potkin SG. Atypical antipsychotic drug actions: unitary or multiple mechanisms for "atypicality"? *Clin Neurosci Res* 2003; 3: 108-117.
- [74] Hertel P, Nomikos GG, Schilström B, Arborelius L, Svensson TH. Risperidone dose-dependently increases extracellular concentrations of serotonin in the rat frontal cortex: Role of  $\alpha_2$ -adrenoceptor antagonism. *Neuropsychopharmacology* 1997; 17: 44-55.
- [75] Ichikawa J, Kuroki T, Dai J, Meltzer HY. Effect of antipsychotic drugs on extracellular serotonin levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 1998; 351: 163-171.
- [76] Hertel P, Fagerquist MV, Svensson TH. Enhanced cortical dopamine output and antipsychotic-like effects of raclopride by  $\alpha_2$  adrenoceptor blockade. *Science* 1999; 286: 105-107.
- [77] Suzuki Y, Jodo E, Takeuchi S, Niwa S, Kayama Y. Acute administration of phencyclidine induces tonic activation of medial prefrontal cortex neurons in freely moving rats. *Neuroscience* 2002; 114: 769-779.
- [78] Jackson ME, Homayoun H, Moghaddam B. NMDA receptor hypofunction produces concomitant firing rate potentiation and burst activity reduction in the prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 8467-8472.
- [79] Katayama T, Jodo E, Suzuki Y, Hoshino KY, Takeuchi S, Kayama Y. Activation of medial prefrontal cortex neurons by phencyclidine is mediated via AMPA/kainate glutamate receptors in anesthetized rats. *Neuroscience* 2007; 150: 442-448.
- [80] Takahata R, Moghaddam B. Activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex sustains the motoric and dopaminergic effects of phencyclidine. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 1117-1124.
- [81] Seeger TF, Seymour PA, Schmidt AW, Zorn SH, Schulz DW, Lebel LA, McLean S, Guanowsky V, Howard HR, Lowe JA, III. Ziprasidone (CP-88,059): a new antipsychotic with combined dopamine and serotonin receptor antagonist activity. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275: 101-113.
- [82] Roth BL, Tandra S, Burgess LH, Sibley DR, Meltzer HY. D4 dopamine receptor binding affinity does not distinguish between typical and atypical antipsychotic drugs. *Psychopharmacology* 1995; 120: 365-368.
- [83] Lawler CP, Prioleau C, Lewis MM, Mak C, Jiang D, Schetz JA, Gonzalez AM, Sibley DR, Mailman RB. Interactions of the novel antipsychotic aripiprazole (OPC-14597) with dopamine and serotonin receptor subtypes. *Neuropsychopharmacology* 1999; 20: 612-627.



- [84] Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ. Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 2005; 492: 145-177.
- [85] Strange PG. Antipsychotic drugs: importance of dopamine receptors for mechanisms of therapeutic actions and side effects. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 119-133.
- [86] Tang L, Todd RD, Heller A, O'Malley KL. Pharmacological and functional characterization of D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> and D<sub>4</sub> dopamine receptors in fibroblast and dopaminergic cell lines. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 268: 495-502.
- [87] Assié MB, Dominguez H, Consul-Denjean N, Newman-Tancredi A. In vivo occupancy of dopamine D2 receptors by antipsychotic drugs and novel compounds in the mouse striatum and olfactory tubercles. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 373: 441-450.
- [88] Mathé JM, Nomikos GG, Blakeman KH, Svensson TH. Differential actions of dizocilpine (MK-801) on the mesolimbic and mesocortical dopamine systems: role of neuronal activity. *Neuropharmacology* 1999; 38: 121-128.
- [89] Wang Y, Goldman-Rakic PS. D2 receptor regulation of synaptic burst firing in prefrontal cortical pyramidal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 5093-5.
- [90] Vincent SL, Khan Y, Benes FM. Cellular colocalization of dopamine D1 and D2 receptors in rat medial prefrontal cortex. *Synapse* 1995; 19: 112-120.
- [91] Khan ZU, Gutiérrez A, Martin R, Peñafiel A, Rivera A, De La Calle A. Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *J Comp Neurol* 1998; 402: 353-371.
- [92] Le Moine C, Gaspar P. Subpopulations of cortical GABAergic interneurons differ by their expression of D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> dopamine receptor subtypes. *Brain Res Mol Brain Res* 1998; 58: 231-236.
- [93] Santana N, Mengod G, Artigas F. Quantitative Analysis of the Expression of Dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>2</sub> Receptors in Pyramidal and GABAergic Neurons of the Rat Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex* 2008; Published online by Oxford University Press, 9 Aug 2008; doi:10.1093/cercor/bhn134.
- [94] Benes FM, Taylor JB, Cunningham MC. Convergence and plasticity of monoaminergic systems in the medial prefrontal cortex during the postnatal period: implications for the development of psychopathology. *Cereb Cortex* 2000; 10: 1014-1027.
- [95] Sesack SR, Hawrylak VA, Melchitzky DS, Lewis DA. Dopamine innervation of a subclass of local circuit neurons in monkey prefrontal cortex: ultrastructural analysis of tyrosine hydroxylase and parvalbumin immunoreactive structures. *Cereb Cortex* 1998; 8: 614-622.
- [96] Gorelova N, Seamans JK, Yang CR. Mechanisms of dopamine activation of fast-spiking interneurons that exert inhibition in rat prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 2002; 88: 3150-3166.
- [97] Benes FM, Berretta S. GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 2001; 25: 1-27.
- [98] De Felipe J. Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res* 2002; 136: 215-238.
- [99] Seamans JK, Gorelova N, Durstewitz D, Yang CR. Bidirectional dopamine modulation of GABAergic inhibition in prefrontal cortical pyramidal neurons. *J Neurosci* 2001; 21: 3628-3638.
- [100] Gao WJ, Wang Y, Goldman-Rakic PS. Dopamine modulation of perisomatic and peridendritic inhibition in prefrontal cortex. *J Neurosci* 2003; 23: 1622-1630.
- [101] Benes FM. Model generation and testing to probe neural circuitry in the cingulate cortex of postmortem schizophrenic brain. *Schizophr Bull* 1998; 24: 219-230.
- [102] Beasley CL, Zhang ZJ, Patten I, Reynolds GP. Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the presence of calcium-binding proteins. *Biol Psychiatry* 2002; 52: 708-715.
- [103] Benes FM. The role of stress and dopamine-GABA interactions in the vulnerability for schizophrenia. *J Psychiatr Res* 1997; 31: 257-275.
- [104] Egan MF, Weinberger DR. Neurobiology of schizophrenia. *Curr Opin Neurobiol* 1997; 7: 701-707.
- [105] Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 793-807.
- [106] Hájos N, Pálhalmi J, Mann EO, Németh B, Paulsen O, Freund TF. Spike timing of distinct types of GABAergic interneuron during hippocampal gamma oscillations in vitro. *J Neurosci* 2004; 24: 9127-9137.
- [107] Tukker JJ, Fuentealba P, Hartwich K, Somogyi P, Klausberger T. Cell type-specific tuning of hippocampal interneuron firing during gamma oscillations in vivo. *J Neurosci* 2007; 27: 8184-8189.
- [108] Gonzalez-Burgos G, Lewis DA. GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2008; 34: 944-961.
- [109] Lahti RA, Roberts RC, Conley RR, Cochrane EV, Mutin A, Tamminga CA. D2-type dopamine receptors in postmortem human brain sections from normal and schizophrenic subjects. *Neuroreport* 1996; 7: 1945-1948.
- [110] Mrzljak L, Bergson C, Pappy M, Huff R, Levenson R, Goldman-Rakic PS. Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature* 1996; 381: 245-248.
- [111] Defagot MC, Antonelli MC. Autoradiographic localization of the putative D4 dopamine receptor in rat brain. *Neurochem Res* 1997; 22: 401-407.
- [112] Defagot MC, Malchiodi EL, Villar MJ, Antonelli MC. Distribution of D4 dopamine receptor in rat brain with sequence-specific antibodies. *Brain Res Mol Brain Res* 1997; 45: 1-12.
- [113] Ariano MA, Wang J, Noblett KL, Larson ER, Sibley DR. Cellular distribution of the rat D4 dopamine receptor protein in the CNS using anti-receptor antisera. *Brain Res* 1997; 752: 26-34.
- [114] Wedzony K, Chocyk A, Mackowiak M, Fijał K, Czyrak A. Cortical localization of dopamine D<sub>4</sub> receptors in the rat brain--immunocytochemical study. *J Physiol Pharmacol* 2000; 51: 205-221.
- [115] Noain D, Avale ME, Wedemeyer C, Calvo D, Peper M, Rubinstein M. Identification of brain neurons expressing the dopamine D<sub>4</sub> receptor gene using BAC transgenic mice. *Eur J Neurosci* 2006; 24: 2429-2438.
- [116] Abi-Dargham A. Probing cortical dopamine function in schizophrenia: what can D1 receptors tell us? *World Psychiatry* 2003; 2: 166-171.
- [117] Bubenikova-Valesova V, Svoboda J, Horacek J, Vales K. The effect of a full agonist/antagonist of the D<sub>1</sub> receptor on locomotor activity, sensorimotor gating and cognitive function in dizocilpine-treated rats. *Int J Neuropsychopharmacol* ; Published online by Cambridge University Press, 2009 Jan 20; doi:10.1017/S1461145708009851.

- [118]Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS. Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D<sub>1</sub> and D<sub>5</sub> dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci* 1995; 15: 7821-7836.
- [119]Davidoff SA, Benes FM. High-resolution scatchard analysis shows D1 receptor binding on pyramidal and nonpyramidal neurons. *Synapse* 1998; 28: 83-90.
- [120]Glausier JR, Khan ZU, Muly EC. Dopamine D<sub>1</sub> and D<sub>5</sub> Receptors Are Localized to Discrete Populations of Interneurons in Primate Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex* 2008; Published online by Oxford University Press, November 19 2008; doi:10.1093/cercor/bhn212.
- [121]Muly EC, III, Szigeti K, Goldman-Rakic PS. D<sub>1</sub> receptor in interneurons of macaque prefrontal cortex: distribution and subcellular localization. *J Neurosci* 1998; 18: 10553-10565.
- [122]Grace AA. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 1991; 41: 1-24.
- [123]Kehne JH, Baron BM, Carr AA, Chaney SF, Elands J, Feldman DJ, Frank RA, van Giersbergen PL, McCloskey TC, Johnson MP, McCarty DR, Poirot M, Senyah Y, Siegel BW, Widmaier C. Preclinical characterization of the potential of the putative atypical antipsychotic MDL 100,907 as a potent 5-HT<sub>2A</sub> antagonist with a favorable CNS safety profile. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 968-981.
- [124]Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G, Artigas F. Co-expression and in vivo interaction of serotonin<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2A</sub> receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 2004; 14: 281-299.
- [125]Willins DL, Deutch AY, Roth BL. Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. *Synapse* 1997; 27: 79-82.
- [126]Cornea-Hébert V, Riad M, Wu C, Singh SK, Descarries L. Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the central nervous system of adult rat. *J Comp Neurol* 1999; 409: 187-209.
- [127]Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F. Expression of serotonin<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2A</sub> receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 2004; 14: 1100-1109.
- [128]Araneda R, Andrade R. 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub> and 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 1991; 40: 399-412.
- [129]Ashby CR, Jr., Edwards E, Wang RY. Electrophysiological evidence for a functional interaction between 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the rat medial prefrontal cortex: an iontophoretic study. *Synapse* 1994; 17: 173-181.
- [130]Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of serotonin-1A, GABA<sub>A</sub>, and glutamate receptors. *J Neurosci* 2001; 21: 9917-9929.
- [131]De Vry J, Schohe-Loop R, Heine HG, Greuel JM, Mauler F, Schmidt B, Sommermeyer H, Glaser T. Characterization of the aminomethylchroman derivative BAY x 3702 as a highly potent 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptor agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 1082-1094.
- [132]Czyrak A, Czepiel K, Mackowiak M, Chocyk A, Wedzony K. Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors might control the output of cortical glutamatergic neurons in rat cingulate cortex. *Brain Res* 2003; 989: 42-51.
- [133]Aznar S, Qian Z, Shah R, Rahbek B, Knudsen GM. The 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptor is located on calbindin- and parvalbumin-containing neurons in the rat brain. *Brain Res* 2003; 959: 58-67.
- [134]Schwinn DA, Johnston GI, Page SO, Mosley MJ, Wilson KH, Worman NP, Campbell S, Fidock MD, Furness LM, Parry-Smith DJ. Cloning and pharmacological characterization of human *alpha*-1 adrenergic receptors: sequence corrections and direct comparison with other species homologues. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272: 134-142.
- [135]Marek GJ, Aghajanian GK. 5-HT<sub>2A</sub> receptor or  $\alpha_1$ -adrenoceptor activation induces excitatory postsynaptic currents in layer V pyramidal cells of the medial prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol* 1999; 367: 197-206.
- [136]Day HE, Campeau S, Watson SJ, Jr., Akil H. Distribution of  $\alpha_{1a}$ ,  $\alpha_{1b}$ , and  $\alpha_{1d}$ -adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat* 1997; 13: 115-139.
- [137]Domyancic AV, Morilak DA. Distribution of  $\alpha_{1A}$  adrenergic receptor mRNA in the rat brain visualized by in situ hybridization. *J Comp Neurol* 1997; 386: 358-378.
- [138]Pieribone VA, Nicholas AP, Dagerlind A, Hökfelt T. Distribution of  $\alpha_1$  adrenoceptors in rat brain revealed by in situ hybridization experiments utilizing subtype-specific probes. *J Neurosci* 1994; 14: 4252-4268.
- [139]Jones LS, Gauger LL, Davis JN. Anatomy of brain  $\alpha_1$ -adrenergic receptors: in vitro autoradiography with [<sup>125</sup>I]-heat. *J Comp Neurol* 1985; 231: 190-208.
- [140]Palacios JM, Hoyer D, Cortés R.  $\alpha_1$ -Adrenoceptors in the mammalian brain: similar pharmacology but different distribution in rodents and primates. *Brain Res* 1987; 419: 65-75.
- [141]Kuroda M, Yokofujita J, Murakami K. An ultrastructural study of the neural circuit between the prefrontal cortex and the mediodorsal nucleus of the thalamus. *Prog Neurobiol* 1998; 54: 417-4.
- [142]Groenewegen HJ, Uylings HBM. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic function. *Progr Brain Res* 2000; 126: 3-28.
- [143]Heidbreder CA, Groenewegen HJ. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* 2003; 27: 555-579.
- [144]Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RSE, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, Severe J, Hsiao JK, Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) Investigators. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1209-1223.
- [145] Jones PB, Barnes TRE, Davies L, Dunn G, Lloyd H, Hayhurst KP, Murray RM, Markwick A, Lewis SW. Randomized controlled trial of the effect on quality of life of second- vs first-generation antipsychotic drugs in schizophrenia: Cost Utility of the Latest Antipsychotic Drugs in Schizophrenia Study (CUTLASS 1). *Arch Gen Psychiatry* 2006; 63: 1079-1087.
- [146]Ashby CR, Jr., Edwards E, Harkins K, Wang RY. Effects of ( $\pm$ )-DOI on medial prefrontal cortical cells: a microiontophoretic study. *Brain Res* 1989; 498: 393-396.
- [147]Tanaka E, North RA. Actions of 5-hydroxytryptamine on neurons of the rat cingulate cortex. *J Neurophysiol* 1993; 69: 1749-1757.

- [148]Aghajanian GK, Marek GJ. Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. *Neuropharmacology* 1997; 36: 589-599.
- [149]Arvanov VL, Liang X, Magro P, Roberts R, Wang RY. A pre- and postsynaptic modulatory action of 5-HT and the 5-HT<sub>2A,2C</sub> receptor agonist DOB on NMDA-evoked responses in the rat medial prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 1999; 11: 2917-2934.
- [150]Zhou FM, Hablitz JJ. Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex. *J Neurophysiol* 1999; 82: 2989-2999.
- [151]Férézou I, Cauli B, Hill EL, Rossier J, Hamel E, Lambolez B. 5-HT<sub>3</sub> receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystokinin interneurons. *J Neurosci* 2002; 22: 7389-7397.
- [152]Puig MV, Celada P, Díaz-Mataix L, Artigas F. In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT<sub>2A</sub> receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cereb Cortex* 2003; 13: 870-882.
- [153]Pehnek EA, Yamamoto BK. Differential effects of locally administered clozapine and haloperidol on dopamine efflux in the rat prefrontal cortex and caudate-putamen. *J Neurochem* 1994; 63: 2118-2124.
- [154]Rollema H, Lu Y, Schmidt AW, Zorn SH. Clozapine increases dopamine release in prefrontal cortex by 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation. *Eur J Pharmacol* 1997; 338: R3-R5.
- [155]Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, Fowler WL, O'Laughlin IA, Meltzer HY. 5-HT<sub>2A</sub> and D<sub>2</sub> receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. *J Neurochem* 2001; 76: 1521-1531.
- [156]Assié MB, Ravailhe V, Faucillon V, Newman-Tancredi A. Contrasting contribution of 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation to neurochemical profile of novel antipsychotics: frontocortical dopamine and hippocampal serotonin release in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 265-272.
- [157]Bortolozzi A, Díaz-Mataix L, Toth M, Celada P, Artigas F. In vivo actions of aripiprazole on serotonergic and dopaminergic systems in rodent brain. *Psychopharmacology* 2007; 191: 745-758.
- [158]Rollema H, Lu Y, Schmidt AW, Sprouse JS, Zorn SH. 5-HT<sub>1A</sub> receptor activation contributes to ziprasidone-induced dopamine release in the rat prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 2000; 48: 229-237.
- [159]Kuroki T, Meltzer HY, Ichikawa J. Effects of antipsychotic drugs on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 774-781.
- [160]Sumiyoshi T, Park S, Jayathilake K, Roy A, Ertugrul A, Meltzer HY. Effect of buspirone, a serotonin<sub>1A</sub> partial agonist, on cognitive function in schizophrenia: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Schizophr Res* 2007; 95: 158-168.
- [161]Wadenberg M-L, Hertel P, Fernholm R, Blakeman KH, Ahlenius S, Svensson TH. Enhancement of antipsychotic-like effects by combined treatment with the  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist prazosin and the dopamine D<sub>2</sub> receptor antagonist raclopride in rats. *J Neural Transm* 2000; 107: 1229-1238.
- [162]Freund TF, Katona I. Perisomatic inhibition. *Neuron* 2007; 56: 33-42.
- [163]González-Burgos G, Lewis DA. GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull* 2008; 34: 944-961.
- [164]Ahlenius S. Clozapine: dopamine D<sub>1</sub> receptor agonism in the prefrontal cortex as the code to decipher a Rosetta stone of antipsychotic drugs. *Pharmacol Toxicol* 1999; 84: 193-196.
- [165]Millan MJ. *N*-methyl-D-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: novel insights and clinical perspectives. *Psychopharmacology* 2005; 179: 30-53.
- [166]Newcomer JW. Second-generation (atypical) antipsychotics and metabolic effects: a comprehensive literature review. *CNS Drugs* 2005; 19 Suppl 1: 1-93.
- [167]Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li C, Davis JM. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet* 2009; 373: 31-41.
- [168]Tamminga CA. Partial dopamine agonists in the treatment of psychosis. *J Neural Transm* 2002; 109: 411-420.
- [169]DeLeon A, Patel NC, Crismon ML. Aripiprazole: a comprehensive review of its pharmacology, clinical efficacy, and tolerability. *Clin Ther* 2004; 26: 649-666.
- [170]Aghajanian GK, Marek GJ. Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res Brain Res Rev* 2000; 31: 302-312.
- [171]Marek GJ. Metabotropic glutamate 2/3 receptors as drug targets. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 18-22.
- [172]Galarreta M, Hestrin S. A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 1999; 402: 72-75.
- [173]Cruikshank SJ, Lewis TJ, Connors BW. Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. *Nat Neurosci* 2007; 10: 462-468.
- [174]Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW. Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nature Rev Neurosci* 2005; 6: 312-3.
- [175]González-Maeso J, Ang RL, Yuen T, Chan P, Weisstaub NV, López-Giménez JF, Zhou M, Okawa Y, Callado LF, Milligan G, Gingrich JA, Filizola M, Meana JJ, Sealfon SC. Identification of a serotonin/glutamate receptor complex implicated in psychosis. *Nature* 2008; 452: 93-97.

**Table 1.** In vitro binding affinities of the four antipsychotics used in the present study, expressed in  $K_i$  values (nM).

<b>Receptor</b>	<b>Clozapine</b>	<b>Olanzapine</b>	<b>Haloperidol</b>	<b>Chlorpromazine</b>
D <sub>1</sub>	85	31	210	56
D <sub>2</sub>	125	11	1	2
D <sub>3</sub>	473	27	2	9
D <sub>4</sub>	35	21	5	12
5-HT <sub>1A</sub>	770	>10,000	2,600	116*
5-HT <sub>2A</sub>	12	2	78	2
5-HT <sub>2C</sub>	8	11	1,500	25
$\alpha_1$ -adrenergic	7	7	6	1
H <sub>1</sub> histamine	6	7	>730	9
Muscarinic	2	2	>1,500	60

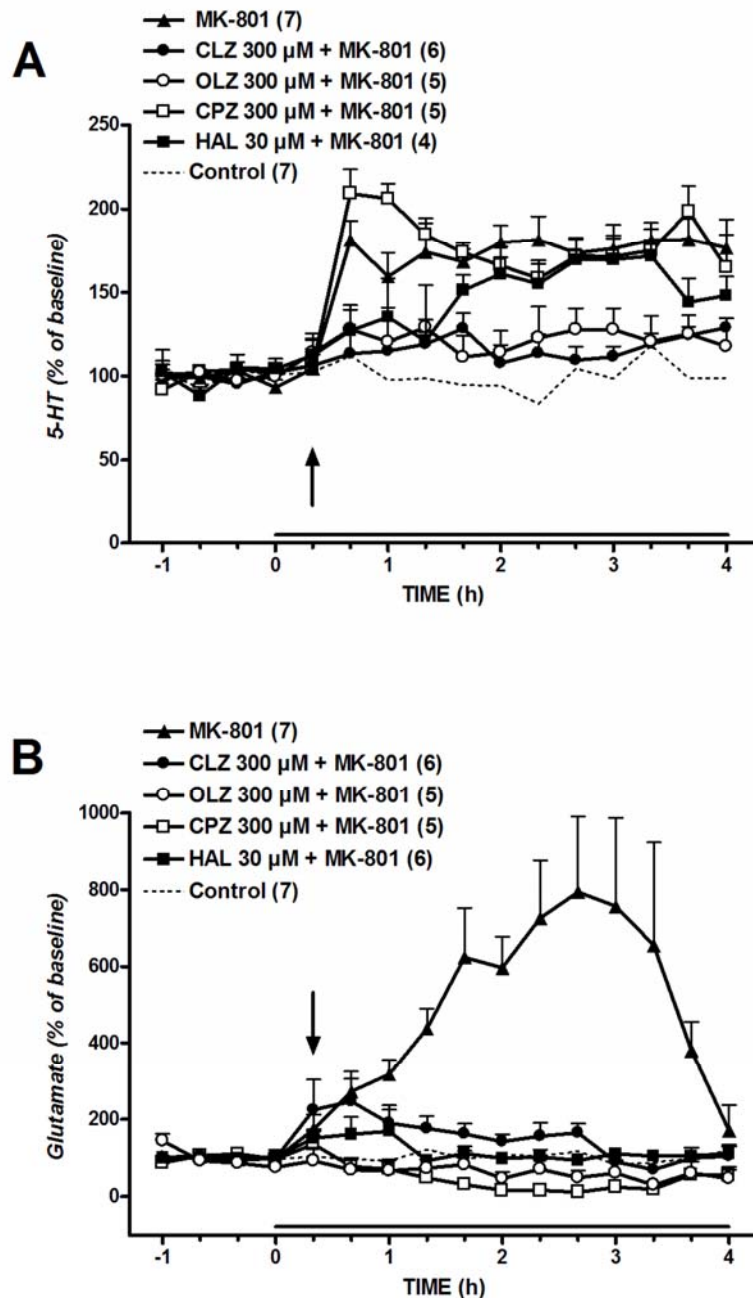
Data taken from references [44, 45, 52, 81-83].

\*Data from human cloned 5-HT<sub>1A</sub> receptors.

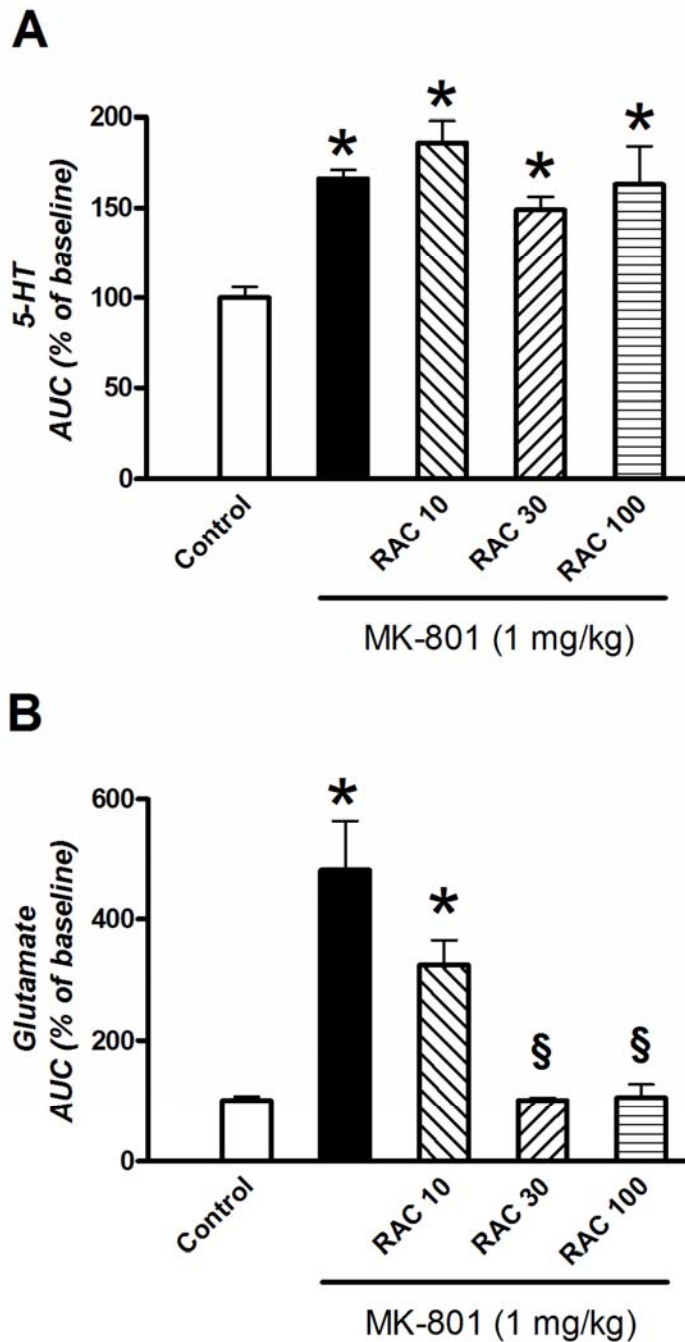
**Table 2.** Changes in extracellular 5-HT and glutamate in the mPFC as a result of the action of intra-mPFC administration of drugs on different monoamine receptors. (=) unchanged, (↑) increase and (↓) decrease.

<b>Receptor action</b>	<b>Changes in 5-HT</b>	<b>Changes in glutamate</b>
D <sub>2</sub> /D <sub>3</sub> antagonism	=	↑
D <sub>4</sub> antagonism	=	↑
D <sub>1</sub> agonism	↓	↑
5-HT <sub>1A</sub> agonism	↓	=
5-HT <sub>2A</sub> antagonism	↓	↑
$\alpha_1$ -adrenoceptor antagonism	↓	=

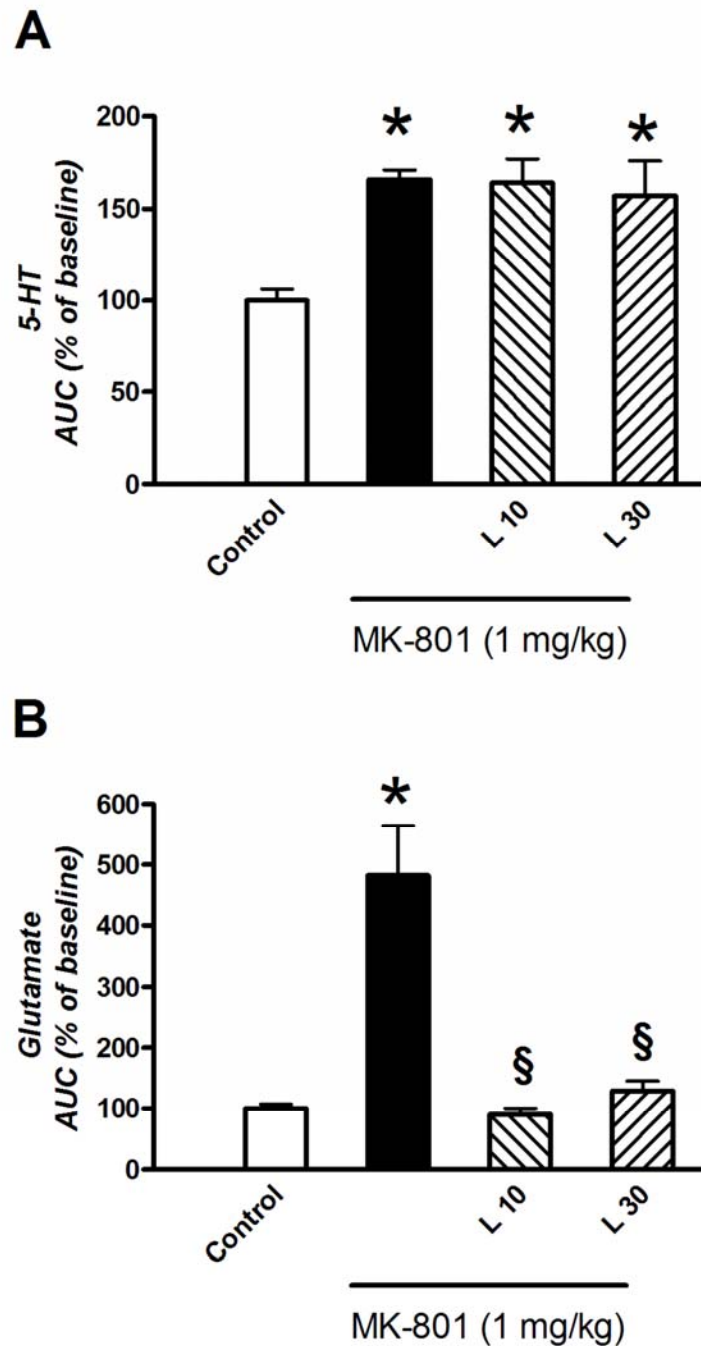
Data taken from reference [60, 62] and X. López-Gil, F. Artigas and A. Adell (unpublished results).



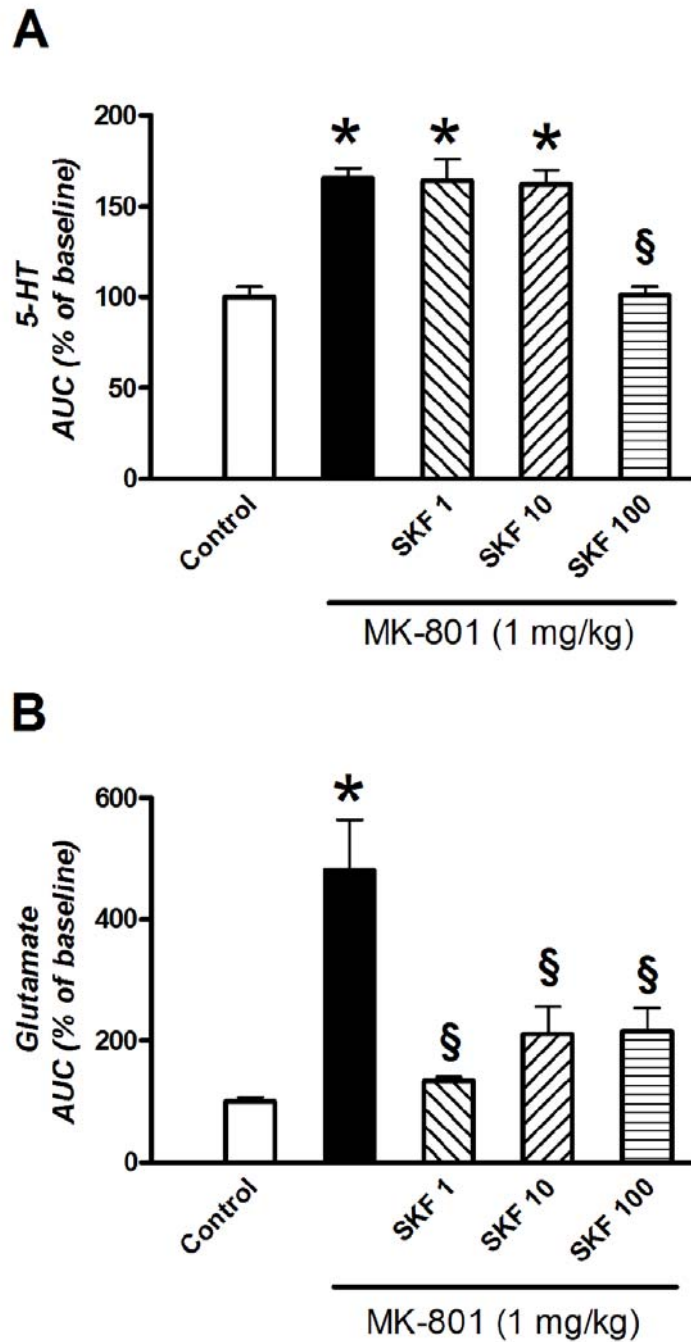
**Figure 1.** Effects of the intra-mPFC perfusion (line) of 300  $\mu$ M of clozapine (CLZ), olanzapine (OLZ), chlorpromazine (CPZ) and haloperidol (HAL) on the efflux of 5-HT (A) and glutamate (B) in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg, i.p.; arrow). Data (mean  $\pm$  SEM) are expressed as percentage changes of the four basal predrug values. Number of animals is given in parentheses. The control group received an injection of saline and, for the sake of clarity, is depicted as a dotted line. Analysis of variance (ANOVA) shows that all four antipsychotic drugs block the increase in glutamate produced by MK-801, but only clozapine and olanzapine are able to block the effect of MK-801 on 5-HT.



**Figure 2.** Effects of the perfusion of the dopamine D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub> antagonist raclopride (RAC, 10, 30 and 100 μM) on the efflux of 5-HT (A) and glutamate (B) in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg, i.p.; arrow). Data are based on integrated area under the curve (AUC) analysis of 4-h perfusion, and expressed as the percentage change from the control group depicted as open bar. \*p < 0.01 vs. control group and §p < 0.01 vs. MK-801 alone (Newman-Keuls test following ANOVA).

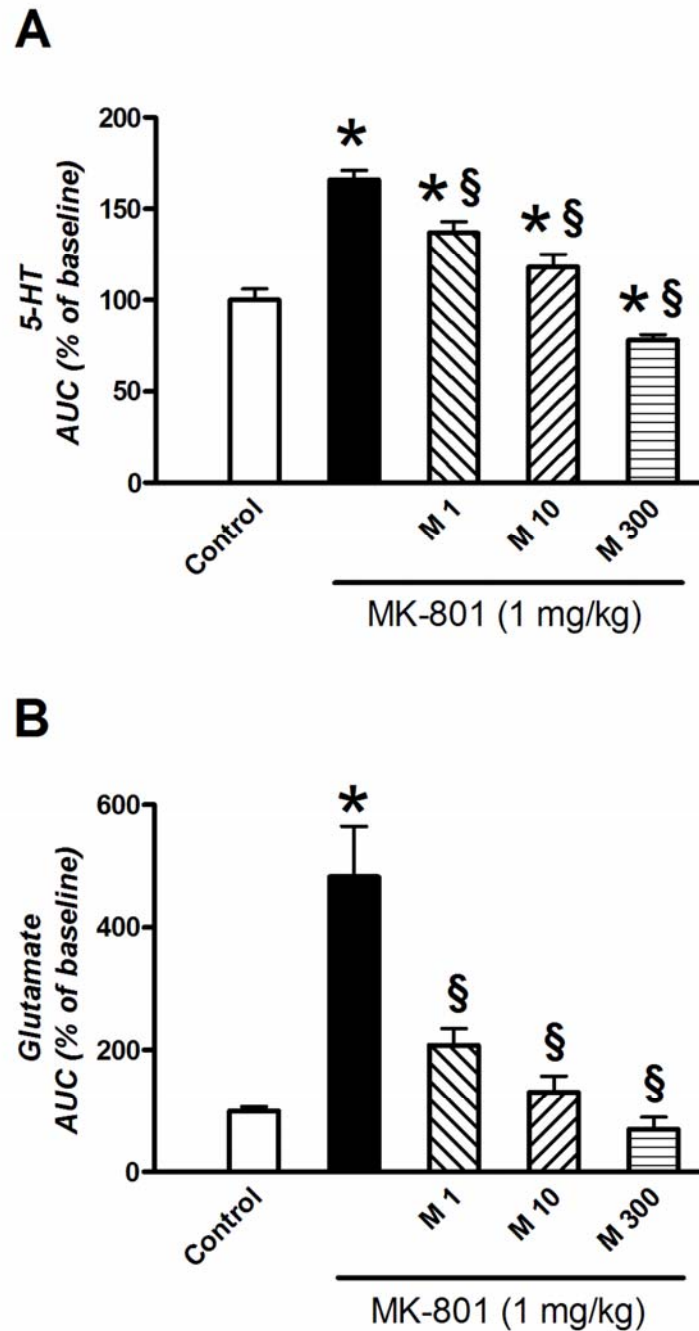


**Figure 3.** Effects of the perfusion of the selective dopamine D<sub>4</sub> antagonist L-745,870 (L, 10 and 30  $\mu$ M) on the efflux of 5-HT (A) and glutamate (B) in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg, i.p.; arrow). Data are based on integrated area under the curve (AUC) analysis of 4-h perfusion, and expressed as the percentage change from the control group depicted as open bar. \* $p < 0.01$  vs. control group and  $^{\S}p < 0.01$  vs. MK-801 alone (Newman-Keuls test following ANOVA).

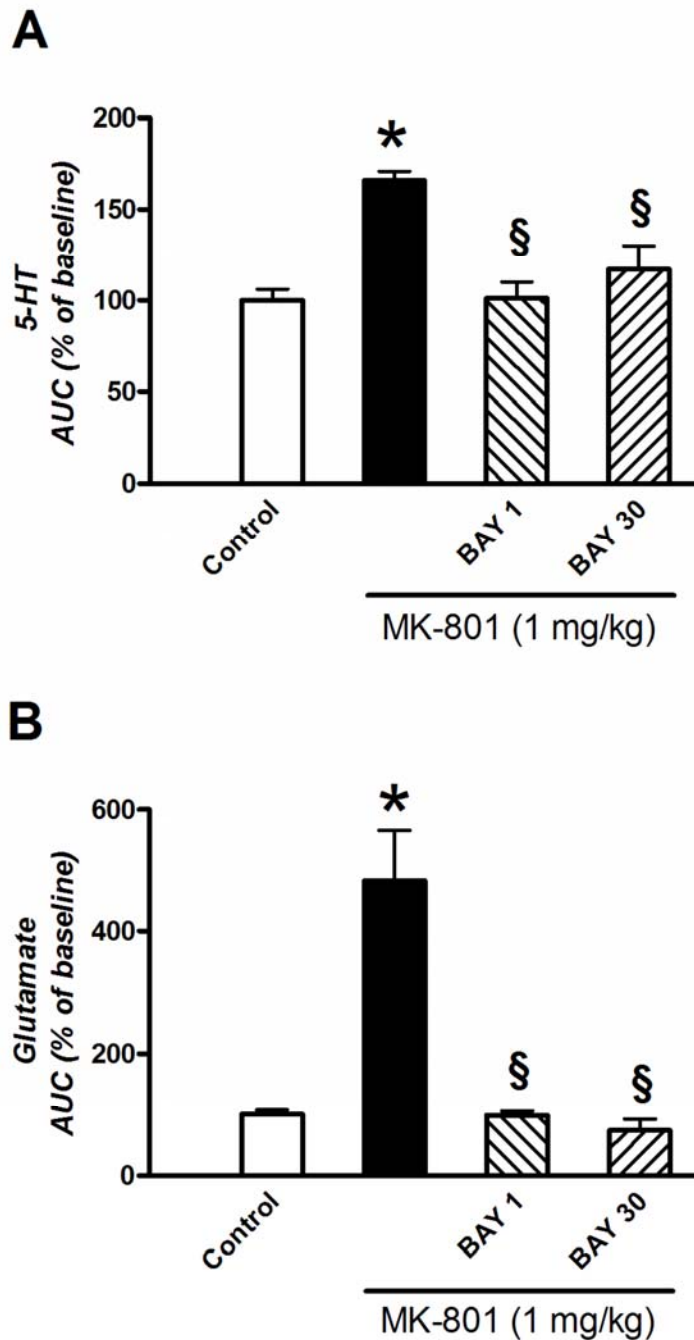


**Figure 4.** Effects of the perfusion of the dopamine  $D_1/D_5$  agonist SKF 38393 (SKF, 1, 10 and 100  $\mu$ M) on the efflux of 5-HT (A) and glutamate (B) in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg, i.p.; arrow). Data are based on integrated area under the curve (AUC) analysis of 4-h perfusion, and expressed as the percentage change from the control group depicted as open bar. \* $p < 0.01$  vs. control group and  $^{\$}p < 0.01$  vs. MK-801 alone (Newman-Keuls test following ANOVA).

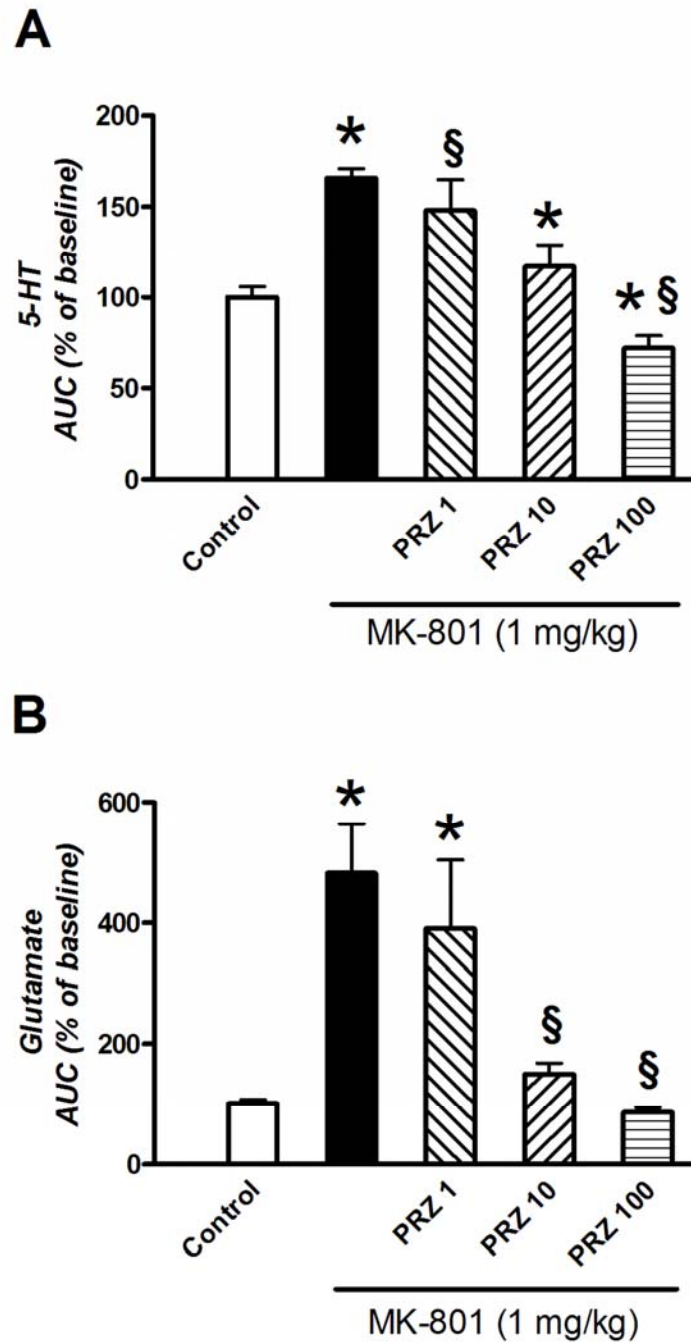




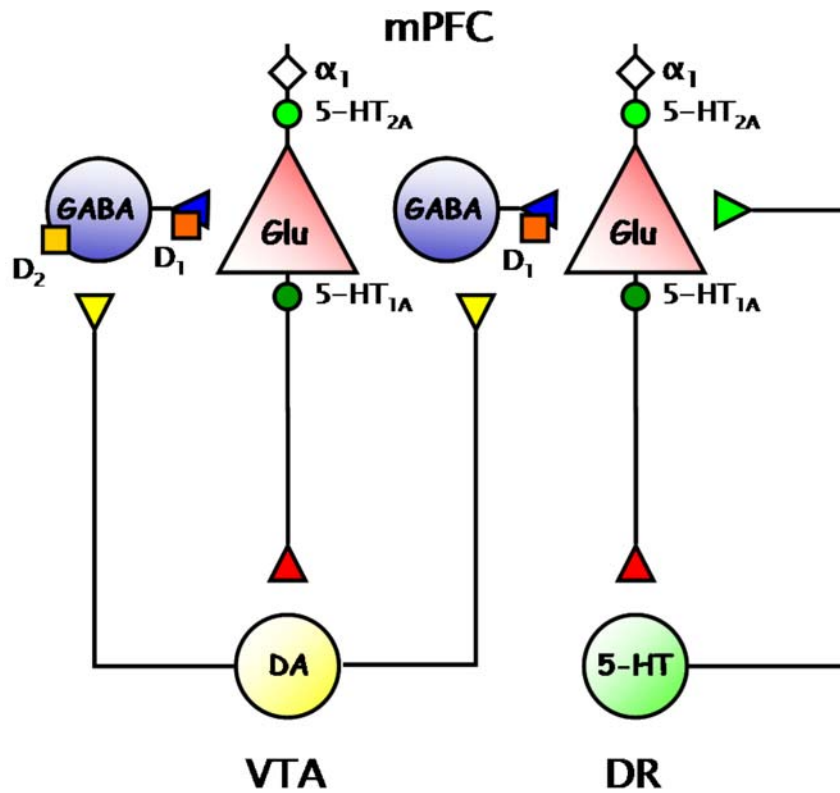
**Figure 5.** Effects of the perfusion of the selective 5-HT<sub>2A</sub> antagonist M100907 (M, 1, 10 and 300  $\mu$ M) on the efflux of 5-HT (A) and glutamate (B) in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg, i.p.; arrow). Data are based on integrated area under the curve (AUC) analysis of 4-h perfusion, and expressed as the percentage change from the control group depicted as open bar. \* $p < 0.01$  vs. control group and § $p < 0.01$  vs. MK-801 alone (Newman-Keuls test following ANOVA).



**Figure 6.** Effects of the perfusion of the selective 5-HT<sub>1A</sub> agonist repinotan (BAY x 3702; BAY, 1 and 30  $\mu$ M) on the efflux of 5-HT (A) and glutamate (B) in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg, i.p.; arrow). Data are based on integrated area under the curve (AUC) analysis of 4-h perfusion, and expressed as the percentage change from the control group depicted as open bar. \* $p < 0.01$  vs. control group and § $p < 0.01$  vs. MK-801 alone (Newman-Keuls test following ANOVA). Data taken and redrawn from reference [62], with permission from Cambridge University Press.



**Figure 7.** Effects of the perfusion of the selective  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonist prazosin (PRZ, 1, 10 and 100  $\mu$ M) on the efflux of 5-HT (A) and glutamate (B) in the mPFC elicited by MK-801 (1 mg/kg, i.p.; arrow). Data are based on integrated area under the curve (AUC) analysis of 4-h perfusion, and expressed as the percentage change from the control group depicted as open bar. \* $p < 0.01$  vs. control group and § $p < 0.01$  vs. MK-801 alone (Newman-Keuls test following ANOVA).



**Figure 8.** The diagram illustrates the functional relationships between the mPFC and its dopaminergic and serotonergic projections from the VTA and the DR, respectively. Although all monoaminergic receptors depicted in this figure are present in both pyramidal cells and GABAergic interneurons, it is only represented the localization that conforms to the results obtained in the present study.

Trabajo 5:

**NMDA receptor blockade needs to disrupt prefrontal cortex bilaterally in an animal model of schizophrenia.**

López-Gil X., Artigas F. and Adell A.

Estudios previos han mostrado que los efectos de la administración sistémica de MK-801 no se reproducen cuando es perfundido en la corteza, sugiriendo que estos compuestos actúan en otra región del cerebro, bloqueando neuronas GABAérgicas tónicamente activas y desinhibiendo una conexión excitatoria cuyo efecto final serían las alteraciones corticales. Recientes publicaciones han mostrado resultados que sugieren un efecto local en la corteza prefrontal. Basándonos en estos datos, nuestra hipótesis de trabajo es que los antagonistas NMDA necesitan afectar ambas cortezas para la realización de sus efectos. Mediante la administración de MK-801 de forma bilateral en la corteza prefrontal se observó un marcado incremento de la transmisión serotoninérgica, mostrando un efecto local en la corteza prefrontal. Por otro lado, la perfusión unilateral en la corteza izquierda de TTX fue capaz de evitar el incremento de 5-HT en la corteza derecha tras la administración sistémica de MK-801. Tomando esta liberación de serotonina como un reflejo de la actividad cortical, estos resultados indican que es necesario que el MK-801 actúe de forma bilateral para provocar un aumento de la actividad de la corteza prefrontal. Desde el punto de vista de las alteraciones del comportamiento, la perfusión bilateral no fue capaz de reproducir el efecto de la administración sistémica, lo que indica que estas estereotipias no están mediadas por la corteza prefrontal. El marcaje con fluorogold muestra que la corteza prefrontal medial presenta una fuerte conexión contralateral, lo que refuerza la importancia de una alteración en esta comunicación por parte de los antagonistas NMDA.



Journal Section: Neurobiology of the Disease

**BILATERAL NMDA RECEPTOR BLOCKADE IN THE PREFRONTAL CORTEX IS NEEDED TO INCREASE EXTRACELLULAR SEROTONIN. IMPLICATION FOR AN ANIMAL MODEL OF SCHIZOPHRENIA.**

**Xavier López-Gil<sup>1,2</sup>, Francesc Artigas<sup>1,2</sup> and Albert Adell<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup>*Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC (IDIBAPS), Barcelona, Spain*

<sup>2</sup>*Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)*

**Running title:** NMDA antagonism and 5-HT in prefrontal cortex

**Keywords:** Animal Model, Schizophrenia, MK801, Serotonin, Prefrontal Cortex, Microdialysis

**Abstract:** 234 words

**Text:** 4368 words

**Number of Figures:** 5

**Supplemental Material:** 1

*\*Corresponding author:*

Albert Adell, Ph.D.

Department of Neurochemistry and Neuropharmacology

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, CSIC (IDIBAPS)

Carrer Rosselló 161, 6th floor, Room 630

E-08036 Barcelona, Spain

Phone: +34 93 3638321

Fax: +34 93 3638301

E-mail: [aacnqi@iibb.csic.es](mailto:aacnqi@iibb.csic.es)

**Abstract**

Previous studies have shown that systemic, but not unilateral intra-prefrontal cortex administration of the NMDA antagonist, MK-801, increased the local efflux of serotonin and induced stereotypies. In addition, recent data showed that systemic MK-801 reduced the activity of cortical inhibitory interneurons. In the search of the site of action of these compounds in the brain, in the present work we tested the hypothesis that MK-801 would need to act on both prefrontal cortices to reproduce the increases in serotonergic transmission and behavioral stereotypies elicited in the rat by systemic MK-801. In the present study, we combined *in vivo* microdialysis with behavioral scoring by direct observation. Extracellular serotonin in the medial prefrontal cortex and stereotypic movements were measured after systemic (1 mg/kg), unilateral and bilateral perfusion (300  $\mu$ M) of MK-801. Additionally, perfusion of fluorogold through dialysis probe was used to label retrogradely the structures that project to the medial prefrontal cortex. We find that systemic and bilateral (but not unilateral) prefrontal administration of MK-801 increased dialysate serotonin whereas only systemic administration of MK-801 induced the overt behavioral activation and stereotypies. Fluorogold labeled retrogradely the ipsilateral portion of the dorsal raphe nucleus and the contralateral medial prefrontal cortex. Our results support the hypothesis that a bilateral hypofunction of NMDA receptors in the medial prefrontal cortex is needed to increase the cortical efflux of serotonin and possibly other parameters such as pyramidal cell hyperactivity and glutamate release.



## Introduction

The hypothesis of *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor hypofunction in schizophrenia stems from the observation that NMDA antagonists, such as phencyclidine (PCP) and ketamine, induce psychotic and negative symptoms as well as cognitive impairment that resemble those present in schizophrenia (Javitt and Zukin, 1991; Krystal et al., 1994). Several higher brain functions that are impaired in schizophrenia (e.g., working memory, decision making, etc.) are dependent on the integrity of the prefrontal cortex (Goldman-Rakic, 1994), and alterations of subunit expression and intracellular signaling proteins of NMDA receptors have been found in the prefrontal cortex of schizophrenics (Akbarian et al., 1996; Beneyto and Meador-Woodruff, 2008). In rats, systemic administration of NMDA antagonists induces hyperlocomotion and stereotypies, and increases pyramidal cell firing (Jackson et al., 2004) and extracellular serotonin (5-HT) in the medial prefrontal cortex (mPFC) (Adams and Moghaddam, 2001; López-Gil et al., 2007). These latter effects are dependent on glutamatergic transmission through the activation of AMPA/kainate receptors (Katayama et al., 2007; López-Gil et al., 2007). Thus, we have hypothesized that the extracellular concentration of 5-HT in the mPFC is an index of *in vivo* excitatory transmission in mPFC. Three sets of findings further support this view: 1) the activation of excitatory (5-HT<sub>2A</sub>,  $\alpha_1$ -adrenergic, AMPA) or inhibitory (5-HT<sub>1A</sub>,  $\mu$ -opioid, mGluR2/3) receptors in mPFC increased and decreased, respectively, the local 5-HT efflux and/or the firing of 5-HT neurons and 5-HT release in the dorsal raphe nucleus (DR) (Celada et al. 2001; Martín-Ruiz et al. 2001; Amargós-Bosch et al. 2003, 2004; Puig et al. 2003); 2) NMDA receptor blockade also increase 5-HT neuron activity (Lejeune et al. 1994); and 3) the electrical stimulation of the mPFC enhances 5-HT efflux in the DR (Celada et al., 2001), which is also a measure of serotonergic activation (Tao et al., 2000). The anatomical substrate for these actions is likely a subpopulation of pyramidal neurons of layer V of mPFC that project heavily to the DR (Gabott et al., 2005). It has been hypothesized that NMDA antagonists impair GABAergic inhibition in the mPFC, leading to pyramidal cell disinhibition and downstream changes in other transmitters. Previous studies have reported that unilateral intra-mPFC perfusion of NMDA antagonists do not reproduce the increased extracellular glutamate and 5-HT (Lorrain et al., 2003; López-Gil et al., 2007) nor the increase in pyramidal cell firing (Suzuki et al., 2002) observed after their systemic administration. This suggests that these drugs would predominantly block NMDA receptors located outside the mPFC. However, recent data has shown that the systemic administration of MK-801 elicited an inhibition of the firing of mPFC GABAergic neurons followed by an increase in the activity of mPFC pyramidal neurons (Homayoun and Moghaddam, 2007), which suggests an involvement of NMDA receptors located on cortical GABAergic interneurons. To reconcile such contradictory data, our working hypothesis herein was that NMDA antagonists should block NMDA receptors in both mPFCs to produce the increases in 5-HT and in (perhaps) stereotypy. To this end, a microdialysis probe was

implanted in each mPFC and extracellular 5-HT and stereotypies were examined after systemic, unilateral and bilateral intra-mPFC administration of MK-801.

## **Materials and Methods**

### **Animals and Treatments**

Male Wistar rats (Charles River Laboratories, Cerdanyola del Vallès, Spain) weighing 250–280 g were used. Food and water were always available. All experimental procedures followed European Union regulations (Official Journal of the European Communities L358/1, 18 December 1986), and were approved by the Institutional Animal Care and Use Committees. Dizocilpine maleate, (MK801, Sigma-Aldrich Tres Cantos, Spain) was dissolved in saline for intraperitoneal (i.p.) administration (1 mg/kg) or in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) for intra-mPFC perfusion (300  $\mu$ M). Tetrodotoxin (TTX, Sigma-Aldrich) was dissolved in artificial CSF. The dose and perfused concentration of MK-801 was selected from our previous work (López-Gil et al., 2007).

### **Behavioral Measures**

Gross behavioral scores were assessed by direct observation of rats undergoing *in vivo* microdialysis and were based in a method described previously (Jackson et al., 2004). Stereotypies were rated during the last 5 minutes of each 20-min sample. Animals received a score of 0 (absence), 1 (presence) or 2 (intense; >50% of the 5-min period) for each of the following behaviors that show a repetitive pattern: reciprocal forepaw treading, side-to-side head weaving and turning. Total scores were calculated by summing the individual values of each behavior during each 5-min period.

### **Microdialysis Procedures**

Concentric dialysis probes with a 4-mm membrane were implanted under sodium pentobarbital anesthesia (60 mg/kg i.p.) in the right and left mPFC (AP +3.2 mm, L  $\pm$ 0.6 mm, DV -6.0 mm; from bregma) according to Paxinos and Watson (1986). Microdialysis experiments were conducted 20–24 h after surgery in freely moving rats by continuously perfusing probes with artificial CSF (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.18 mM MgCl<sub>2</sub>, and 1  $\mu$ M citalopram) at a rate of 1.5  $\mu$ l/min. The addition of an uptake inhibitor to the perfusion fluid is used to decrease clearance from the extracellular space and magnify the release component of extracellular 5-HT (Adell et al, 2002). This does not interfere with the local or systemic actions of the drugs used in the present experiments (López-Gil et al., 2007). Dialysate samples of 30  $\mu$ l were collected every 20 min and 5-HT was determined by HPLC as described (López-Gil et al., 2007). Briefly, the HPLC system consisted of a Waters 717plus autosampler (Waters Cromatografía, Cerdanyola, Spain), a Hewlett-Packard series 1050 pump (Agilent Technologies, Las Rozas, Spain), an octadecylsilica (ODS) column (7.5 cm x 0.46 cm; Beckman, San Ramon, CA), and an amperometric detector Hewlett-Packard 1049 (Agilent Technologies) set at an oxidation potential of 0.6 V. The mobile phase

consisted of 0.15 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8 mM octyl sodium sulfate, 0.2 mM EDTA (pH 2.8, adjusted with phosphoric acid), and 30% methanol and was pumped at 0.7 ml/min. At the completion of dialysis experiments, rats were given an overdose of sodium pentobarbital and a Fast Green solution was perfused through the dialysis probes to stain the surrounding tissue.

### **Fuorogold tracing**

In a parallel experiment using four rats implanted with a single probe in the right mPFC, a 0.4% solution of fluorogold (FG, Fluorochrome LLC, Englewood, CO, USA; 2% in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3) prepared in artificial CSF was perfused at 5 µl/min for 10 min through the probe. Seven days later, rats were anesthetized with 60 mg/kg sodium pentobarbital and perfused intracardially with 4% paraformaldehyde. Brains were removed from the skull and stored in 10% sucrose and processed using standard procedures. Tissue sections, 14 µm thick were obtained with a cryostat, mounted in glass slides pretreated with Histogrip (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA), and visualized with a direct fluorescence microscope.

### **Statistics**

Microdialysate 5-HT (mean ± SEM) was calculated as fmol/30 µl, and shown in the figures as percentages of basal values, averaged from four fractions collected before treatment. Significant ( $p < 0.05$ ) differences in dialysate 5-HT and behavioral scores were analyzed by two-way, repeated-measures, analysis of variance (ANOVA) with time and treatment as factors followed by Newman–Keuls tests.

## **Results**

### **Effects of MK-801 on cortical 5-HT and behavioral scores**

A representative site of the placement of dialysis probes is shown in Supplemental Material 1. The systemic administration of 1 mg/kg MK-801 increased the extracellular concentration of 5-HT to a ~170% of basal values in right and left mPFCs (Figure 1A). In line with previous results (López-Gil et al., 2007), the unilateral administration of 300 µM MK-801 in the mPFC failed to alter 5-HT in any of the mPFC (Figure 1B). However, the bilateral perfusion of 300 µM MK-801 increased dialysate 5-HT in both mPFCs (Figure 1C) to a level not significantly different than that after systemic administration. The perfusion of 1 µM TTX unilaterally in the mPFC abolished locally the basal concentration of 5-HT without altering its concentration in the contralateral mPFC (Figure 2A). The local effect of TTX on dialysate 5-HT has been observed consistently and is a process completely reversible (López-Gil et al., 2007). Further, the perfusion of 1 µM TTX unilaterally in the mPFC abolished the local increase in 5-HT elicited by the systemic administration of MK-801, but also reduced significantly the MK-801-induced increase in 5-HT in the contralateral mPFC (Figure 2B). With regard to the behavioral scores, the systemic administration of 1 mg/kg MK-801 significantly increased the stereotyped behavior (Figure 3A), an effect that was not

blocked by the unilateral perfusion of 1  $\mu$ M TTX (Figure 3C). Neither the unilateral nor bilateral perfusion of 300  $\mu$ M MK-801 in the mPFC produced the emergence of stereotyped behaviors (Figure 3B).

### **Tract tracing studies with fluorogold**

The perfusion of fluorogold through the probe implanted in the right mPFC retrogradely labeled the contralateral mPFC (Figure 4) and the ipsilateral DR (Figure 5). Other structures labeled ipsilaterally with fluorogold were the ventral hippocampus and the mediodorsal thalamic nucleus (data not shown). It is also of note that only certain cortical areas and parts of the amygdala were contralaterally labeled (data not shown).

### **Discussion**

It has been previously shown that the systemic administration of noncompetitive NMDA antagonists induced behavioral activation and enhanced the efflux of glutamate and 5-HT in the mPFC (Moghaddam et al., 1997; Lorrain et al., 2003; López-Gil et al., 2007), effects that were not observed following the unilateral intra-mPFC perfusion of such drugs (Lorrain et al., 2003; López-Gil et al., 2007). The present results show that bilateral (but not unilateral) perfusion of MK-801 in the mPFC elicited an increase of cortical 5-HT efflux, which was comparable to that seen after its systemic administration. This suggests that the effects of systemic NMDA antagonists on prefrontal 5-HT, and likely the overall state of mPFC hyperexcitability that underlies it, require bilateral disruptions of the mPFC. The different time course of the effects of MK-801 between systemic and intra-mPFC administration could likely be accounted for by the slower delivery rate of the drug through the dialysis membrane, which is limited by the low application rate (in the low nmol/h range) and its continuous clearance by the CSF. Taking into consideration the existence of a bilateral glutamatergic mPFC-DR projection (Hajós et al., 1998) but a predominantly ipsilateral serotonergic DR-mPFC pathway (present study), the bilateral perfusion of MK-801 could produce a larger stimulation of serotonergic output from the DR. Alternatively, it would be also possible that prefrontal interconnectivity was indeed crucial for this purpose. To address this issue, a unilateral perfusion of TTX in the mPFC was performed. The perfusion of TTX in one mPFC abolished local 5-HT efflux without altering it in the contralateral mPFC. However, unilateral TTX could impair MK-801-induced 5-HT efflux not only in the ipsilateral mPFC but also to great extent in the contralateral mPFC, thus supporting the idea that bilateral disruption of the mPFC is required to mimic the effects of systemic NMDA antagonists. Although this phenomenon appears clear-cut, the underlying cellular mechanisms remain to be determined. It is possible that each mPFC targets a different population of DR serotonergic neurons and that extracellular 5-HT in the mPFC is increased only when a sufficient number of DR serotonergic cells in both hemispheres are stimulated by cortical projections. This and recent data (Homayoun and Moghaddam, 2007) lend also support to the view that these agents primarily act through a preferential inhibition

of GABAergic interneurons, thus leading to a disinhibited state of pyramidal activity (Olney and Farber, 1995; Moghaddam et al, 1997; Krystal et al, 2003), which is associated with excessive neuronal activity and efflux of glutamate and 5-HT within the mPFC (Adams and Moghaddam, 2001; López-Gil et al., 2007). Our results further suggest that these inhibitory neurons are located within the mPFC. In line with this assumption, it has been shown that PCP and MK-801 reduce the extracellular concentration of GABA in the mPFC (Yonezawa et al., 1998). Interestingly, the perfusion of 100  $\mu$ M of the competitive NMDA receptor antagonist 3-(R)-2-carboxypiperazin-4-propyl-1-phosphonic acid (CPP) in the mPFC enhanced extracellular glutamate and 5-HT (Calcagno et al., 2009), which indicates the existence of differences in the mechanism of action of competitive vs. noncompetitive NMDA receptor antagonists.

In contrast to the changes in serotonergic transmission, the bilateral perfusion of MK-801 did not induce changes in behavioral scores. This indicates that MK-801-induced hyperlocomotion and stereotypies are not dependent on an action in the mPFC or that higher local concentrations are needed. Several findings give support to either possibility. On the one hand, electrolytic lesion or transection of mPFC fails to alter such behaviors (Scorza et al., 2008), and bilateral injections of MK-801 into the nucleus accumbens increase locomotion and head weaving (Al-Khatib et al., 1995). Altogether these observations favor the idea of a subcortical site of action of these agents for inducing stereotyped behavior. On the other hand, stereotypy, measured as forepaw treading and head weaving, is highly correlated with dialysate 5-HT in the prefrontal cortex (as well as with caudate/putamen and nucleus accumbens) albeit at much higher concentrations than those reached in the present work (Baumann et al., 2008), which would rather favor the notion of a dependency of the stereotypic movements elicited by NMDA antagonists on mPFC 5-HT. Interestingly, bilateral microinjections of CPP in the mPFC (a route of administration that likely delivers higher amount of drugs than their perfusion through dialysis probes) increased locomotion and impaired attention and some aspects of executive function (Mirjana et al., 2004; Carli et al., 2006; Del Arco et al., 2008). It is likely that the higher concentrations of these drugs reached after direct microinjections might be responsible of these behavioral changes (Baumann et al., 2008). Although further research is needed to ascertain the likely multiple sites of action of NMDA antagonists with regard to cognitive functions as well as hyperlocomotion and stereotypies, it seems that bilateral action on brain structures is essential.

### **Acknowledgments**

*This work was supported by the Spanish Ministry of Health (Grant FIS PI070111 to A.A.), Spanish Ministry of Education and Science (Grant SAF 2007-62378 to F.A.), and by the Generalitat de Catalunya (SGR2005/00758). X.L.-G. is the recipient of a predoctoral fellowship from the Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). We gratefully acknowledge the skilful technical assistance of Leticia Campa and Verónica Paz.*

## References

- Adams BW, Moghaddam B (2001) Effect of clozapine, haloperidol, or M100907 on phencyclidine-activated glutamate efflux in the prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 50: 750-757.
- Adell A, Celada P, Abellán 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.
- Akbarian S, Sucher NJ, Bradley D, Tafazzoli A, Trinh D, Hetrick WP, Potkin SG, Sandman CA, Bunney WE, Jr., Jones EG (1996) Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics. *J Neurosci* 16: 19-30.
- Al Khatib I, Karadag HC, Ulugöl A (1995) The behavioral effects of MK-801 injected into nucleus accumbens and caudate-putamen of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 52: 723-730.
- Amargós-Bosch M, Adell A, Bortolozzi A, Artigas F (2003) Stimulation of  $\alpha_1$ -adrenoceptors in the rat medial prefrontal cortex increases the local in vivo 5-hydroxytryptamine release: reversal by antipsychotic drugs. *J Neurochem* 87: 831-842.
- 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<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2A</sub> receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14: 281-299.
- Baumann MH, Clark RD, Rothman RB (2008) Locomotor stimulation produced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) is correlated with dialysate levels of serotonin and dopamine in rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 90: 208-217.
- Beneyto M, Meador-Woodruff JH (2008) Lamina-specific abnormalities of NMDA receptor-associated postsynaptic protein transcripts in the prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 33: 2175-2186.
- Calcagno E, Carli M, Baviera M, Invernizzi RW (2009) Endogenous serotonin and serotonin<sub>2C</sub> receptors are involved in the ability of M100907 to suppress cortical glutamate release induced by NMDA receptor blockade. *J Neurochem* 108: 521-532.
- Carli M, Baviera M, Invernizzi RW, Balducci C (2006) Dissociable contribution of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the medial prefrontal cortex to different aspects of executive control such as impulsivity and compulsive perseveration in rats. *Neuropsychopharmacology* 31: 757-7.
- 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<sub>A</sub>, and glutamate receptors. *J Neurosci* 21: 9917-9929.
- Del Arco A, Segovia G, Mora F (2008) Blockade of NMDA receptors in the prefrontal cortex increases dopamine and acetylcholine release in the nucleus accumbens and motor activity. *Psychopharmacology* 201: 325-338.
- Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J Comp Neurol* 492: 145-177.
- Goldman-Rakic PS (1994) Working memory dysfunction in schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 6: 348-357.
- Hajós M, Richards CD, Székely 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.
- Homayoun H, Moghaddam B (2007) NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci* 27: 11496-11500.
- 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 USA* 101: 8467-8472.

Javitt DC, Zukin SR (1991) Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry* 148: 1301-1308.

Katayama T, Jodo E, Suzuki Y, Hoshino KY, Takeuchi S, Kayama Y (2007) Activation of medial prefrontal cortex neurons by phencyclidine is mediated via AMPA/kainate glutamate receptors in anesthetized rats. *Neuroscience* 150: 442-448.

Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, Bremner JD, Heninger GR, Bowers MB, Jr., Charney DS (1994) Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51: 199-214.

Krystal JH, D'Souza DC, Mathalon D, Perry E, Belger A, Hoffman R (2003) NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology* 169: 215-233.

Lejeune F, Gobert A, Rivet JM, Millan MJ (1994) Blockade of transmission at NMDA receptors facilitates the electrical and synaptic activity of ascending serotonergic neurones. *Brain Res* 656: 427-431.

Lorrain DS, Baccei CS, Bristow LJ, Anderson JJ, Varney MA (2003) Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience* 117: 697-706.

López-Gil X, Babot Z, Amargós-Bosch M, Suñol C, Artigas F, Adell A (2007) Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801-increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology* 32: 2087-2097.

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.

Mirjana C, Baviera M, Invernizzi RW, Balducci C (2004) The serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors antagonist M100907 prevents impairment in attentional performance by NMDA receptor blockade in the rat prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 29: 1637-1647.

Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D (1997) Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci* 17: 2921-2927.

Olney JW, Farber NB (1995) Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 52: 998-1007.

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

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<sub>2A</sub> receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cereb Cortex* 13: 870-882.

Scorza MC, Meikle MN, Hill XL, Richeri A, Lorenzo D, Artigas F (2008) Prefrontal cortex lesions cause only minor effects on the hyperlocomotion induced by MK-801 and its reversal by clozapine. *Int J Neuropsychopharmacol* 11: 519-532.

Suzuki Y, Jodo E, Takeuchi S, Niwa S, Kayama Y (2002) Acute administration of phencyclidine induces tonic activation of medial prefrontal cortex neurons in freely moving rats. *Neuroscience* 114: 769-779.

Tao R, Auerbach SB (2000) Regulation of serotonin release by GABA and excitatory amino acids. *J Psychopharmacol* 14: 100-113.

Yonezawa Y, Kuroki T, Kawahara T, Tashiro N, Uchimura H (1998) Involvement of  $\gamma$ -aminobutyric acid neurotransmission in phencyclidine-induced dopamine release in the medial prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol* 341: 45-56.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Effects of the systemic and intra-mPFC administration of MK-801 on dialysate 5-HT in the medial prefrontal cortex (mPFC). **(A)** A single injection of MK-801 (1 mg/kg, i.p.) increased extracellular 5-HT both in the left [ $F(1,17) = 18.63$ ;  $p < .001$ ] and right mPFC [ $F(1,17) = 22.09$ ;  $p < .0005$ ]. **(B)** Unilateral perfusion of MK-801 (300  $\mu$ M) in the right mPFC did not alter extracellular 5-HT locally [ $F(1,9) = 1.12$ ;  $p = .318$ , vs. control] or in the left mPFC [ $F(1,6) = .42$ ;  $p = .543$ , vs. right mPFC]. Similarly, unilateral perfusion of MK-801 (300  $\mu$ M) in the left mPFC did not alter extracellular 5-HT locally [ $F(1,9) = .01$ ;  $p = .931$ , vs. control] or in the right mPFC [ $F(1,6) = .35$ ;  $p = .577$ , vs. left mPFC]. **(C)** Simultaneous perfusion of MK-801 (300  $\mu$ M) in each mPFC increased dialysate 5-HT both in the left [ $F(1,15) = 16.62$ ;  $p < .0009$ ] and right mPFC [ $F(1,15) = 13.72$ ;  $p < .005$ ] to the same extent that the corresponding increases observed after the systemic administration of the drug. Data (mean  $\pm$  SEM) are expressed as percentage changes of the four basal predrug values. Number of animals is given in parentheses. The arrow represents the systemic administration of saline or MK-801 whereas the bar indicates the intra-mPFC perfusion of MK-801.

**Figure 2.** Effects of the unilateral perfusion of TTX (1  $\mu$ M, bar) on mPFC 5-HT in saline- and systemic MK-801 injected (arrow) animals. **(A)** The perfusion of 1  $\mu$ M TTX unilaterally in the left mPFC abolished locally the basal concentration of 5-HT [ $F(1,13) = 82.67$ ;  $p < .000005$ ] without altering its concentration in the contralateral (right) mPFC [ $F(1,13) = 2.44$ ;  $p = .142$ ]. **(B)** The perfusion of 1  $\mu$ M TTX unilaterally in the left mPFC abolished the local increase in 5-HT elicited by the systemic administration of MK-801 [ $F(1,22) = 213.72$ ;  $p < .0000001$ ], but also reduced significantly the MK-801-induced increase in 5-HT in the contralateral (right) mPFC [ $F(1,22) = 36.89$ ;  $p < .000005$ ]. Data (mean  $\pm$  SEM) are expressed as percentage changes of the four basal predrug values. Number of animals is given in parentheses. The arrow represents the systemic administration of MK-801 whereas the bar indicates the intra-mPFC perfusion of TTX. The control curves in **(B)** have been omitted for the sake of clarity.

**Figure 3.** Effects of the systemic **(A)** and local (unilateral or bilateral) **(B)** administration of MK-801 on stereotyped behavior. The systemic administration of MK-801 (1 mg/kg, i.p.) was the only treatment that significantly increased the stereotypies (turning, forepaw treading and head weaving) in the rats [ $F(1,17) = 96.78$ ;  $p < .000001$ ]. This increase was not blocked by the unilateral perfusion of 1  $\mu$ M TTX **(C)**. Behavioral scores are expressed as mean  $\pm$  SEM. Number of animals is given in parentheses. The arrow represents the systemic administration of MK-801 whereas the bar indicates the intra-mPFC perfusion of MK-801 (B) or TTX (C).



FIGURE 1

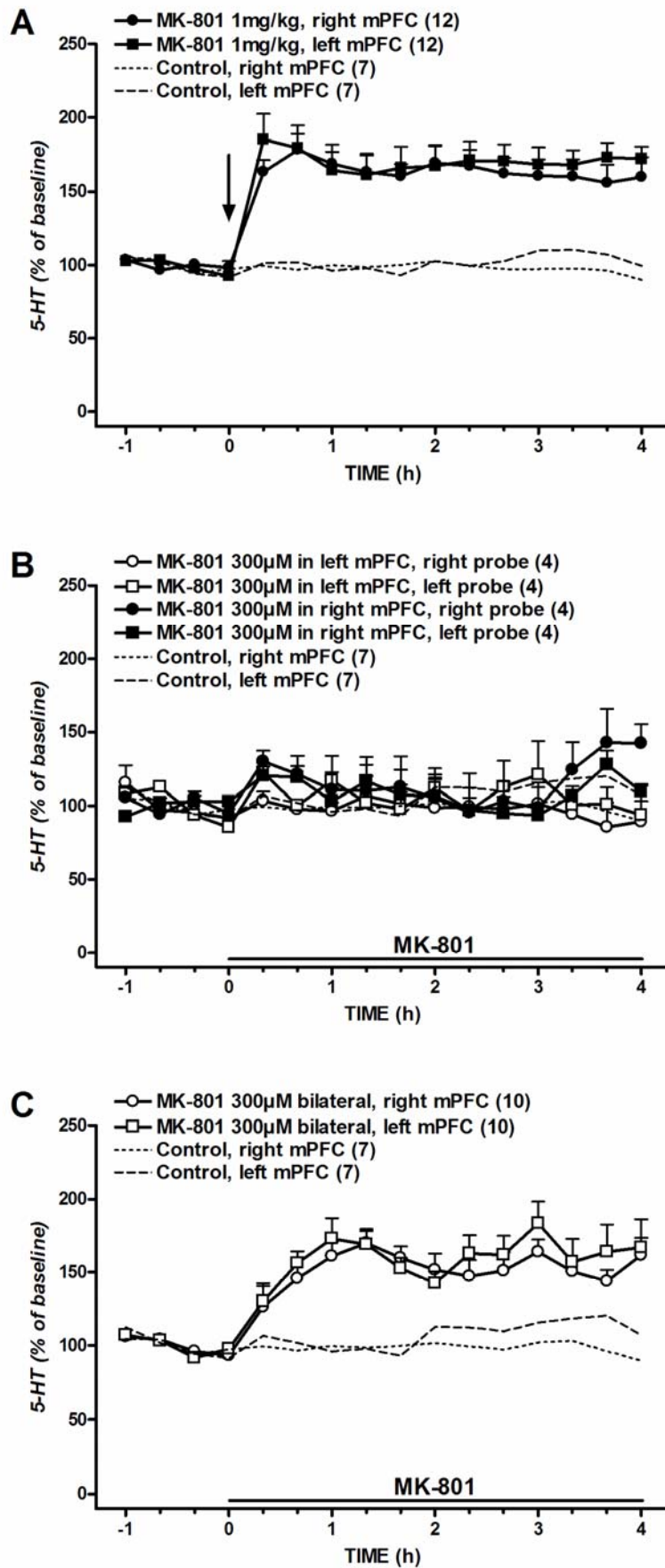


FIGURE 2

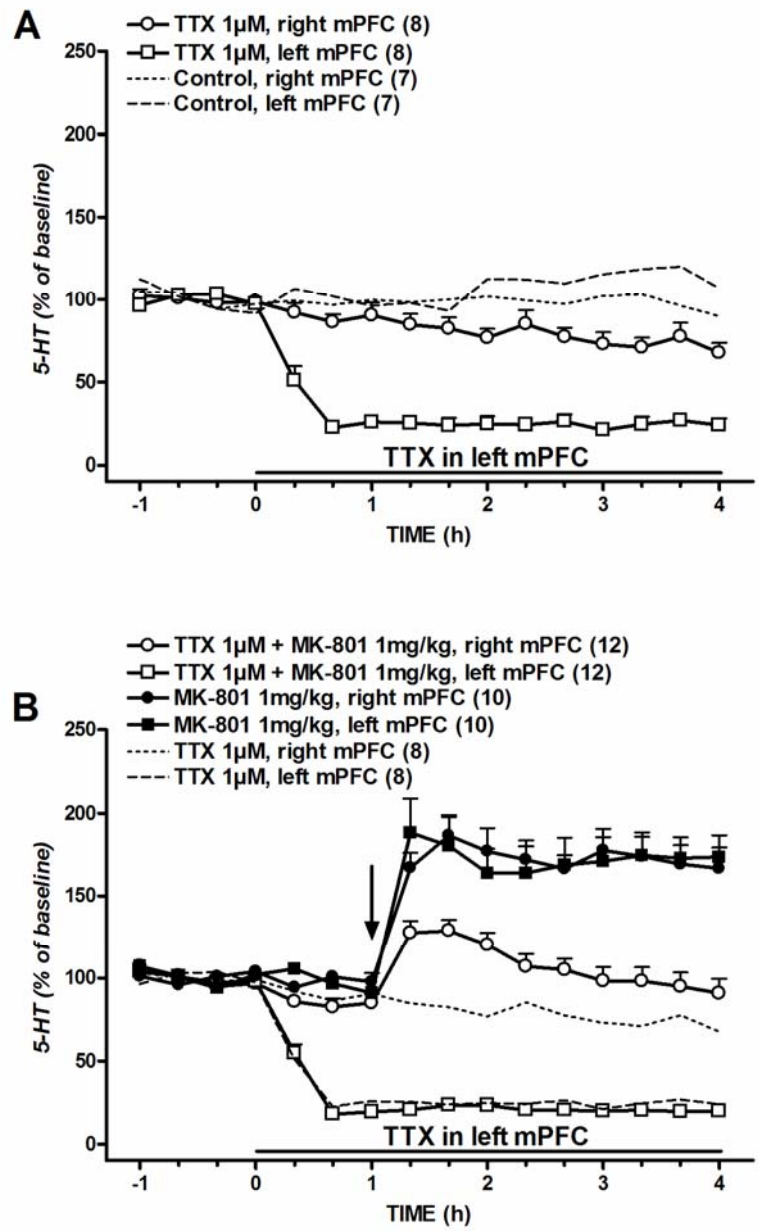
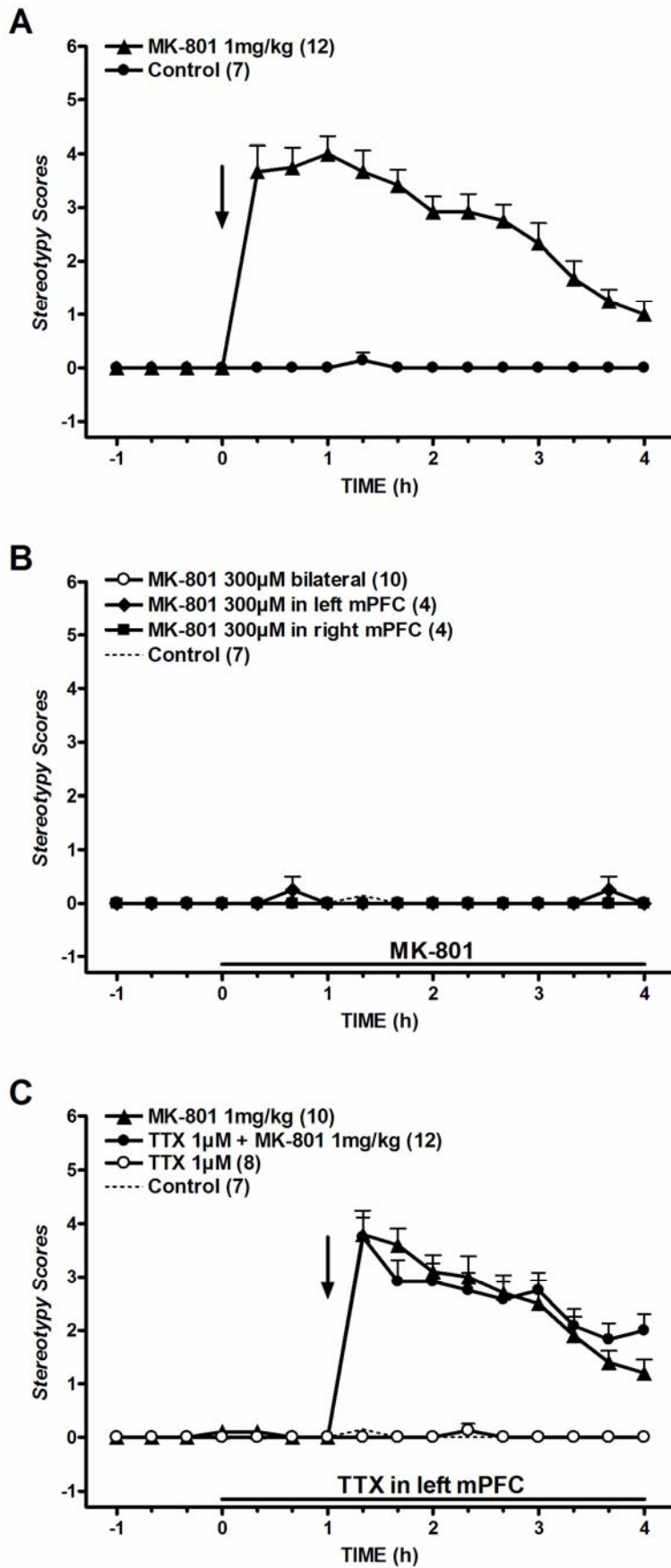
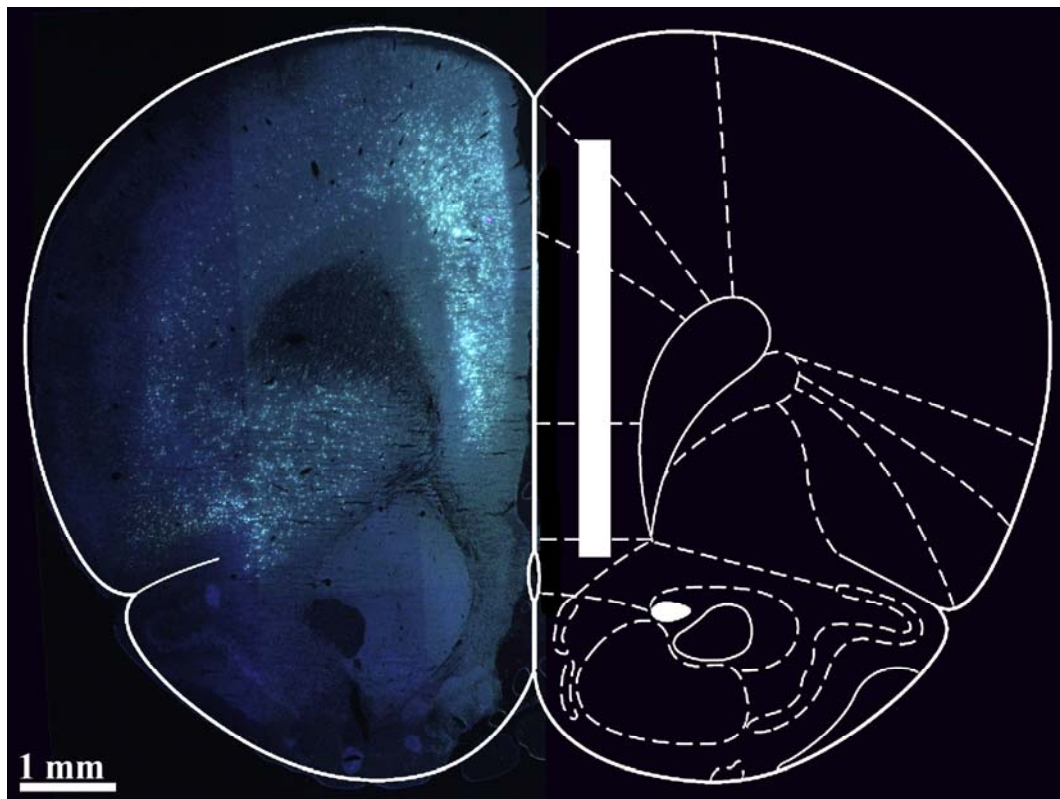
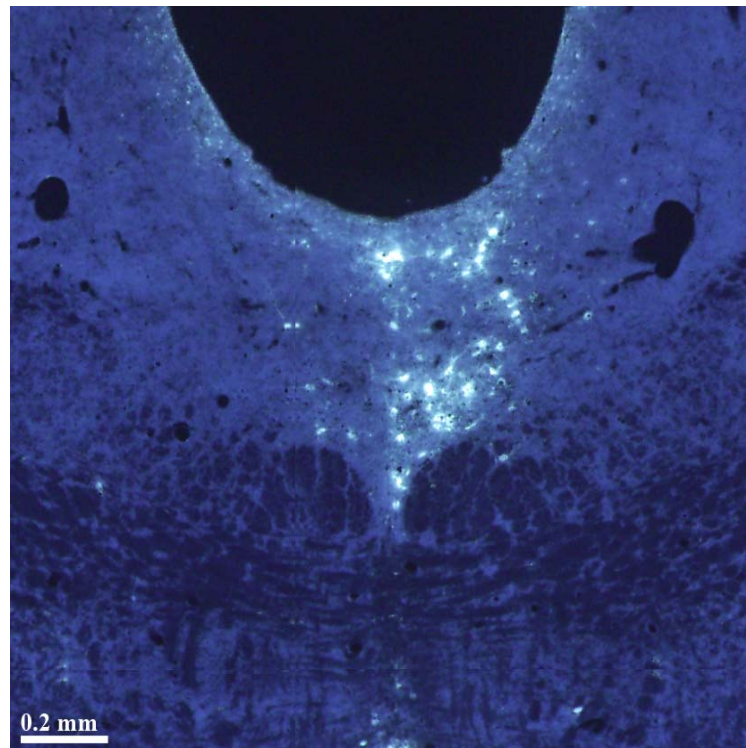


FIGURE 3

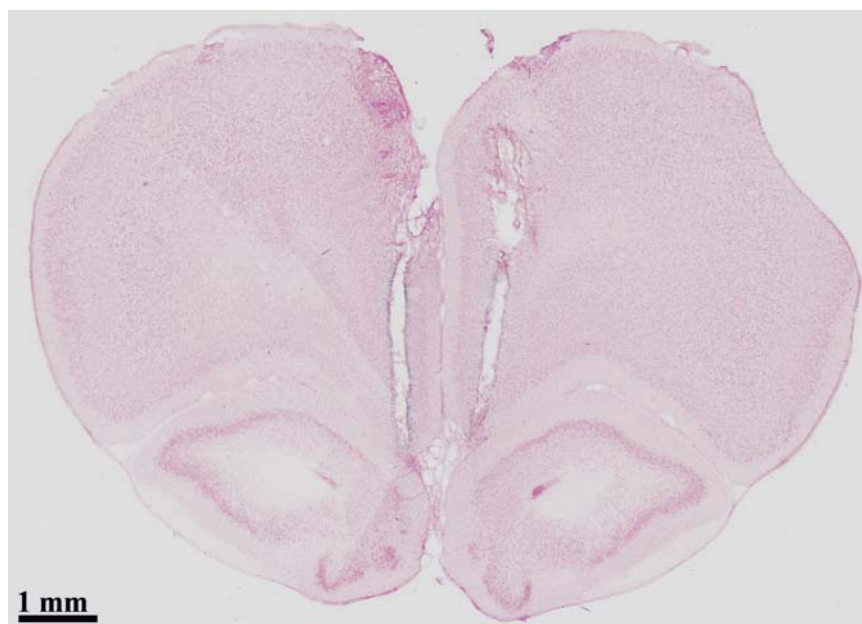




**Figure 4.** Schematic representation of the microdialysis probe implant and the fluorescence microscopy image of fluorogold labeling. The perfusion of fluorogold through the probe implanted in the right mPFC retrogradely labeled the contralateral mPFC. Of interest is the finding that the contralateral labeling is markedly concentrated in layer V. Also, contralateral layer I of the mPFC is devoid of fluorogold labeling, which indicates that there was no diffusion of the tracer to the contralateral hemisphere. The white rectangle represents the membrane of the probe (4-mm length).



**Figure 5.** Serotonergic projection from the dorsal raphe nucleus (DR) to the mPFC. The perfusion of fluorogold through the probe implanted in the right mPFC almost exclusively labeled retrogradely the ipsilateral part of the DR, but not the left section. This indicates that, although mPFC projection to the DR has been shown to be bilateral (Hajós et al., 1998), the serotonergic projection to the mPFC is mainly ipsilateral. Fluorogold labeling in the DR is concentrated in its ventral part.



**Supplemental Material 1.** Representative histological section cut in the coronal plane at 40  $\mu$ m and stained with Neutral Red. The picture shows the tracts of two dialysis probes implanted in the right and the left mPFC of the rat. Scale bar, 1 mm.



Trabajos anexos:

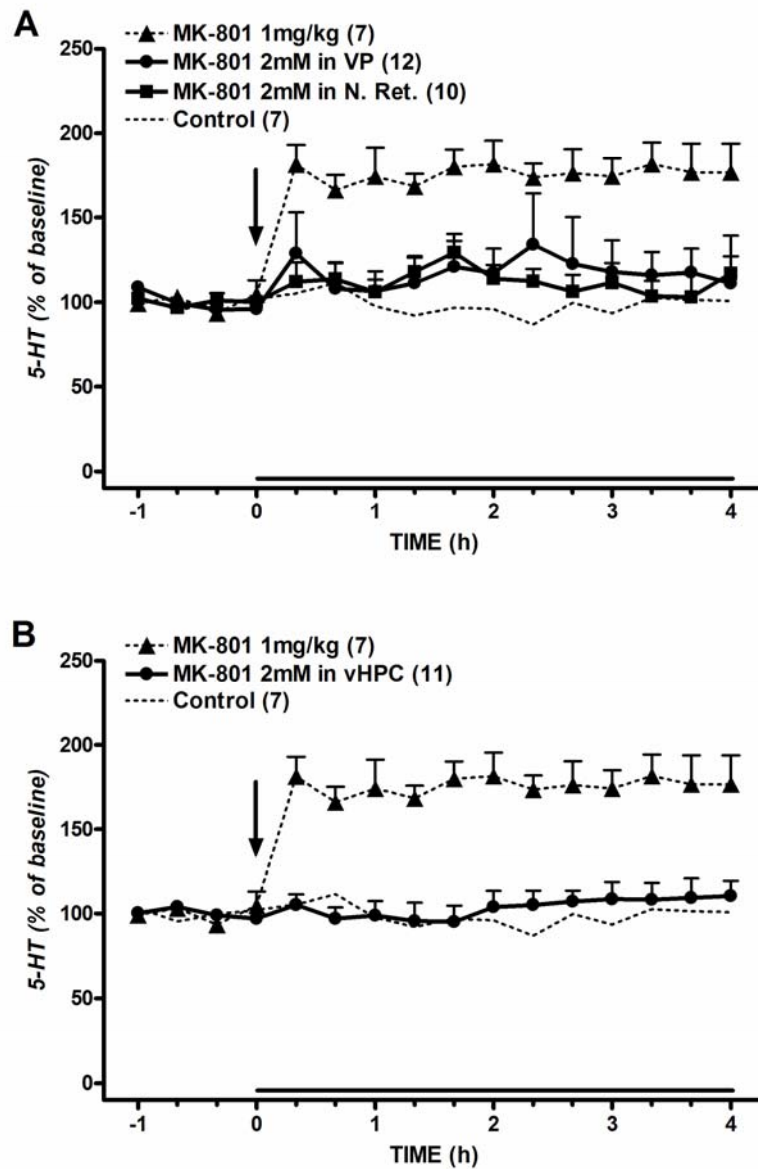
Se ha demostrado que el efecto final de los antagonistas NMDA es un excesivo incremento de la actividad cortical. En estos efectos pueden estar jugando un papel clave estructuras subcorticales que presenten proyecciones excitatorias a la corteza prefrontal, de forma que su desinhibición como consecuencia del antagonismo NMDA podría provocar una mayor entrada excitatoria sobre la corteza. Las mayores proyecciones subcorticales glutamatérgicas son el hipocampo ventral y el núcleo medio dorsal (MD) del tálamo. En el caso del hipocampo, el control inhibitorio lo ejercen interneuronas GABAérgicas de la propia estructura. En cambio, en el tálamo de roedores no se encuentran interneuronas GABAérgicas, de forma que el control inhibitorio se ejerce desde núcleos externos como son el núcleo reticular del tálamo y el pálido ventral, ambos formados por neuronas GABAérgicas de proyección.

Con el objetivo de valorar la capacidad del antagonismo NMDA para actuar en estas interneuronas y así desinhibir una entrada excitatoria sobre la corteza prefrontal, se implantaron dos sondas de microdiálisis. Una se situó en la corteza prefrontal, donde detectaremos los posibles cambios en la transmisión serotoninérgica. La otra se implantó en el hipocampo ventral, el núcleo reticular talámico y el pálido ventral y a través de ella perfundimos MK-801 en esas estructuras.

Los datos muestran que la perfusión local del antagonista NMDA en estas regiones subcorticales es incapaz de generar un incremento de la transmisión serotoninérgica en la corteza prefrontal. Esta falta de efecto local puede ser debida a que el MK-801 no está realizando sus acciones en estas áreas, o que en todo caso, el efecto en estas regiones no es capaz de provocar un aumento de la actividad cortical suficiente como para que se refleje en un incremento de la liberación de serotonina. De todas formas, no podemos descartar que sea porque el antagonismo NMDA necesite ser administrado bilateralmente en estas zonas para que sea capaz de generar sus alteraciones corticales, al igual que sucedía con la corteza prefrontal. Es probable que el efecto de la administración sistémica del MK-801 sea debido a la suma de efectos en distintas áreas del cerebro.







**Figura 1.** Efecto de la perfusión local (línea al pie de ambas gráficas) de MK-801 2mM en pálido ventral y núcleo reticular del tálamo (A) o en hipocampo ventral (B) sobre la concentración de serotonina extracelular en la corteza prefrontal. Datos expresados como porcentaje de los 4 valores basales. El número de animales figura entre paréntesis. El grupo control y MK-801 sistémico son los mismos en ambas gráficas y están representados por líneas de puntos. No se observaron diferencias significativas respecto del grupo control en ninguno de los casos.



## V. DISCUSIÓN

### 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE MK-801

La hipótesis de una hipofunción de los receptores NMDA como posible causa de la esquizofrenia surgió de la observación de que los antagonistas de este receptor provocaban la aparición de sintomatología psicótica y negativa así como déficits cognitivos característicos de esta enfermedad en individuos sanos y la exacerbaban en pacientes de esquizofrenia (Javitt and Zukin 1991; Krystal et al 1994; Malhotra et al 1996; Tamminga 1998; Newcomer et al 1999; Krystal et al 2003). Administrados a animales de experimentación provocan alteraciones del comportamiento (hiperlocomoción, estereotipias, etc.) (Hertel et al 1995; Adams and Moghaddam 2001; Homayoun et al 2004), así como un incremento de la actividad de las neuronas piramidales corticales (Suzuki et al 2002; Jackson et al 2004; Kargieman et al 2007) y un aumento de la neurotransmisión de dopamina (Schmidt and Fadayel 1996; Adams and Moghaddam 1998; Mathe et al 1999; Adams and Moghaddam 2001), serotonina (5-HT) (Martin et al 1998; Millan et al 1999; Adams and Moghaddam 2001; Calcagno et al 2006) y glutamato (Moghaddam et al 1997; Adams and Moghaddam 2001; Lorrain et al 2003; Ceglia et al 2004; Calcagno et al 2006) en la corteza prefrontal medial. En términos generales, estos efectos pueden ser revertidos mediante la administración de antipsicóticos atípicos pero no mediante los clásicos (Abi-Saab et al 1998; Olney et al 1999; Geyer et al 2001; Aultman and Moghaddam 2001; Tsai and Coyle 2002). Estos compuestos constituyen un importante mecanismo de estudio de la esquizofrenia pues destacan por reproducir los síntomas negativos y cognitivos de la enfermedad mientras que otros modelos tan solo generan la parte psicótica de este trastorno (Krystal et al 1994; Jardemark et al 2000; Krystal et al 2003). El hecho de que respondan al tratamiento con los fármacos clínicamente efectivos apoya la importancia de este modelo para mimetizar la sintomatología esquizofrénica, permitiendo además la monitorización de posibles compuestos con efecto antipsicótico (incluso posibilitando la diferenciación entre fármacos con características de antipsicótico atípico o clásico).

Este aumento de actividad cortical nos muestra un efecto paradójico de estos compuestos, pues el bloqueo de un receptor excitatorio como es el NMDA produciría una inhibición neuronal. La hipótesis propuesta para explicar estas acciones es que los antagonistas NMDA realizarían su acción sobre neuronas GABAérgicas tónicamente activas, bloqueándolas y, consecuentemente, desinhibiendo una transmisión excitatoria cuya consecuencia final sería el mencionado incremento de actividad cortical.

Esta hipótesis enmarca el presente trabajo doctoral, donde hemos intentado responder algunas de las múltiples cuestiones que emergen de este modelo

farmacológico de esquizofrenia y de esta manera estudiar tanto el mecanismo de acción de estos antagonistas NMDA como el de los fármacos antipsicóticos típicos y atípicos y las diferencias entre ellos así como el papel de la corteza prefrontal en estos procesos.

Así pues, nuestro primer objetivo fue caracterizar los efectos de estos antagonistas NMDA sobre la neurotransmisión cortical en rata. La administración sistémica de MK-801 provocó un notable incremento de la concentración extracelular de 5-HT y glutamato en la CPFm, tal como se había descrito para la PCP (Martin et al 1998; Millan et al 1999; Adams and Moghaddam 2001). En cambio, la perfusión local en la corteza derecha a través de la sonda de microdiálisis no dio lugar a cambios en los niveles de los neurotransmisores estudiados. Estos datos corroboran nuestra observación previa de que la administración sistémica, pero no local, de PCP y ketamina aumentaba la liberación de serotonina cortical. Estos resultados coinciden con la observación de que la hiperactividad y aumento de la tasa de disparo de las neuronas piramidales corticales como consecuencia de los antagonistas NMDA (Jodo et al 1998; Suzuki et al 2002; Jackson et al 2004) no se reproducen con su administración local en la CPFm (Aghajanian and Marek 2000; Suzuki et al 2002; Jodo et al 2005). Pese a que no podemos descartar un efecto directo de los antagonistas NMDA en los núcleos del rafe (Callado et al 2000; Tao and Auerbach 2000), basándonos en la fuerte regulación que ejerce la CPFm sobre el rafe y que la liberación de 5-HT en la CPFm refleja los niveles de actividad de esta (pues todos los mecanismos para incrementar la actividad de las neuronas piramidales se traducen en un aumento de la serotonina cortical) (Hajos et al 1998; Martin-Ruiz et al 2001; Celada et al 2001; Amargos-Bosch et al 2003; Bortolozzi et al 2003), es factible que los resultados observados sean debidos a una hiperexcitación de las neuronas piramidales de CPFm, incluyendo las que proyectan a los núcleos del rafe, activándolos y, consecuentemente, aumentando la liberación terminal serotoninérgica. Es posible que el fuerte incremento de glutamato observado sea un reflejo directo de esta hiperactividad de las neuronas piramidales, previo al incremento serotoninérgico.

Estos incrementos de la concentración extracelular de 5-HT y glutamato inducidos por la administración sistémica de MK-801 son dependientes de impulso nervioso pues la perfusión local de tetrodotoxina (TTX) en la CPFm fue capaz de bloquear significativamente el efecto sobre los niveles de ambos neurotransmisores (tal como se había descrito previamente en el caso de la ketamina (Lorrain et al 2003)). De esta manera pudimos también observar que aproximadamente el 40% de la liberación cortical de glutamato provocado por el antagonista NMDA era de origen metabólico pues no desapareció tras el bloqueo de los potenciales de acción por la perfusión de TTX. Esto encaja con el hecho de que solo una parte del glutamato basal es dependiente de impulso nervioso (Moghaddam 1993; Timmerman and Westerink 1997; Timmerman et al 1999). Esta hiperexcitación de la neurotransmisión cortical de 5-HT y glutamato está mediada por una excesiva estimulación glutamatérgica sobre los receptores AMPA/kainato pues la perfusión a través de la sonda de microdiálisis de su antagonista, NBQX, fue capaz de bloquear los efectos del MK-801 sobre ambos neurotransmisores. Este hecho sugiere que la



NMDA estén actuando sobre las neuronas GABAérgicas encargadas de controlar estos núcleos.

Basándonos en estas premisas, procedimos a la implantación de dos sondas de microdiálisis, una en la región donde perfundiríamos MK-801 y otra en la corteza prefrontal. Así pues, se implantó una sonda en el hipocampo ventral de la rata. Se ha descrito que las interneuronas GABAérgicas de esta región más sensibles a los efectos de los antagonistas NMDA (Grunze et al 1996). La administración de MK-801 en el hipocampo ventral no fue capaz de alterar los niveles corticales de 5-HT, en contraste con antecedentes que han descrito cómo la infusión de antagonistas NMDA en esta región incrementa la tasa de disparo de las neuronas piramidales de la corteza prefrontal (Jodo et al 2005). Así pues, nuestros resultados no nos permiten descartar esta región como una posible diana de los antagonistas NMDA, aunque sugieren que el MK-801 únicamente en esta zona no es capaz de alterar la neurotransmisión serotoninérgica en la CPFm.

Respecto al tálamo, se ha descrito que en roedores este núcleo no presenta interneuronas GABAérgicas (Bentivoglio et al 1991; Benson et al 1992). En este caso, el control inhibitorio se realiza externamente por núcleos como el núcleo reticular (Pinault and Deschenes 1998; Zikopoulos and Barbas 2006) y el pálido ventral (Lavin and Grace 1994; Churchill et al 1996; Zahm et al 1996; Kalivas et al 2001). En el caso del núcleo reticular, la perfusión de MK-801 no produjo ningún cambio en la transmisión serotoninérgica cortical, aunque es posible que esto esté debido en parte a la limitación anatómica de implantar una sonda de microdiálisis en este núcleo. Los mismos resultados se obtuvieron con la perfusión de MK-801 en el pálido ventral. A pesar del control inhibitorio que ejerce este núcleo sobre el MD y la VTA, no se observaron cambios como consecuencia del antagonista NMDA. Al igual que con el hipocampo, pese a que no se puede descartar que estas regiones estén alteradas cuando el MK-801 es administrado de forma sistémica, si parecería que la perfusión local no es capaz de desinhibir una conexión capaz de provocar la alteración cortical característica de este modelo de esquizofrenia.

Recientemente, unos estudios de electrofisiología han descrito que la administración sistémica de MK-801 provoca una disminución de la actividad de las neuronas GABAérgicas de la corteza prefrontal que precede a un incremento de excitación de las neuronas piramidales (Homayoun and Moghaddam 2007b). Estos resultados sugieren un efecto directo de los antagonistas NMDA sobre las interneuronas de corteza, de forma que sería el bloqueo de estas neuronas lo que provocaría la hiperexcitación cortical descrita en este modelo. Se ha descrito que en el modelo de antagonistas NMDA, administrados de forma prolongada, existe una disminución del marcaje de parvalbúmina en estas neuronas sin que se vean cambios en su número (Cochran et al 2003), lo cual se ha interpretado como una disminución en su funcionalidad sin darse muerte celular. Estas neuronas parvalbúmina positivas son especialmente sensibles al antagonismo NMDA (Li et al 2002; Coyle 2004) y constituyen una pieza clave en la generación de oscilaciones corticales (Tukker et al 2007; González-Burgos and Lewis 2008).

Una de las más importantes entradas excitatorias en la corteza prefrontal proviene de la corteza contralateral (Carr and Sesack 1998). Mediante el cuerpo

calloso, concretamente la parte más anterior (genu) (Innocenti et al 2003), las CPFm del hemisferio izquierdo y derecho están en contacto. Este haz de fibras representa una de las mayores entradas excitatorias a la corteza y su integridad es necesaria para la generación de las oscilaciones gamma y la sincronía cortical, las cuales se encuentran alteradas en la esquizofrenia (Cho et al 2006; González-Burgos and Lewis 2008). Así pues, esto nos indujo a pensar que para la aparición de las alteraciones provocadas por los antagonistas NMDA, éstos tenían que estar afectando las dos cortezas. Con el fin de comprobarlo, se implantaron dos sondas idénticas de microdiálisis, una en la CPFm izquierda y la otra en la CPFm derecha, a través de las cuales se perfundió el MK-801.

En línea con nuestros experimentos previos, la administración de MK-801 de forma sistémica provocó un incremento de los niveles de 5-HT tanto en la corteza izquierda como en la derecha, alteraciones que no se reprodujeron con la perfusión intracortical unilateral. Sin embargo, cuando se perfundió el antagonista NMDA de forma bilateral en la CPFm se observó un aumento de la concentración extracelular de 5-HT de la misma magnitud que el observado tras la administración sistémica. Interpretando los niveles de 5-HT como un reflejo de la actividad cortical, esto muestra un efecto local del MK-801 en la CPFm el cual está provocando un incremento de la excitación cortical (probablemente como consecuencia del bloqueo de las interneuronas GABAérgicas) y consecuentemente, un aumentado flujo excitatorio hacia los núcleos del rafe, provocando así un aumento de la liberación de 5-HT en la corteza.

Para ver el papel de la corteza prefrontal en las alteraciones del comportamiento de los animales provocadas por MK-801, en estos experimentos se valoró el grado de manifestación de determinadas estereotipias como hiperlocomoción y giros, movimientos repetitivos de las patas delanteras y movimientos de cabeza, las cuales se pueden observar tras la administración de antagonistas NMDA. Observamos que, mientras que la administración sistémica de MK-801 provocó la aparición de estas estereotipias e hiperlocomoción, la perfusión unilateral o bilateral del compuesto no alteró la conducta del animal. Esto coincide con la observación de que lesiones en la CPFm o la decorticación del animal no son capaces de eliminar las estereotipias provocadas por el antagonismo NMDA (Scorza et al 2008), sugiriendo que estas alteraciones de la conducta que aparecen en este modelo no son dependientes de corteza o de una neurotransmisión cortical dañada (Scorza et al 2008). No obstante, debemos tener en cuenta que esto no descarta un efecto local de los antagonistas NMDA sobre funciones más íntimamente relacionadas con la corteza prefrontal como puede ser la memoria operativa, etc., funciones no valoradas en el presente estudio. Es posible que la generación de estereotipias e hiperlocomoción esté mediada por una acción en estructuras subcorticales (Ellenbroek 1993).

En todo caso, estos resultados sugieren que los antagonistas NMDA realizan un efecto predominante en los receptores situados en las interneuronas GABAérgicas corticales (Homayoun and Moghaddam 2007b). Se ha propuesto que en estas células los receptores NMDA son los principales generadores de potenciales excitatorios mientras que en las neuronas piramidales su rol estaría

más relacionado con procesos de plasticidad sináptica y aprendizaje (Olney et al 1999; Lisman et al 2008). Los receptores NMDA en estas interneuronas estarían ejerciendo una función de “sensor” de la actividad de las neuronas piramidales a las que inhiben y controlando así el estado de la red neuronal (Olney et al 1999; Lisman et al 2008). Los efectos locales descritos encajan con esta situación en que las neuronas GABAérgicas estarían tónicamente activas a través de sus receptores NMDA de forma que un antagonista las inhibiría al bloquear su principal receptor activador. Esta inhibición provocaría la hiperexcitación de las neuronas piramidales (Homayoun and Moghaddam 2007b), lo cual teniendo en cuenta la potente conectividad de la CPFm con el resto de estructuras cerebrales, podría conducir a una activación de otros núcleos subcorticales como por ejemplo el rafe dorsal.

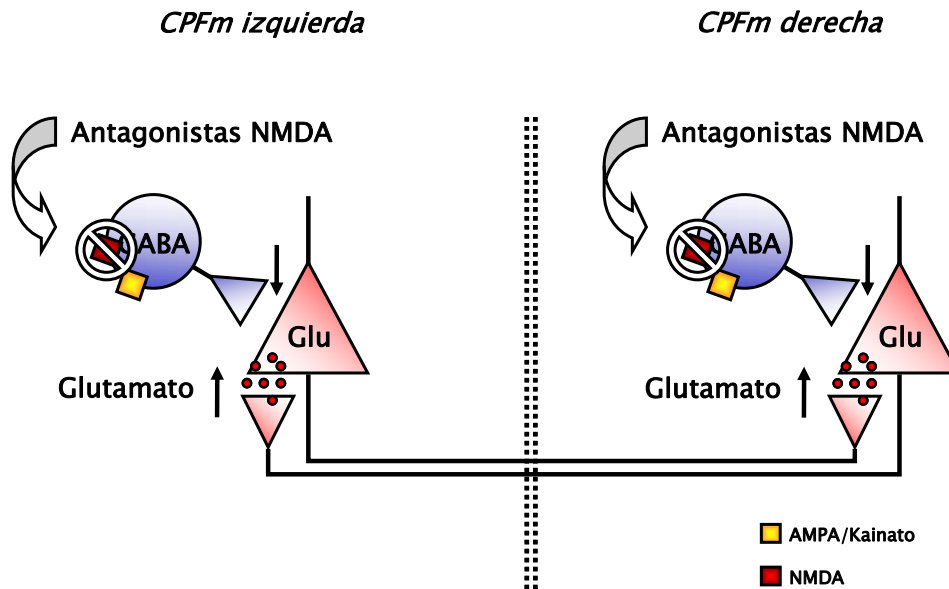
Con el objetivo de poder valorar mejor esta conectividad intra-cortical se perfundió el trazador retrógrado fluorogold a través de una sonda de microdiálisis implantada en la corteza derecha. Esto mostró un extenso marcaje en la corteza izquierda (especialmente en capas II-III y V), lo cual remarca la importancia de esta conexión cortico-cortical y la gran entrada excitatoria que supone. También observamos la aparición de marcaje únicamente en la parte derecha del rafe dorsal, o sea que a pesar de estar situado en la línea media del cerebro, la conexión rafe-CPFm es principalmente ipsilateral (mientras que está descrito que la protección de CPFm a rafe es bilateral (Hajos et al 1998)).

Este efecto provocado por la perfusión bilateral de MK-801 podía estar causado por la disrupción de la importante conexión cortico-cortical, de forma que esto llevara a la hiperactividad descrita o bien por el hecho de que había más cantidad de MK-801 en la corteza que con la perfusión unilateral y que se produjera así una mayor excitación sobre el rafe. Estudios anteriores han mostrado alteraciones del cuerpo calloso (volumen reducido, problemas de mielinización, etc.) en pacientes de esquizofrenia y trastorno bipolar (Innocenti et al 2003; Gogtay et al 2008; Aydin et al 2008; Wang et al 2008a) y, como hemos mencionado, la integridad de esta conexión es necesaria para la generación de oscilaciones gamma en corteza (Cho et al 2006; González-Burgos and Lewis 2008). Para resolver esta cuestión, procedimos a interrumpir la conexión entre ambas cortezas mediante la perfusión de tetrodotoxina (TTX) en la corteza izquierda. Previamente describimos que la administración de TTX revierte los efectos de los antagonistas NMDA sobre la 5-HT cortical al parar la transmisión nerviosa. Al perfundirla a través de la sonda implantada en la corteza izquierda, disminuyó los niveles de 5-HT locales pero no afectó a la corteza derecha, indicando que la interrupción de la conexión entre una sección de la corteza hacia rafe no afectaba a la conexión de la otra corteza. En cambio, la perfusión de TTX en la CPFm izquierda fue capaz de bloquear el incremento de 5-HT provocado por la administración sistémica de MK-801 en la corteza derecha. Este resultado sugiere que, efectivamente, es la conexión intracortical la que está afectada en este modelo, ambas cortezas deben estar afectadas por el antagonista NMDA para que se produzcan sus alteraciones sobre la neurotransmisión cortical serotoninérgica (**figura 19**)

Una vez más, pese al bloqueo del incremento de 5-HT, la perfusión de TTX no fue capaz de revertir las alteraciones comportamentales provocadas por la



administración sistémica de MK-801, hecho que vuelve a sugerir que la corteza prefrontal no es la responsable de las estereotipias de este modelo (Scorza et al 2008) o que, en todo caso, estas son independientes de la neurotransmisión serotoninérgica cortical.



**Figura 19** – En resumen, los antagonistas NMDA estarían realizando parte de su acción de forma local en la corteza prefrontal, bloqueando las interneuronas GABAérgicas y de esta forma desinhibiendo las neuronas piramidales. El hecho de que la perfusión en la corteza izquierda de TTX sea capaz de evitar los efectos del MK-801 sistémico sobre la corteza derecha está indicando que este efecto es debido a la administración bilateral del antagonista NMDA. Debido a la importancia de la conexión cortico-cortical, es posible que el efecto de los antagonistas NMDA sea la interrupción de ésta debido al bloqueo de las interneuronas GABAérgicas.

### 3. EFECTO DE LOS FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS EN EL MODELO MK-801

Observaciones previas indicaban que los efectos de los antagonistas NMDA podían ser revertidos mediante la administración de antipsicóticos atípicos pero no con los clásicos (Abi-Saab et al 1998; Olney et al 1999; Geyer et al 2001; Aultman and Moghaddam 2001; Tsai and Coyle 2002). Así pues, nuestro siguiente objetivo fue estudiar qué efectos ejercían los antipsicóticos sobre las alteraciones de la neurotransmisión corticales que encontramos en este modelo de esquizofrenia. En un primer estudio administrando de forma sistémica fenciclidina (PCP) y ketamina corroboramos los datos descritos en la literatura pues así como los antipsicóticos atípicos clozapina y olanzapina fueron capaces de bloquear el incremento de serotonina en la CPFm, el fármaco clásico haloperidol no fue capaz de realizar ese efecto. Reafirmando estos resultados, vimos que la administración sistémica de

clozapina era capaz de bloquear el incremento tanto de 5-HT como de glutamato provocados por la administración de MK-801 mientras que el haloperidol no fue capaz de revertir la excesiva liberación de serotonina aunque sí fue capaz de bloquear el incremento de los niveles de glutamato corticales. Esto nos marca una importante diferencia entre ambos tipos de fármacos, mientras que los niveles de serotonina solo responden a los antipsicóticos atípicos, tanto estos como los clásicos son capaces de reducir la excesiva transmisión glutamatérgica en la corteza, quizás a través de la común capacidad de inhibir una subpoblación neuronal cortical (Homayoun and Moghaddam 2007a). De hecho, esta diferente capacidad para revertir el aumento de serotonina en CPFm se ha propuesto como método de detección de posibles fármacos con características de antipsicótico atípico.

A raíz de estos resultados surge la siguiente cuestión de dónde están realizando los fármacos antipsicóticos este efecto, el bloqueo del incremento de serotonina y glutamato corticales provocado por los antagonistas NMDA. Teniendo en cuenta que estas interrupciones se dan a nivel cortical, nuestra hipótesis de trabajo es que los antipsicóticos podrían estar realizando su acción en la propia corteza prefrontal, restaurando unos niveles de serotonina y glutamato normales. Con el fin de estudiar el papel de la CPFm en el mecanismo de acción de los antipsicóticos, se procedió a la perfusión, a través de la sonda de microdiálisis implantada en la corteza derecha de los antipsicóticos clozapina, olanzapina (atípicos), haloperidol y clorpromacina (clásicos). Se obtuvieron resultados similares a su administración sistémica: mientras que clozapina y olanzapina fueron capaces de bloquear el incremento de serotonina y glutamato provocado por el MK-801 dado de forma sistémica, la perfusión de haloperidol y clorpromacina solo fue capaz de bloquear los efectos sobre la concentración glutamato cortical.

El hecho de que la perfusión local en la CPFm de los antipsicóticos mostrara un efecto tan similar a su administración sistémica, sugiere que la corteza prefrontal es una región clave en el mecanismo de acción de los fármacos antipsicóticos. Si bien la administración sistémica de los antagonistas NMDA produce un exceso de excitación cortical reflejado por el incremento de la liberación cortical de 5-HT y glutamato, la perfusión local en la corteza de los fármacos antipsicóticos es suficiente para bloquear estas alteraciones y restaurar unos niveles de 5-HT y glutamato normales. Esto sugiere un efecto directo de los antipsicóticos en la CPFm y la importante implicación de esta región en el tratamiento farmacológico de la esquizofrenia. Estos resultados son coherentes con la función de la corteza prefrontal en los procesos cognitivos como la memoria operativa o las acciones dirigidas a una finalidad (Goldman-Rakic 1995; Ellenbroek et al 1996; Carli et al 2006), funciones alteradas tras la administración de antagonistas NMDA (Abi-Saab et al 1998; Olney et al 1999; Geyer et al 2001; Jackson et al 2004) y en pacientes de esquizofrenia (Weinberger and Gallhofer 1997; Park et al 1999).

Por otro lado, hemos observado diferencias en los antipsicóticos respecto a la capacidad de bloquear las alteraciones de la neurotransmisión cortical provocadas por los antagonistas NMDA. La base de estas diferencias puede estar

en el perfil farmacológico que presentan los antipsicóticos: mientras que los clásicos se caracterizan por un potente antagonismo por el receptor de dopamina D2, los atípicos o de segunda generación exhiben un menor antagonismo D2 y un importante antagonismo por el receptor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> y en ocasiones, agonismo por el receptor 5-HT<sub>1A</sub>. De hecho, es por esta razón por la que se propone que estos fármacos de segunda generación son capaces de tratar la sintomatología esquizofrénica sin provocar graves trastornos extrapiramidales (Meltzer et al 1989a; Meltzer et al 1989b; Meltzer et al 1999; Kapur et al 1999; Millan 2000; Oerther and Ahlenius 2000; Svensson 2003; Meltzer 2004; Meltzer and Sumiyoshi 2008). Si bien es cierto que ambos tipos de fármacos, tanto clásicos como atípicos, muestran la capacidad de bloquear los síntomas psicóticos (Coyle and Tsai 2004), se ha descrito que los antipsicóticos atípicos poseen una mayor eficiencia en la mejora de los síntomas negativos y los déficits cognitivos de la enfermedad (Meltzer 1999; Kapur and Seeman 2001; Meltzer 2004).

Como hemos podido constatar, mientras que los antipsicóticos atípicos clozapina y olanzapina fueron capaces de bloquear el incremento de 5-HT y glutamato en la CPFm, los fármacos clásicos clorpromacina y haloperidol tan sólo pudieron bloquear el incremento de los niveles de glutamato. Esta capacidad común de bloquear el aumento de la liberación de glutamato cortical podría tener su sustrato anatómico en la habilidad de inhibir una subpoblación de neuronas piramidales de la CPF que presentan tanto clozapina como haloperidol (Homayoun and Moghaddam 2007a), quizás mediante el bloqueo de la neurotransmisión dopaminérgica pues ambos fármacos presentan antagonismo por el receptor D2. Todos los antipsicóticos actuales poseen algún grado de antagonismo D2 (Seeger et al 1995; Roth et al 1995; Bymaster et al 1996; Arnt and Skarsfeldt 1998; Lawler et al 1999) y se sabe que el bloqueo de estos receptores en la vía mesolímbica reduce los síntomas psicóticos (Kapur et al 2000), capacidad que se correlaciona con su afinidad por el receptor D2 (Seeman et al 1975; Creese et al 1996; Kapur and Mamo 2003). Por otro lado, aproximadamente sólo un 5% de las neuronas piramidales de capa V proyectan a los núcleos del rafe (Gabbott et al 2005). Siendo así, es posible que haloperidol y clorpromacina sean capaces de inhibir la excesiva actividad de las neuronas piramidales (bloqueo de glutamato) pero sin afectar a las neuronas de proyección al rafe o, en todo caso, siendo incapaces de inhibirlas con suficiente potencia como para bloquear la liberación cortical de serotonina. En cambio, el diferente y variado perfil farmacológico de la clozapina y la olanzapina (que estarían actuando sobre los receptores D1, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>,  $\alpha$ -adrenérgicos, H1, M1, etc. (Bymaster et al 1996; Arnt and Skarsfeldt 1998)), así como la distinta composición de receptores que presentan las neuronas piramidales de capa V (ricas en receptores serotoninérgicos como 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>) explicaría la capacidad de los antipsicóticos atípicos para modular estas neuronas piramidales, disminuyendo su actividad y, consecuentemente, la excesiva excitación sobre los núcleos del rafe, bloqueando así la liberación de 5-HT en la CPFm.

Estos datos sugieren que la neurotransmisión serotoninérgica cortical está regulada por la participación de diferentes sistemas de neurotransmisión (para los que clozapina y olanzapina presentarían mayor afinidad) mientras que la

transmisión glutamatérgica sería fuertemente dependiente de la actividad de los receptores de dopamina D2.

Así pues, el incremento de la neurotransmisión glutamatérgica en la CPFm sería representativo de los síntomas positivos de la esquizofrenia, aliviados por todos los antipsicóticos, posiblemente mediante la común capacidad de bloquear el receptor de dopamina D2. En cambio, las alteraciones en la transmisión serotoninérgica cortical estarían relacionadas con los síntomas negativos y cognitivos, para el tratamiento de los cuales los antipsicóticos atípicos muestran una eficiencia superior (lo que se reflejaría en su capacidad de modular los incrementos de 5-HT corticales tras la administración de antagonistas NMDA).

#### **4. ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIPSICÓTICOS**

Hasta ahora, hemos observado importantes diferencias existentes entre clásicos y atípicos. Es lógico pensar que la diferente capacidad para bloquear las alteraciones sobre el sistema serotoninérgico o glutamatérgico es debida al diferente perfil farmacológico de estos tipos de compuestos. Con este objetivo, realizamos una serie de experimentos estudiando el rol que juegan los diferentes receptores por los cuales estos fármacos presentan afinidad.

En un primer estudio mostramos que la administración sistémica de ritanserina (antagonista de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A/2C</sub>) y prazosín (antagonista de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos) era capaz de revertir el incremento de 5-HT cortical causado por la administración de PCP, aunque solo el prazosín era capaz de revertir el aumento causado por la administración de ketamina. El antagonismo hacia los receptores  $\alpha_1$  es común a clozapina y haloperidol y, a las dosis utilizadas, presentarían una ocupación parcial de este receptor (Chaki et al 1999) mientras que el prazosín sí ocuparía totalmente los receptores  $\alpha_1$  a la dosis sistémica usada (Patel et al 2001). Así pues, el resultado obtenido sugiere que las diferencias descritas entre típicos y atípicos no estarían justificadas por las acciones sobre este receptor.

Tras obtener los resultados que mostraban un efecto directo de los antipsicóticos en la propia CPFm suficiente para bloquear los efectos de los antagonistas NMDA, enfocamos los experimentos en la administración sistémica de MK-801 y la perfusión local a través de la sonda en corteza de distintos agonistas y antagonistas de los receptores candidatos para mediar las acciones de clozapina y haloperidol.

Una de las principales características de los fármacos antipsicóticos ha sido, desde su descubrimiento, el hecho de que todos presentan, en mayor o menor grado, antagonismo por el receptor de dopamina D2, siendo más marcado en los antipsicóticos clásicos donde se correlaciona con su efectividad clínica (Seeman et al 1975; Creese et al 1996; Kapur and Mamo 2003) y menos en los atípicos donde parte de su acción se ejerce por el antagonismo 5-HT<sub>2A</sub> (Kapur and Seeman 2001;

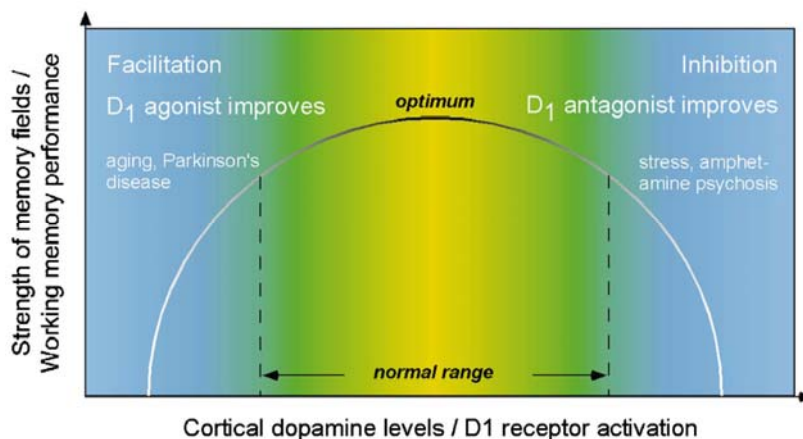
Meltzer 2004). En el modelo de los antagonistas NMDA se ha descrito una hiperdopaminergia cortical, quizás responsable de la activación de una subpoblación de neuronas piramidales de corteza y consecuentemente de un incremento de la liberación de glutamato (Wang and Goldman-Rakic 2004).

Con el fin de estudiar el papel del antagonismo D2 en el modelo de los antagonistas NMDA, se utilizaron dos antagonistas selectivos de este receptor: raclopride y eticlopride. Su perfusión local en la CPFm mostró los mismos resultados observados en el caso del haloperidol y la clorpromacina, fueron capaces de bloquear el incremento de glutamato pero no las alteraciones sobre la 5-HT. Esta observación sigue en línea con la hipótesis propuesta de que el antagonismo D2 en corteza ejerce una importante regulación de los niveles de glutamato pero sin afectar las proyecciones hacia los núcleos del rafe.

En la corteza prefrontal los receptores dopaminérgicos se encuentran tanto en las neuronas piramidales como en las interneuronas GABAérgicas (Vincent et al 1995; Khan et al 1998; Le Moine and Gaspar 1998; Santana et al 2009). Además de la expresión de estos receptores, estas células son inervadas por las proyecciones dopaminérgicas (Sesack et al 1998; Benes 2000). Entre los diferentes tipos de interneurona, se ha demostrado que la dopamina actúa preferentemente en aquellas que contienen parvalbúmina (PV) (Le Moine and Gaspar 1998; Gorelova et al 2002), es decir, neuronas en cesto y en candelabro que modulan la sección perisomática de las neuronas piramidales (Benes and Berretta 2001; DeFelipe et al 2001). Como se ha citado anteriormente, la administración de los antagonistas NMDA provocaría una liberación de dopamina incrementada en la CPFm. Este exceso de dopamina actuaría sobre sus receptores D2, inhibiendo estas interneuronas GABAérgicas (Seamans et al 2001; Gao et al 2003), las cuales es posible que estuvieran ya previamente inhibidas por la acción de los antagonistas NMDA. En esta situación, un antagonista D2 bloquearía este excesivo flujo inhibitorio sobre las interneuronas corticales, permitiendo así la recuperación de la funcionalidad de estas células, elevando la liberación cortical de GABA y consecuentemente, reduciendo la incrementada liberación de glutamato por parte de las neuronas piramidales.

Un receptor que ha recibido creciente atención es el D<sub>4</sub>. Su localización en estructuras límbicas asociadas con la regulación del estado anímico y la cognición como son córtex e hipocampo (Lahti et al 1996; Mrzljak et al 1996), junto con el hecho de que la clozapina y la olanzapina presentan afinidad por este receptor, lo hacen una diana potencial para futuros tratamientos antipsicóticos (**figura 13**). La administración cortical de su antagonista, el L-745870, bloqueó el incremento de glutamato pero no el de 5-HT. Pese a que se ha descrito la presencia de este receptor tanto en neuronas piramidales como en GABAérgicas (Mrzljak et al 1996; Khan et al 1998; Wedzony et al 2000), nuestros resultados son consistentes con su presencia este último tipo neuronal.

A parte de los receptores inhibidores D2, los efectos de la dopamina en corteza pueden ser mediados también por el receptor activador D1. A parte de su expresión en neuronas piramidales corticales de capas profundas (Bergson et al 1995; Davidoff and Benes 1998; Santana et al 2009), estos receptores están también expresados en interneuronas GABAérgicas parvalbúmina positivas (Le Moine and Gaspar 1998; Davidoff and Benes 1998; Glausier et al 2008; Santana et al 2009). De los dos subtipos que engloba esta familia, el D<sub>1</sub> y el D<sub>5</sub>, es el D<sub>1</sub> el que parece predominante en las interneuronas PV corticales (Muly, III et al 1998; Glausier et al 2008). Se ha descrito que los agonistas D1 incrementan la transmisión dopaminérgica cortical, y se postula que esta es la razón por la cual presentan la capacidad de mejorar los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (Abi-Dargham 2003; Goldman-Rakic et al 2004), situación donde puede estar dándose una disminución de esta transmisión dopaminérgica cortical. Con bajos niveles de dopamina y de activación del receptor D1 nos encontraríamos con un menor rendimiento de la memoria operativa. En este caso, un agonista D1 sería capaz de instaurar una función dopaminérgica normal, mejorando así la eficacia de la memoria operativa (**figura 20**) y de la sintomatología negativa/cognitiva.



**Figura 20** - Gráfica mostrando la eficiencia de la memoria operativa según el nivel de activación de los receptores D1 corticales, extraído de (Goldman-Rakic et al 2000).

Nuestros resultados muestran que la perfusión local del agonista D1 SKF-38393 produce unos efectos comparables a los antagonistas D2, es decir, la capacidad de bloquear el incremento de glutamato tras la administración de MK-801. Aunque en este caso, cuando la concentración del fármaco se aumentó hasta 100  $\mu$ M, fue capaz de evitar el aumento de serotonina en la CPFm. Este hecho podría estar relacionado con la citada capacidad de este tipo de fármacos de mejorar los síntomas negativos y cognitivos, aunque parece necesaria una concentración suficientemente alta para ello.

En todo caso, teniendo en cuenta que el receptor D1 es excitatorio, el hecho de que un agonista sea capaz de bloquear un incremento en la actividad neuronal

es difícil de explicar por un efecto directo sobre la neurona piramidal. Como se ha comentado previamente, la presencia de receptores D1 en interneuronas GABAérgicas PV positivas puede ser el sustrato anatómico para sus efectos: la unión del agonista D1 a estas interneuronas incrementaría su nivel de actividad aumentando así la inhibición GABAérgica sobre las neuronas piramidales, frenando de esta forma su hiperexcitación y la excesiva liberación de glutamato producida por el MK-801.

Como se ha dicho anteriormente, una de las principales características de los antipsicóticos atípicos es el antagonismo por el receptor de serotonina 5-HT<sub>2A</sub> (Meltzer 2004). De hecho, es precisamente su afinidad por los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>, junto con la menor acción sobre los receptores D2 la que se ha postulado como pieza clave para su capacidad de mejorar los síntomas negativos y cognitivos de la esquizofrenia (Meltzer et al 1999; Millan 2000; Meltzer and Sumiyoshi 2008). Además, su acción sobre el receptor 5-HT<sub>2A</sub> les permitiría realizar su efecto terapéutico sin necesidad de tanto bloqueo dopaminérgico como los fármacos clásicos, evitando así la aparición de los síntomas extrapiramidales.

A diferencia de lo observado con la perfusión de los antagonistas D2, la administración local del antagonista 5-HT<sub>2A</sub> M100907 bloqueó los incrementos de 5-HT y de glutamato provocados por el MK-801. Esto concuerda con la capacidad de clozapina y olanzapina de revertir estas mismas alteraciones, que podrían ser en parte mediadas por este receptor. El bloqueo de un receptor activador como es el 5-HT<sub>2A</sub> produciría una inhibición de la actividad de la neurona piramidal, frenando así la excitación provocada por el MK-801 y disminuyendo de esta forma los niveles de serotonina y glutamato.

Estudios previos mostraron que el antagonismo 5-HT<sub>2A</sub> es capaz de bloquear otras situaciones donde se da una hiperactivación de la transmisión cortical serotoninérgica como es la desinhibición talámica, la administración de DOI o la perfusión cortical de S-AMPA (Amargos-Bosch et al 2003; Amargos-Bosch et al 2004; Amargos-Bosch et al 2007). Estos receptores se encuentran localizados en las dendritas apicales de neuronas piramidales de capa V (Willins et al 1997; Cornea-Hebert et al 1999), las cuales están involucradas en la integración de la información cognitiva y perceptual proveniente de otras regiones corticales. Además, están presentes en las neuronas que proyectan a los núcleos del rafe, lo cual constituiría el sustrato anatómico para la disminución de serotonina cortical al parar la actividad de estas neuronas (Vázquez-Borsetti et al 2008). Así pues, están en una posición privilegiada para mediar los efectos de los antipsicóticos y reducir la incrementada transmisión cortical provocada por los antagonistas NMDA. Se ha descrito la expresión de estos receptores también en las interneuronas GABAérgicas de corteza (Willins et al 1997; Santana et al 2004), pero los citados resultados indican un efecto predominante del M100907 sobre los receptores localizados en neuronas piramidales.

A parte del receptor 5-HT<sub>2A</sub>, se especula un posible efecto terapéutico por parte del receptor 5-HT<sub>1A</sub>. Antipsicóticos atípicos como la clozapina presentan agonismo por este receptor *in vivo* lo cual podría estar relacionado con una mejora

de los síntomas negativos y cognitivos (Millan 2000). La perfusión cortical del agonista 5-HT<sub>1A</sub> BAYx3207 fue capaz de bloquear el incremento en serotonina y glutamato provocados por MK-801. La localización celular de estos receptores, densamente expresados en el cono axónico de las neuronas piramidales (Czyrak et al 2003) y, consecuentemente, ejerciendo un fuerte control sobre la generación del potencial de acción, aportarían el sustrato anatómico para los resultados obtenidos. Así pues, un agonismo sobre estos receptores inhibidores sería capaz de bloquear la actividad piramidal y de este modo revertir la excesiva excitación neuronal tras el efecto de los antagonistas NMDA. El receptor 5-HT<sub>1A</sub> colocaliza (aproximadamente un 80% en CFPm) (Amargos-Bosch et al 2004) con el receptor 5-HT<sub>2A</sub> y se encuentra altamente expresado en neuronas piramidales (Santana et al 2004). Aunque también se encuentran en interneuronas GABAérgicas (Willins et al 1997; Aznar et al 2003; Santana et al 2004), los resultados obtenidos sugieren un efecto predominante sobre los receptores situados en neuronas piramidales.

La mayoría de los antipsicóticos presentan afinidad por el receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico. Este receptor activador se encuentra expresado en las mismas áreas corticales que el 5-HT<sub>2A</sub> (Pieribone et al 1994; Day et al 1997; Domyancic and Morilak 1997), con el que comparte el mismo mecanismo de transducción de la señal (la activación de la fosfolipasa C) y median, respectivamente, las acciones excitatorias de la 5-HT y la noradrenalina (Araneda and Andrade 1991; Marek and Aghajanian 1999). Así pues, la administración cortical de su antagonista, prazosín, fue capaz de evitar el incremento tanto de serotonina como de glutamato. Una vez más, este efecto parece mediado por el bloqueo de los receptores  $\alpha_1$  de la neurona piramidal, frenando de esta forma la hiperactivación inducida por el MK-801.

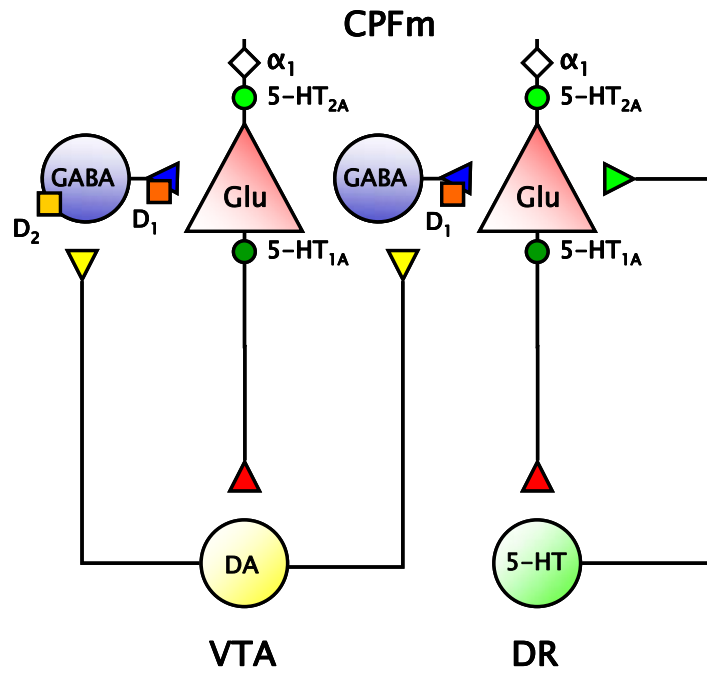
Nuestros primeros resultados sugerían que la excesiva neurotransmisión glutamatérgica cortical (provocada por la administración de MK-801) está posiblemente asociada con algunos de los síntomas positivos de la esquizofrenia, síntomas tratados por todos los antipsicóticos los cuales presentan un común antagonismo por el receptor de dopamina D2. Asimismo, las alteraciones en la neurotransmisión serotoninérgica en CFPm pueden estar relacionadas con los síntomas negativos y los déficits cognitivos, tratados con mejor eficacia por los antipsicóticos atípicos. Se ha propuesto que esta habilidad está relacionada con el antagonismo 5-HT<sub>2A</sub>/agonismo 5-HT<sub>1A</sub> que exhiben fármacos como la clozapina. Ésta, por un mecanismo precisamente dependiente de la presencia de receptores 5-HT<sub>1A</sub> intactos (Díaz-Mataix et al 2005; Bortolozzi et al 2007), provoca un incremento en los niveles de dopamina cortical (Pehek and Yamamoto 1994; Rollema et al 1997; Ichikawa et al 2001; Assie et al 2005; Díaz-Mataix et al 2005; Bortolozzi et al 2007) que se sugiere implicado en la mejoría de los síntomas negativos y cognitivos (Rollema et al 1997; Kuroki et al 1999; Rollema et al 2000; Ichikawa et al 2001). A pesar de estos datos, si tenemos en cuenta que fármacos como la olanzapina no muestran ese agonismo 5-HT<sub>1A</sub> (**figura 13**), es posible que este receptor esté implicado en una mejora de la sintomatología pero no ejerza una acción antipsicótica por si mismo (Millan 2000).



En todo caso, la administración cortical de M100907, BAYx3702 y prazosín fue capaz de bloquear los incrementos tanto de serotonina como de glutamato producidos por el MK-801. Este efecto puede asociarse a una acción directa sobre la neurona piramidal, reduciendo su excitabilidad y, consecuentemente, inhibiendo la excesiva neurotransmisión glutamatérgica. Como muestra la capacidad de bloquear las alteraciones serotoninérgicas, estos fármacos también estarían inhibiendo la subpoblación de neuronas piramidales que proyectan a los núcleos del rafe, disminuyendo así la entrada excitatoria desde CPFm (Celada et al 2001). De esta manera, es posible que un antagonismo 5-HT<sub>2A</sub> y  $\alpha_1$ -adrenérgico, así como un antagonismo 5-HT<sub>1A</sub>, puedan estar relacionados con una mejora en la sintomatología negativa/cognitiva. En todo caso, es probable que las acciones de clozapina y olanzapina sobre la neurotransmisión serotoninérgica cortical estén mediadas por los efectos sobre estos receptores.

En cambio, los antagonistas del receptor D2 raclopride y eticlopride y del receptor D4 L-745870 solo fueron capaces de bloquear el incremento de glutamato provocado por el antagonista NMDA. Estos efectos pueden atribuirse a un incremento de la inhibición cortical, es decir, que actuarían directamente en las interneuronas GABAérgicas corticales, aumentando su actividad. El bloqueo del receptor D2 liberaría a la neurona GABAérgica de la acción inhibitoria de una transmisión dopaminérgica incrementada por los antagonistas NMDA, permitiendo la recuperación de su funcionalidad y la consecuente disminución de la excesiva actividad piramidal y de la neurotransmisión glutamatérgica. Es posible que estas neuronas GABAérgicas sobre las que actuarían los antagonistas D2 estén inhibidas directamente por el antagonismo NMDA, pero los presentes resultados no nos permiten saber si son las mismas interneuronas o no. De la misma manera, el agonista del receptor D1, SKF-38393, aumentaría la actividad de la interneurona GABAérgica, reestableciendo su capacidad de inhibir la sincronía cortical. El hecho de que este agonismo sea capaz de, a dosis elevadas, bloquear el incremento en la neurotransmisión serotoninérgica cortical, sugiere que los receptores D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub> se encuentran localizados en interneuronas que controlan la proyección excitatoria de CPFm a los núcleos del rafe. En todo caso, este efecto podría estar relacionado con la acción procognitiva que se le atribuye al agonismo D1, acción que podría estar dándose también en el mecanismo de actuación de la clozapina (Ahlenius 1999; Oerther and Ahlenius 2000) (**figura 21**).

Es importante remarcar que, a pesar de la capacidad para evitar los efectos del antagonismo NMDA sobre la transmisión cortical de 5-HT y glutamato, estos compuestos no presentan por si mismos acción antipsicótica, con lo que es lógico pensar que es necesario un efecto combinado para lograr una posible mejora terapéutica.



**Figura 21** – Esquema que muestra la posible localización de los receptores estudiados. Mientras que el efecto final sobre los receptores D1 y D2 encaja con un incremento de la actividad GABAérgica, los compuestos que actúan sobre los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y  $\alpha_1$ -adrenérgicos estarían disminuyendo la excesiva actividad piramidal. Los compuestos con capacidad de disminuir el incremento serotoninérgico actuarían en una subpoblación piramidal que estaría proyectando a los núcleos del rafe.

## VI. CONCLUSIONES

- 1- Los antagonistas no competitivos del receptor NMDA provocan un incremento de la transmisión serotoninérgica y glutamatérgica en la corteza prefrontal dependiente de la excitación de los receptores AMPA/kainato. Estas alteraciones estarían reflejando un incremento de la actividad de las neuronas piramidales corticales.
- 2- La administración bilateral (pero no unilateral) de MK-801 en la corteza prefrontal es capaz de reproducir el incremento de la concentración extracelular de serotonina en esta región. Esto sugiere una acción local de los antagonistas NMDA en corteza, posiblemente bloqueando las interneuronas GABAérgicas y desinhibiendo así las neuronas piramidales corticales.
- 3- Los fármacos antipsicóticos atípicos utilizados (clozapina y olanzapina) son capaces de revertir las alteraciones de los antagonistas NMDA sobre la liberación de serotonina y glutamato en la corteza prefrontal, mientras que los antipsicóticos clásicos (haloperidol y clorpromacina) sólo revierten el incremento de glutamato. El hecho de que la perfusión local de estos fármacos antipsicóticos tenga el mismo efecto que su administración sistémica indica que la corteza es un sitio de acción clave para estos fármacos.
- 4- Las diferencias observadas entre antipsicóticos clásicos y atípicos sugieren que un incremento en la transmisión glutamatérgica cortical, fuertemente regulada por el receptor D2, estaría relacionado con los síntomas positivos, tratados por todos los antipsicóticos. En cambio, la alteración en la transmisión serotoninérgica, más regulada por interacciones con receptores como el 5-HT<sub>1A</sub> y el 5-HT<sub>2A</sub>, estaría vinculada con los síntomas negativos/cognitivos, donde muestran mayor eficiencia los antipsicóticos atípicos.

- 5- Los resultados sugieren que los compuestos que actúan sobre los receptores dopaminérgicos estarían incrementando la inhibición cortical, restaurando los niveles de actividad de las interneuronas GABAérgicas. Los compuestos con afinidad por los receptores serotoninérgicos y noradrenérgicos realizarían su acción sobre las neuronas piramidales, bloqueando su hiperactividad tras la administración de antagonistas NMDA.
  
- 6- Pese a que los agonistas y antagonistas utilizados han mostrado la capacidad de bloquear las alteraciones producidas por el antagonista NMDA, MK-801, estos compuestos carecen de efecto antipsicótico por sí solos. Es posible que para lograr un efecto terapéutico sea necesaria la combinación de sus acciones individuales así como la interacción con otros sistemas de neurotransmisores.

En resumen, teniendo en cuenta el efecto local de los antagonistas NMDA en la corteza prefrontal y que su administración provoca un incremento en la actividad de esta región, junto con el hecho de que la reversión de estos efectos se realiza por una acción local de los fármacos antipsicóticos en la propia corteza, los resultados obtenidos muestran la importancia de la corteza prefrontal en este modelo de esquizofrenia así como en su tratamiento.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

### A

- Abi-Dargham A (2003): Probing cortical dopamine function in schizophrenia: what can D1 receptors tell us? *World Psychiatry* 2: 166–171.
- Abi-Dargham A (2007): Alterations of serotonin transmission in schizophrenia. *Int.Rev.Neurobiol.* 78: 133–164.
- Abi-Dargham A; Mawlawi O; Lombardo I; Gil R; Martinez D; Huang Y; Hwang DR; Keilp J; Kochan L; Van Heertum R; Gorman JM and Laruelle M (2002): Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *J.Neurosci.* 22: 3708–3719.
- Abi-Dargham A; Rodenhiser J; Printz D; Zea-Ponce Y; Gil R; Kegeles LS; Weiss R; Cooper TB; Mann JJ; Van Heertum RL; Gorman JM and Laruelle M (2000): Increased baseline occupancy of D2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 8104–8109.
- Abi-Saab WM; D'Souza DC; Moghaddam B and Krystal JH (1998): The NMDA antagonist model for schizophrenia: promise and pitfalls. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 2: 104–109.
- Adams B and Moghaddam B (1998): Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. *J.Neurosci.* 18: 5545–5554.
- Adams BW and Moghaddam B (2001): Effect of clozapine, haloperidol, or M100907 on phencyclidine-activated glutamate efflux in the prefrontal cortex. *Biol.Psychiatry* 50: 750–757.
- Adell A and Artigas F (1998): A microdialysis study of the in vivo release of 5-HT in the median raphe nucleus of the rat. *Br.J.Pharmacol.* 125: 1361–1367.
- Adell A; Carceller A and Artigas F (1991): Regional distribution of extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in the brain of freely moving rats. *J.Neurochem.* 56: 709–712.
- Aghajanian GK and Marek GJ (1997): Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. *Neuropharmacology* 36: 589–599.
- Aghajanian GK and Marek GJ (1999a): Serotonin and hallucinogens. *Neuropsychopharmacology* 21: 16S–23S.

- Aghajanian GK and Marek GJ (1999b): Serotonin, via 5-HT<sub>2A</sub> 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 and Marek GJ (2000): Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 31: 302–312.
- Aghajanian GK and Wang RY (1977): Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique. *Brain Res.* 122: 229–242.
- Ahlenius S (1999): Clozapine: dopamine D<sub>1</sub> receptor agonism in the prefrontal cortex as the code to decipher a Rosetta stone of antipsychotic drugs. *Pharmacol. Toxicol.* 84: 193–196.
- Albert KA; Hemmings HC, Jr.; Adamo AI; Potkin SG; Akbarian S; Sandman CA; Cotman CW; Bunney WE, Jr. and Greengard P (2002): Evidence for decreased DARPP-32 in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 59: 705–712.
- Amargos-Bosch M; Adell A and Artigas F (2007): Antipsychotic drugs reverse the AMPA receptor-stimulated release of 5-HT in the medial prefrontal cortex. *J. Neurochem.* 102: 550–561.
- Amargos-Bosch M; Adell A; Bortolozzi A and Artigas F (2003): Stimulation of alpha<sub>1</sub>-adrenoceptors in the rat medial prefrontal cortex increases the local in vivo 5-hydroxytryptamine release: reversal by antipsychotic drugs. *J. Neurochem.* 87: 831–842.
- Amargos-Bosch M; Bortolozzi A; Puig MV; Serrats J; Adell A; Celada P; Toth M; Mengod G and Artigas F (2004): Co-expression and in vivo interaction of serotonin<sub>1A</sub> and serotonin<sub>2A</sub> 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 and Hichwa RD (1997): Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naïve patients. *Lancet* 349: 1730–1734.
- Andreasen NC; Rezai K; Alliger R; Swayze VW; Flaum M; Kirchner P; Cohen G and O'Leary DS (1992): Hypofrontality in neuroleptic-naïve patients and in patients with chronic schizophrenia. Assessment with xenon 133 single-photon emission computed tomography and the Tower of London. *Arch. Gen. Psychiatry* 49: 943–958.
- Araneda R and Andrade R (1991): 5-Hydroxytryptamine<sub>2</sub> and 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 40: 399–412.

- Arnsten AF (2004): Adrenergic targets for the treatment of cognitive deficits in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 174: 25–31.
- Arnt J and Skarsfeldt T (1998): Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. *Neuropsychopharmacology* 18: 63–101.
- Ashby CR, Jr.; Edwards E and Wang RY (1994): Electrophysiological evidence for a functional interaction between 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptors in the rat medial prefrontal cortex: an iontophoretic study. *Synapse* 17: 173–181.
- Assie MB; Ravailhe V; Faucillon V and Newman–Tancredi A (2005): Contrasting contribution of 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation to neurochemical profile of novel antipsychotics: frontocortical dopamine and hippocampal serotonin release in rat brain. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 315: 265–272.
- Aultman JM and Moghaddam B (2001): Distinct contributions of glutamate and dopamine receptors to temporal aspects of rodent working memory using a clinically relevant task. *Psychopharmacology (Berl)* 153: 353–364.
- Aydin K; Uçok A and Guler J (2008): Altered metabolic integrity of corpus callosum among individuals at ultra high risk of schizophrenia and first-episode patients. *Biol.Psychiatry* 64: 750–757.
- Azmitia EC; Gannon PJ; Kheck NM and Whitaker–Azmitia PM (1996): Cellular localization of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor in primate brain neurons and glial cells. *Neuropsychopharmacology* 14: 35–46.
- Aznar S; Qian Z; Shah R; Rahbek B and Knudsen GM (2003): The 5-HT<sub>1A</sub> serotonin receptor is located on calbindin- and parvalbumin-containing neurons in the rat brain. *Brain Res.* 959: 58–67.
- 
- B**
- Barbas H and Blatt GJ (1995): Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus* 5: 511–533.
- Beckstead RM (1979): An autoradiographic examination of corticocortical and subcortical projections of the mediodorsal-projection (prefrontal) cortex in the rat. *J.Comp Neurol.* 184: 43–62.
- Behrendt RP (2006): Dysregulation of thalamic sensory "transmission" in schizophrenia: neurochemical vulnerability to hallucinations. *J.Psychopharmacol.* 20: 356–372.

- Beique JC; Imad M; Mladenovic L; Gingrich JA and Andrade R (2007): Mechanism of the 5-hydroxytryptamine 2A receptor-mediated facilitation of synaptic activity in prefrontal cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104: 9870–9875.
- Benes FM (2000): Emerging principles of altered neural circuitry in schizophrenia. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 31: 251–269.
- Benes FM and Berretta S (2001): GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 25: 1–27.
- Benson DL; Isackson PJ; Gall CM and Jones EG (1992): Contrasting patterns in the localization of glutamic acid decarboxylase and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin protein kinase gene expression in the rat central nervous system. *Neuroscience* 46: 825–849.
- Bentivoglio M; Spreafico R; Minciacchi D and Macchi G (1991): GABAergic interneurons and neuropil of the intralaminar thalamus: an immunohistochemical study in the rat and the cat, with notes in the monkey. *Exp.Brain Res.* 87: 85–95.
- Bergson C; Mrzljak L; Smiley JF; Pappy M; Levenson R and Goldman-Rakic PS (1995): Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J.Neurosci.* 15: 7821–7836.
- Blackwood DH; Fordyce A; Walker MT; St Clair DM; Porteous DJ and Muir WJ (2001): Schizophrenia and affective disorders--cosegregation with a translocation at chromosome 1q42 that directly disrupts brain-expressed genes: clinical and P300 findings in a family. *Am.J.Hum.Genet.* 69: 428–433.
- Borrell J; Vela JM; Arevalo-Martin A; Molina-Holgado E and Guaza C (2002): Prenatal immune challenge disrupts sensorimotor gating in adult rats. Implications for the etiopathogenesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 26: 204–215.
- Bortolozzi A; Amargos-Bosch M; Adell A; Diaz-Mataix L; Serrats J; Pons S and 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.
- Bortolozzi A; Diaz-Mataix L; Scorza MC; Celada P and Artigas F (2005): The activation of 5-HT receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. *J.Neurochem.* 95: 1597–1607.
- Bortolozzi A; Diaz-Mataix L; Toth M; Celada P and Artigas F (2007): In vivo actions of aripiprazole on serotonergic and dopaminergic systems in rodent brain. *Psychopharmacology (Berl)* 191: 745–758.



- Bowers MB, Jr. and Freedman DX (1966): "Psychedelic" experiences in acute psychoses. *Arch.Gen.Psychiatry* 15: 240–248.
- Branchereau P; Van Bockstaele EJ; Chan J and Pickel VM (1996): Pyramidal neurons in rat prefrontal cortex show a complex synaptic response to single electrical stimulation of the locus coeruleus region: evidence for antidromic activation and GABAergic inhibition using in vivo intracellular recording and electron microscopy. *Synapse* 22: 313–331.
- Brodman K (1909). Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnhinde. Leipzig.
- Brown R; Colter N; Corsellis JA; Crow TJ; Frith CD; Jagoe R; Johnstone EC and Marsh L (1986): Postmortem evidence of structural brain changes in schizophrenia. Differences in brain weight, temporal horn area, and parahippocampal gyrus compared with affective disorder. *Arch.Gen.Psychiatry* 43: 36–42.
- Buck N; Cali S and Behr J (2006): Enhancement of long-term potentiation at CA1–subiculum synapses in MK–801–treated rats. *Neurosci.Lett.* 392: 5–9.
- Bymaster FP; Calligaro DO; Falcone JF; Marsh RD; Moore NA; Tye NC; Seeman P and Wong DT (1996): Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacology* 14: 87–96.
- 
- C
- Calcagno E; Carli M and Invernizzi RW (2006): The 5-HT(1A) receptor agonist 8-OH-DPAT prevents prefrontocortical glutamate and serotonin release in response to blockade of cortical NMDA receptors. *J.Neurochem.* 96: 853–860.
- Callado LF; Hopwood SE; Hancock PJ and Stamford JA (2000): Effects of dizocilpine (MK 801) on noradrenaline, serotonin and dopamine release and uptake. *Neuroreport* 11: 173–176.
- Cardno AG; Marshall EJ; Coid B; Macdonald AM; Ribchester TR; Davies NJ; Venturi P; Jones LA; Lewis SW; Sham PC; Gottesman II; Farmer AE; McGuffin P; Reveley AM and Murray RM (1999): Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series. *Arch.Gen.Psychiatry* 56: 162–168.
- Carli M; Baviera M; Invernizzi RW and Balducci C (2006): Dissociable contribution of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in the medial prefrontal cortex to different aspects of executive control such as impulsivity and compulsive perseveration in rats. *Neuropsychopharmacology* 31: 757–767.
- Carlsson A (1988): The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1: 179–186.

- Carr DB; O'Donnell P; Card JP and Sesack SR (1999): Dopamine terminals in the rat prefrontal cortex synapse on pyramidal cells that project to the nucleus accumbens. *J.Neurosci.* 19: 11049–11060.
- Carr DB and Sesack SR (1996): Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals. *J.Comp Neurol.* 369: 1–15.
- Carr DB and Sesack SR (1998): Callosal terminals in the rat prefrontal cortex: synaptic targets and association with GABA-immunoreactive structures. *Synapse* 29: 193–205.
- Carr DB and Sesack SR (2000a): GABA-containing neurons in the rat ventral tegmental area project to the prefrontal cortex. *Synapse* 38: 114–123.
- Carr DB and 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.
- Cassaday HJ; Horsley RR and Norman C (2005): Electrolytic lesions to nucleus accumbens core and shell have dissociable effects on conditioning to discrete and contextual cues in aversive and appetitive procedures respectively. *Behav.Brain Res.* 160: 222–235.
- Cavada C and Goldman-Rakic PS (1989a): Posterior parietal cortex in rhesus monkey: I. Parcellation of areas based on distinctive limbic and sensory corticocortical connections. *J.Comp Neurol.* 287: 393–421.
- Cavada C and Goldman-Rakic PS (1989b): Posterior parietal cortex in rhesus monkey: II. Evidence for segregated corticocortical networks linking sensory and limbic areas with the frontal lobe. *J.Comp Neurol.* 287: 422–445.
- Ceglia I; Carli M; Baviera M; Renoldi G; Calcagno E and Invernizzi RW (2004): The 5-HT receptor antagonist M100,907 prevents extracellular glutamate rising in response to NMDA receptor blockade in the mPFC. *J.Neurochem.* 91: 189–199.
- Celada P; Castañé A; Adell A; Artigas F (2007). Modeling Schizophrenia in Experimental Animals. In: Antidepressants, Antipsychotics, Anxiolytics, from chemistry and pharmacology to clinical application. Buschmann H, Díaz JL, Holenz J, Párraga A, Torrens A, Vela JM (eds.) Wiley-VCH, Germany, pp 449–490.
- Celada P; Puig MV; Casanovas JM; Guillazo G and 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.

- Chaki S; Funakoshi T; Yoshikawa R; Okuyama S; Kumagai T; Nakazato A; Nagamine M and Tomisawa K (1999): In vivo receptor occupancy of NRA0045, a putative atypical antipsychotic, in rats. *Neuropharmacology* 38: 1185–1194.
- Cho RY; Konecky RO and Carter CS (2006): Impairments in frontal cortical gamma synchrony and cognitive control in schizophrenia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103: 19878–19883.
- Chou YH; Halldin C and Farde L (2003): Occupancy of 5-HT<sub>1A</sub> receptors by clozapine in the primate brain: a PET study. *Psychopharmacology (Berl)* 166: 234–240.
- Churchill L; Zahm DS and Kalivas PW (1996): The mediodorsal nucleus of the thalamus in rats--I. forebrain gabaergic innervation. *Neuroscience* 70: 93–102.
- Cobb SR; Buhl EH; Halasy K; Paulsen O and Somogyi P (1995): Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378: 75–78.
- Cochran SM; Kennedy M; McKerchar CE; Steward LJ; Pratt JA and Morris BJ (2003): Induction of metabolic hypofunction and neurochemical deficits after chronic intermittent exposure to phencyclidine: differential modulation by antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacology* 28: 265–275.
- Conde F; Audinat E; Maire-Lepoivre E and Crepel F (1990): Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. A study using retrograde transport of fluorescent dyes. I. Thalamic afferents. *Brain Res.Bull.* 24: 341–354.
- Cornea-Hebert V; Riad M; Wu C; Singh SK and Descarries L (1999): Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor in the central nervous system of adult rat. *J.Comp Neurol.* 409: 187–209.
- Coyle JT (2004): The GABA–glutamate connection in schizophrenia: which is the proximate cause? *Biochem.Pharmacol.* 68: 1507–1514.
- Coyle JT (2006): Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis. *Cell Mol.Neurobiol.* 26: 365–384.
- Coyle JT and Tsai G (2004): The NMDA receptor glycine modulatory site: a therapeutic target for improving cognition and reducing negative symptoms in schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 174: 32–38.
- Creese I; Burt DR and Snyder SH (1996): Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *J.Neuropsychiatry Clin.Neurosci.* 8: 223–226.

Cruz DA; Eggan SM; Azmitia EC and Lewis DA (2004): Serotonin1A receptors at the axon initial segment of prefrontal pyramidal neurons in schizophrenia. *Am.J.Psychiatry* 161: 739–742.

Cull–Candy S; Brickley S and Farrant M (2001): NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr.Opin.Neurobiol.* 11: 327–335.

Cummings JL (1993): Frontal–subcortical circuits and human behavior. *Arch.Neurol.* 50: 873–880.

Czyrak A; Czepiel K; Mackowiak M; Chocyk A and Wedzony K (2003): Serotonin 5-HT1A receptors might control the output of cortical glutamatergic neurons in rat cingulate cortex. *Brain Res.* 989: 42–51.

---

## D

Daniel DG; Zimbroff DL; Potkin SG; Reeves KR; Harrigan EP and Lakshminarayanan M (1999): Ziprasidone 80 mg/day and 160 mg/day in the acute exacerbation of schizophrenia and schizoaffective disorder: a 6-week placebo-controlled trial. Ziprasidone Study Group. *Neuropsychopharmacology* 20: 491–505.

Davidoff SA and Benes FM (1998): High-resolution scatchard analysis shows D1 receptor binding on pyramidal and nonpyramidal neurons. *Synapse* 28: 83–90.

Davis KL; Kahn RS; Ko G and Davidson M (1991): Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization. *Am.J.Psychiatry* 148: 1474–1486.

Day HE; Campeau S; Watson SJ, Jr. and Akil H (1997): Distribution of alpha 1a-, alpha 1b- and alpha 1d-adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. *J.Chem.Neuroanat.* 13: 115–139.

DeFelipe J (2002): Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog.Brain Res.* 136: 215–238.

DeFelipe J; Arellano JI; Gomez A; Azmitia EC and Munoz A (2001): Pyramidal cell axons show a local specialization for GABA and 5-HT inputs in monkey and human cerebral cortex. *J.Comp Neurol.* 433: 148–155.

DeFelipe J; Hendry SH; Hashikawa T and Jones EG (1991): Synaptic relationships of serotonin-immunoreactive terminal baskets on GABA neurons in the cat auditory cortex. *Cereb.Cortex* 1: 117–133.

DeFrance JF; Marchand JF; Sikes RW; Chronister RB and Hubbard JI (1985): Characterization of fimbria input to nucleus accumbens. *J.Neurophysiol.* 54: 1553–1567.

DeFrance JF and Yoshihara H (1975): Fimbria input to the nucleus accumbens septi. *Brain Res.* 90: 159–163.

- Degenetais E; Thierry AM; Glowinski J and Gioanni Y (2003): Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cereb.Cortex* 13: 782–792.
- Diaz–Mataix L; Scorza MC; Bortolozzi A; Toth M; Celada P and Artigas F (2005): Involvement of 5-HT1A receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action. *J.Neurosci.* 25: 10831–10843.
- Domyancic AV and Morilak DA (1997): Distribution of alpha1A adrenergic receptor mRNA in the rat brain visualized by in situ hybridization. *J.Comp Neurol.* 386: 358–378.
- Drevets WC (2000): Functional anatomical abnormalities in limbic and prefrontal cortical structures in major depression. *Prog.Brain Res.* 126: 413–431.
- Drevets WC (2001): Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive–emotional features of mood disorders. *Curr.Opin.Neurobiol.* 11: 240–249.

## E

- Ellenbroek BA (1991). The ethological analysis of monkeys in a social setting as an animal model of schizophrenia. In: Animal models in psychopharmacology. Olivier B, Mos J, Slangen JL, eds. Birkhäuser, Basel, pp 265–284
- Ellenbroek BA (1993): Treatment of schizophrenia: a clinical and preclinical evaluation of neuroleptic drugs. *Pharmacol.Ther.* 57: 1–78.
- Ellenbroek BA; Budde S and Cools AR (1996): Prepulse inhibition and latent inhibition: the role of dopamine in the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 75: 535–542.
- Ellenbroek BA and Cools AR (1990): Animal models with construct validity for schizophrenia. *Behav.Pharmacol.* 1: 469–490.

## F

- Farde L; Wiesel FA; Halldin C and Sedvall G (1988): Central D2–dopamine receptor occupancy in schizophrenic patients treated with antipsychotic drugs. *Arch.Gen.Psychiatry* 45: 71–76.
- Fienberg AA; Hiroi N; Mermelstein PG; Song W; Snyder GL; Nishi A; Cheramy A; O'Callaghan JP; Miller DB; Cole DG; Corbett R; Haile CN; Cooper DC; Onn SP; Grace AA; Ouimet CC; White FJ; Hyman SE; Surmeier DJ; Girault J; Nestler EJ and Greengard P (1998): DARPP–32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science* 281: 838–842.

Floresco SB; Braaksma DN and Phillips AG (1999): Thalamic–cortical–striatal circuitry subserves working memory during delayed responding on a radial arm maze. *J.Neurosci.* 19: 11061–11071.

Floresco SB and Grace AA (2003): Gating of hippocampal–evoked activity in prefrontal cortical neurons by inputs from the mediodorsal thalamus and ventral tegmental area. *J.Neurosci.* 23: 3930–3943.

Floresco SB; Todd CL and Grace AA (2001): Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons. *J.Neurosci.* 21: 4915–4922.

Fuster JM (1997). *The Prefrontal Cortex. Anatomy, Physiology and Neuropsychology of the Frontal Lobe.* Lipincott–Raven, Philadelphia–New York.

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

---

## G

Gabbott PL; Warner TA; Jays PR; Salway P and Busby SJ (2005): Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *J.Comp Neurol.* 492: 145–177.

Gao WJ; Wang Y and Goldman–Rakic PS (2003): Dopamine modulation of perisomatic and peridendritic inhibition in prefrontal cortex. *J.Neurosci.* 23: 1622–1630.

Gao XM and Tamminga CA (1994): An increase in NMDA–sensitive [3H]glutamate and [3H]kainate binding in hippocampus 24 hours after PCP. *Neurosci.Lett.* 174: 149–153.

Gaspar P; Bloch B and Le Moine C (1995): D1 and D2 receptor gene expression in the rat frontal cortex: cellular localization in different classes of efferent neurons. *Eur.J.Neurosci.* 7: 1050–1063.

Geyer MA; Krebs–Thomson K; Braff DL and Swerdlow NR (2001): Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. *Psychopharmacology (Berl)* 156: 117–154.

Geyer MA; Moghaddam B (2002). Animal models relevant to schizophrenia disorders. In *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress.* David KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C (Eds.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 689–701

- Geyer MA; Swerdlow NR; Lehmann–Masten V; Teschendorf HJ; Traut M and Gross G (1999): Effects of LU–111995 in three models of disrupted prepulse inhibition in rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 290: 716–724.
- Glantz LA and Lewis DA (2000): Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *Arch.Gen.Psychiatry* 57: 65–73.
- Glausier JR; Khan ZU and Muly EC (2008): Dopamine D1 and D5 Receptors Are Localized to Discrete Populations of Interneurons in Primate Prefrontal Cortex. *Cereb.Cortex* .
- Glennon RA; Titeler M and McKenney JD (1984): Evidence for 5–HT2 involvement in the mechanism of action of hallucinogenic agents. *Life Sci.* 35: 2505–2511.
- Gogtay N; Lu A; Leow AD; Klunder AD; Lee AD; Chavez A; Greenstein D; Giedd JN; Toga AW; Rapoport JL and Thompson PM (2008): Three–dimensional brain growth abnormalities in childhood–onset schizophrenia visualized by using tensor–based morphometry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105: 15979–15984.
- Goldman–Rakic PS (1995): Cellular basis of working memory. *Neuron* 14: 477–485.
- Goldman–Rakic PS (1996): Regional and cellular fractionation of working memory. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 13473–13480.
- Goldman–Rakic PS; Castner SA; Svensson TH; Siever LJ and Williams GV (2004): Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)* 174: 3–16.
- Goldman–Rakic PS; Muly EC, III and Williams GV (2000): D(1) receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 31: 295–301.
- Gonzalez–Burgos G and Lewis DA (2008): GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophr.Bull.* 34: 944–961.
- Gorelova N; Seamans JK and Yang CR (2002): Mechanisms of dopamine activation of fast–spiking interneurons that exert inhibition in rat prefrontal cortex. *J.Neurophysiol.* 88: 3150–3166.
- Goto Y and Grace AA (2006): Alterations in medial prefrontal cortical activity and plasticity in rats with disruption of cortical development. *Biol.Psychiatry* 60: 1259–1267.
- Goto Y and Grace AA (2008): Limbic and cortical information processing in the nucleus accumbens. *Trends Neurosci.* 31: 552–558.
- Gottesman II (1991). Schizophrenia genesis: the origins of madness. Freeman, New York.

- Gouzoulis–Mayfrank E; Heekeren K; Thelen B; Lindenblatt H; Kovar KA; Sass H and Geyer MA (1998a): Effects of the hallucinogen psilocybin on habituation and prepulse inhibition of the startle reflex in humans. *Behav.Pharmacol.* 9: 561–566.
- Gouzoulis–Mayfrank E; Hermle L; Thelen B and Sass H (1998b): History, rationale and potential of human experimental hallucinogenic drug research in psychiatry. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 2: 63–68.
- Greenstein D; Lerch J; Shaw P; Clasen L; Giedd J; Gochman P; Rapoport J and Gogtay N (2006): Childhood onset schizophrenia: cortical brain abnormalities as young adults. *J.Child Psychol.Psychiatry* 47: 1003–1012.
- Groenewegen HJ; Becker NE and Lohman AH (1980): Subcortical afferents of the nucleus accumbens septi in the cat, studied with retrograde axonal transport of horseradish peroxidase and bisbenzimid. *Neuroscience* 5: 1903–1916.
- Groenewegen HJ; Galis–de Graaf Y and Smeets WJ (1999): Integration and segregation of limbic cortico–striatal loops at the thalamic level: an experimental tracing study in rats. *J.Chem.Neuroanat.* 16: 167–185.
- Groenewegen HJ and Uylings HB (2000): The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog.Brain Res.* 126: 3–28.
- Groenewegen HJ; Wright CI and Uylings HB (1997): The anatomical relationships of the prefrontal cortex with limbic structures and the basal ganglia. *J.Psychopharmacol.* 11: 99–106.
- Grunze HC; Rainnie DG; Hasselmo ME; Barkai E; Hearn EF; McCarley RW and Greene RW (1996): NMDA–dependent modulation of CA1 local circuit inhibition. *J.Neurosci.* 16: 2034–2043.
- Guidotti A; Auta J; Davis JM; Giorgi–Gerevini V; Dwivedi Y; Grayson DR; Impagnatiello F; Pandey G; Pesold C; Sharma R; Uzunov D and Costa E (2000): Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch.Gen.Psychiatry* 57: 1061–1069.
- 
- Hajos M; Gartside SE; Varga V and Sharp T (2003): In vivo inhibition of neuronal activity in the rat ventromedial prefrontal cortex by midbrain–raphe nuclei: role of 5-HT1A receptors. *Neuropharmacology* 45: 72–81.
- Hajos M; Richards CD; Szekely AD and 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 (2004): The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology (Berl)* 174: 151–162.
- Hashimoto T; Volk DW; Eggan SM; Mirnics K; Pierri JN; Sun Z; Sampson AR and Lewis DA (2003): Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J.Neurosci.* 23: 6315–6326.
- Heimer L; Zahm DS; Churchill L; Kalivas PW and Wohltmann C (1991): Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience* 41: 89–125.
- Hertel P; Mathe JM; Nomikos GG; Iurlo M; Mathe AA and Svensson TH (1995): Effects of D-amphetamine and phencyclidine on behavior and extracellular concentrations of neurotensin and dopamine in the ventral striatum and the medial prefrontal cortex of the rat. *Behav.Brain Res.* 72: 103–114.
- Homayoun H and Moghaddam B (2007a): Fine-tuning of awake prefrontal cortex neurons by clozapine: comparison with haloperidol and N-desmethylozapine. *Biol.Psychiatry* 61: 679–687.
- Homayoun H and Moghaddam B (2007b): NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J.Neurosci.* 27: 11496–11500.
- Homayoun H; Stefani MR; Adams BW; Tamagan GD and Moghaddam B (2004): Functional Interaction Between NMDA and mGlu5 Receptors: Effects on Working Memory, Instrumental Learning, Motor Behaviors, and Dopamine Release. *Neuropsychopharmacology* 29: 1259–1269.
- Howes OD; Montgomery AJ; Asselin MC; Murray RM; Valli I; Tabraham P; Bramon-Bosch E; Valmaggia L; Johns L; Broome M; McGuire PK and Grasby PM (2009): Elevated striatal dopamine function linked to prodromal signs of schizophrenia. *Arch.Gen.Psychiatry* 66: 13–20.
- Hoyer D; Clarke DE; Fozard JR; Hartig PR; Martin GR; Mylecharane EJ; Saxena PR and Humphrey PP (1994): International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol.Rev.* 46: 157–203.
- Hoyer D; Pazos A; Probst A and Palacios JM (1986): Serotonin receptors in the human brain. II. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT<sub>1C</sub> and 5-HT<sub>2</sub> recognition sites. *Brain Res.* 376: 97–107.
- Hurley KM; Herbert H; Moga MM and Saper CB (1991): Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J.Comp Neurol.* 308: 249–276.

Ichikawa J; Ishii H; Bonaccorso S; Fowler WL; O'Laughlin IA and Meltzer HY (2001): 5-HT(2A) and D(2) receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT(1A) receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. *J.Neurochem.* 76: 1521–1531.

Impagnatiello F; Guidotti AR; Pesold C; Dwivedi Y; Caruncho H; Pisu MG; Uzunov DP; Smalheiser NR; Davis JM; Pandey GN; Pappas GD; Tueting P; Sharma RP and Costa E (1998): A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 15718–15723.

Innocenti GM; Ansermet F and Parnas J (2003): Schizophrenia, neurodevelopment and corpus callosum. *Mol.Psychiatry* 8: 261–274.

Jackson ME; Homayoun H and 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.

Jakab RL and Goldman–Rakic PS (1998): 5-Hydroxytryptamine<sub>2A</sub> serotonin receptors in the primate cerebral cortex: possible site of action of hallucinogenic and antipsychotic drugs in pyramidal cell apical dendrites. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 735–740.

Jakab RL and Goldman–Rakic PS (2000): Segregation of serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors in inhibitory circuits of the primate cerebral cortex. *J.Comp Neurol.* 417: 337–348.

Jardemark KE; Liang X; Arvanov V and Wang RY (2000): Subchronic treatment with either clozapine, olanzapine or haloperidol produces a hyposensitive response of the rat cortical cells to N-methyl-D-aspartate. *Neuroscience* 100: 1–9.

Javitt DC (2002): Glycine modulators in schizophrenia. *Curr.Opin.Investig.Drugs* 3: 1067–1072.

Javitt DC; Silipo G; Cienfuegos A; Shelley AM; Bark N; Park M; Lindenmayer JP; Suckow R and Zukin SR (2001): Adjunctive high-dose glycine in the treatment of schizophrenia. *Int.J.Neuropsychopharmacol.* 4: 385–391.

Javitt DC and Zukin SR (1991): Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am.J.Psychiatry* 148: 1301–1308.

Jentsch JD and Roth RH (1999): The neuropsychopharmacology of phencyclidine: from NMDA receptor hypofunction to the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 20: 201–225.

- Jodo E; Chiang C and Aston-Jones G (1998): Potent excitatory influence of prefrontal cortex activity on noradrenergic locus coeruleus neurons. *Neuroscience* 83: 63–79.
- Jodo E; Suzuki Y; Katayama T; Hoshino KY; Takeuchi S; Niwa S and Kayama Y (2005): Activation of medial prefrontal cortex by phencyclidine is mediated via a hippocampo–prefrontal pathway. *Cereb.Cortex* 15: 663–669.
- Jongen-Relo AL; Kaufmann S and Feldon J (2003): A differential involvement of the shell and core subterritories of the nucleus accumbens of rats in memory processes. *Behav.Neurosci.* 117: 150–168.
- 
- K**
- Kalivas PW; Jackson D; Romanidies A; Wyndham L and Duffy P (2001): Involvement of pallidothalamic circuitry in working memory. *Neuroscience* 104: 129–136.
- Kamiya A; Kubo K; Tomoda T; Takaki M; Youn R; Ozeki Y; Sawamura N; Park U; Kudo C; Okawa M; Ross CA; Hatten ME; Nakajima K and Sawa A (2005): A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nat.Cell Biol.* 7: 1167–1178.
- Kapur S (2004): How antipsychotics become anti-"psychotic"--from dopamine to salience to psychosis. *Trends Pharmacol.Sci.* 25: 402–406.
- Kapur S and Mamo D (2003): Half a century of antipsychotics and still a central role for dopamine D2 receptors. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 27: 1081–1090.
- Kapur S and Seeman P (2001): Does fast dissociation from the dopamine d(2) receptor explain the action of atypical antipsychotics?: A new hypothesis. *Am.J.Psychiatry* 158: 360–369.
- Kapur S; Zipursky R; Jones C; Remington G and Houle S (2000): Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia. *Am.J.Psychiatry* 157: 514–520.
- Kapur S; Zipursky RB and Remington G (1999): Clinical and theoretical implications of 5-HT<sub>2</sub> and D2 receptor occupancy of clozapine, risperidone, and olanzapine in schizophrenia. *Am.J.Psychiatry* 156: 286–293.
- Kargieman L; Santana N; Mengod G; Celada P and 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.

- Kargieman L; Santana N; Mengod G; Celada P and Artigas F (2008): NMDA antagonist and antipsychotic actions in cortico-subcortical circuits. *Neurotox.Res.* 14: 129–140.
- Karlsson P; Farde L; Halldin C and Sedvall G (2002): PET study of D(1) dopamine receptor binding in neuroleptic-naïve patients with schizophrenia. *Am.J.Psychiatry* 159: 761–767.
- Kelley AE and Domesick VB (1982): The distribution of the projection from the hippocampal formation to the nucleus accumbens in the rat: an anterograde- and retrograde-horseradish peroxidase study. *Neuroscience* 7: 2321–2335.
- Kew JN and Kemp JA (2005): Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 179: 4–29.
- Khan ZU; Gutierrez A; Martin R; Penafiel A; Rivera A and De La CA (1998): Differential regional and cellular distribution of dopamine D2-like receptors: an immunocytochemical study of subtype-specific antibodies in rat and human brain. *J.Comp Neurol.* 402: 353–371.
- Kia HK; Brisorgueil MJ; Hamon M; Calas A and Verge D (1996a): Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors in the rat brain. *J.Neurosci.Res.* 46: 697–708.
- Kia HK; Miquel MC; Brisorgueil MJ; Daval G; Riad M; el Mestikawy S; Hamon M and Verge D (1996b): Immunocytochemical localization of serotonin<sub>1A</sub> receptors in the rat central nervous system. *J.Comp Neurol.* 365: 289–305.
- Krystal JH; D'Souza DC; Mathalon D; Perry E; Belger A and Hoffman R (2003): NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology (Berl)* 169: 215–233.
- Krystal JH; Karper LP; Seibyl JP; Freeman GK; Delaney R; Bremner JD; Heninger GR; Bowers MB, Jr. and Charney DS (1994): Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch.Gen.Psychiatry* 51: 199–214.
- Kuroda M; Yokofujita J and Murakami K (1998): An ultrastructural study of the neural circuit between the prefrontal cortex and the mediodorsal nucleus of the thalamus. *Prog.Neurobiol.* 54: 417–458.
- Kuroki T; Meltzer HY and Ichikawa J (1999): Effects of antipsychotic drugs on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 288: 774–781.

- Lahti RA; Roberts RC; Conley RR; Cochrane EV; Mutin A and Tamminga CA (1996): D2-type dopamine receptors in postmortem human brain sections from normal and schizophrenic subjects. *Neuroreport* 7: 1945–1948.
- Langman NJ; Smith CG and Whitehead KJ (2006): Selective serotonin re-uptake inhibition attenuates evoked glutamate release in the dorsal horn of the anaesthetised rat in vivo. *Pharmacol.Res.* 53: 149–155.
- 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 and Innis RB (1996): Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 9235–9240.
- Lavin A and Grace AA (1994): Modulation of dorsal thalamic cell activity by the ventral pallidum: its role in the regulation of thalamocortical activity by the basal ganglia. *Synapse* 18: 104–127.
- Lawler CP; Prioleau C; Lewis MM; Mak C; Jiang D; Schetz JA; Gonzalez AM; Sibley DR and Mailman RB (1999): Interactions of the novel antipsychotic aripiprazole (OPC-14597) with dopamine and serotonin receptor subtypes. *Neuropsychopharmacology* 20: 612–627.
- Le Moine C and Gaspar P (1998): Subpopulations of cortical GABAergic interneurons differ by their expression of D1 and D2 dopamine receptor subtypes. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 58: 231–236.
- LeDoux JE (1993): Emotional memory systems in the brain. *Behav.Brain Res.* 58: 69–79.
- Lewis DA and Gonzalez-Burgos G (2008): Neuroplasticity of neocortical circuits in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 33: 141–165.
- Lewis DA; Hashimoto T and Volk DW (2005): Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat.Rev.Neurosci.* 6: 312–324.
- Lewis DA and Lieberman JA (2000): Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28: 325–334.
- Li Q; Clark S; Lewis DV and Wilson WA (2002): NMDA receptor antagonists disinhibit rat posterior cingulate and retrosplenial cortices: a potential mechanism of neurotoxicity. *J.Neurosci.* 22: 3070–3080.
- Lipina T; Labrie V; Weiner I and Roder J (2005): Modulators of the glycine site on NMDA receptors, D-serine and ALX 5407, display similar beneficial effects to

- clozapine in mouse models of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 179: 54–67.
- Lipska BK (2004): Using animal models to test a neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia. *J.Psychiatry Neurosci.* 29: 282–286.
- Lipska BK; Halim ND; Segal PN and Weinberger DR (2002): Effects of reversible inactivation of the neonatal ventral hippocampus on behavior in the adult rat. *J.Neurosci.* 22: 2835–2842.
- Lipska BK; Lerman DN; Khaing ZZ and Weinberger DR (2003): The neonatal ventral hippocampal lesion model of schizophrenia: effects on dopamine and GABA mRNA markers in the rat midbrain. *Eur.J.Neurosci.* 18: 3097–3104.
- Lipska BK; Swerdlow NR; Geyer MA; Jaskiw GE; Braff DL and Weinberger DR (1995): Neonatal excitotoxic hippocampal damage in rats causes post-pubertal changes in prepulse inhibition of startle and its disruption by apomorphine. *Psychopharmacology (Berl)* 122: 35–43.
- Lipska BK and Weinberger DR (1993): Delayed effects of neonatal hippocampal damage on haloperidol-induced catalepsy and apomorphine-induced stereotypic behaviors in the rat. *Brain Res.Dev.Brain Res.* 75: 213–222.
- Lipska BK and Weinberger DR (1995): Genetic variation in vulnerability to the behavioral effects of neonatal hippocampal damage in rats. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92: 8906–8910.
- Lipska BK and Weinberger DR (2000): To model a psychiatric disorder in animals: schizophrenia as a reality test. *Neuropsychopharmacology* 23: 223–239.
- Lisman JE; Coyle JT; Green RW; Javitt DC; Benes FM; Heckers S and Grace AA (2008): Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci.* 31: 234–242.
- Lodge DJ and Grace AA (2007): Aberrant hippocampal activity underlies the dopamine dysregulation in an animal model of schizophrenia. *J.Neurosci.* 27: 11424–11430.
- Lopez-Gimenez JF; Mengod G; Palacios JM and Vilaro MT (1997): Selective visualization of rat brain 5-HT<sub>2A</sub> receptors by autoradiography with [3H]MDL 100,907. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 356: 446–454.
- Lorrain DS; Baccei CS; Bristow LJ; Anderson JJ and Varney MA (2003): Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268. *Neuroscience* 117: 697–706.

- Malhotra AK; Pinals DA; Weingartner H; Sirocco K; Missar CD; Pickar D and Breier A (1996): NMDA receptor function and human cognition: the effects of ketamine in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 14: 301–307.
- Mao Y; Ge X; Frank CL; Madison JM; Koehler AN; Doud MK; Tassa C; Berry EM; Soda T; Singh KK; Biechele T; Petryshen TL; Moon RT; Haggarty SJ and Tsai LH (2009): Disrupted in schizophrenia 1 regulates neuronal progenitor proliferation via modulation of GSK3 $\beta$ /beta-catenin signaling. *Cell* 136: 1017–1031.
- Marek GJ and Aghajanian GK (1999): 5-HT<sub>2A</sub> receptor or  $\alpha$ 1-adrenoceptor activation induces excitatory postsynaptic currents in layer V pyramidal cells of the medial prefrontal cortex. *Eur.J.Pharmacol.* 367: 197–206.
- Marek GJ; Wright RA; Schoepp DD; Monn JA and Aghajanian GK (2000): Physiological antagonism between 5-hydroxytryptamine(2A) and group II metabotropic glutamate receptors in prefrontal cortex. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 292: 76–87.
- Martin P; Carlsson ML and Hjorth S (1998): Systemic PCP treatment elevates brain extracellular 5-HT: a microdialysis study in awake rats. *Neuroreport* 9: 2985–2988.
- Martin-Ruiz R; Puig MV; Celada P; Shapiro DA; Roth BL; Mengod G and 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.
- Mathe JM; Nomikos GG; Blakeman KH and Svensson TH (1999): Differential actions of dizocilpine (MK-801) on the mesolimbic and mesocortical dopamine systems: role of neuronal activity. *Neuropharmacology* 38: 121–128.
- Maurice N; Deniau JM; Menetrey A; Glowinski J and Thierry AM (1997): Position of the ventral pallidum in the rat prefrontal cortex-basal ganglia circuit. *Neuroscience* 80: 523–534.
- Maurice N; Deniau JM; Menetrey A; Glowinski J and Thierry AM (1998): Prefrontal cortex-basal ganglia circuits in the rat: involvement of ventral pallidum and subthalamic nucleus. *Synapse* 29: 363–370.
- McBain CJ and Mayer ML (1994): N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol Rev.* 74: 723–760.

- McCormick DA; Connors BW; Lighthall JW and Prince DA (1985): Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex. *J.Neurophysiol.* 54: 782–806.
- McDonald AJ (1991): Topographical organization of amygdaloid projections to the caudatoputamen, nucleus accumbens, and related striatal-like areas of the rat brain. *Neuroscience* 44: 15–33.
- Meltzer HY (1999): The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology* 21: 106S–115S.
- Meltzer HY (2002). Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs. In *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Davis K.L., Charney D., Coyle J.T., Nemeroff C. (Eds.) Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, pp. 819–831.
- Meltzer HY (2004): What's atypical about atypical antipsychotic drugs? *Curr.Opin.Pharmacol.* 4: 53–57.
- Meltzer HY; Bastani B; Ramirez L and Matsubara S (1989a): Clozapine: new research on efficacy and mechanism of action. *Eur.Arch.Psychiatry Neurol.Sci.* 238: 332–339.
- Meltzer HY; Matsubara S and Lee JC (1989b): Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin<sub>2</sub> pKi values. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 251: 238–246.
- Meltzer HY; Park S and Kessler R (1999): Cognition, schizophrenia, and the atypical antipsychotic drugs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 13591–13593.
- Meltzer HY and Sumiyoshi T (2008): Does stimulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptors improve cognition in schizophrenia? *Behav.Brain Res.* 195: 98–102.
- Mengod G; Pompeiano M; Martinez-Mir MI and Palacios JM (1990): Localization of the mRNA for the 5-HT<sub>2</sub> receptor by in situ hybridization histochemistry. Correlation with the distribution of receptor sites. *Brain Res.* 524: 139–143.
- Millan MJ (2000): Improving the treatment of schizophrenia: focus on serotonin (5-HT)<sub>1A</sub> receptors. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 295: 853–861.
- Millan MJ (2005): N-Methyl-D-aspartate receptors as a target for improved antipsychotic agents: novel insights and clinical perspectives. *Psychopharmacology (Berl)* 179: 30–53.
- Millan MJ; Brocco M; Gobert A; Joly F; Bervoets K; Rivet J; Newman-Tancredi A; Audinot V and Maurel S (1999): Contrasting mechanisms of action and sensitivity to antipsychotics of phencyclidine versus amphetamine: importance



- of nucleus accumbens 5-HT<sub>2A</sub> sites for PCP-induced locomotion in the rat. *Eur.J.Neurosci.* 11: 4419–4432.
- Miquel MC; Emerit MB; Gozlan H and Hamon M (1991): Involvement of tryptophan residue(s) in the specific binding of agonists/antagonists to 5-HT<sub>3</sub> receptors in NG108–15 clonal cells. *Biochem.Pharmacol.* 42: 1453–1461.
- Mogenson GJ and Nielsen MA (1983): Evidence that an accumbens to subpallidal GABAergic projection contributes to locomotor activity. *Brain Res.Bull.* 11: 309–314.
- Mogenson GJ; Swanson LW and Wu M (1983): Neural projections from nucleus accumbens to globus pallidus, substantia innominata, and lateral preoptic–lateral hypothalamic area: an anatomical and electrophysiological investigation in the rat. *J.Neurosci.* 3: 189–202.
- Moghaddam B (1993): Stress preferentially increases extraneuronal levels of excitatory amino acids in the prefrontal cortex: comparison to hippocampus and basal ganglia. *J.Neurochem.* 60: 1650–1657.
- Moghaddam B; Adams B; Verma A and Daly D (1997): Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J.Neurosci.* 17: 2921–2927.
- Moghaddam B and Adams BW (1998): Reversal of phencyclidine effects by a group II metabotropic glutamate receptor agonist in rats. *Science* 281: 1349–1352.
- Mohn AR; Gainetdinov RR; Caron MG and Koller BH (1999): Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 98: 427–436.
- Moore H; Jentsch JD; Ghajarnia M; Geyer MA and Grace AA (2006): A neurobehavioral systems analysis of adult rats exposed to methylazoxymethanol acetate on E17: implications for the neuropathology of schizophrenia. *Biol.Psychiatry* 60: 253–264.
- Moriyoshi K; Masu M; Ishii T; Shigemoto R; Mizuno N and Nakanishi S (1991): Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354: 31–37.
- Mrzljak L; Bergson C; Pappy M; Huff R; Levenson R and Goldman–Rakic PS (1996): Localization of dopamine D<sub>4</sub> receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature* 381: 245–248.

Muly EC, III; Szigeti K and Goldman-Rakic PS (1998): D1 receptor in interneurons of macaque prefrontal cortex: distribution and subcellular localization. *J. Neurosci.* 18: 10553–10565.

Mutel V; Trube G; Klingelschmidt A; Messer J; Bleuel Z; Humbel U; Clifford MM; Ellis GJ and Richards JG (1998): Binding characteristics of a potent AMPA receptor antagonist [3H]Ro 48-8587 in rat brain. *J. Neurochem.* 71: 418–426.

---

N

Newcomer JW; Farber NB; Jevtovic-Todorovic V; Selke G; Melson AK; Hershey T; Craft S and Olney JW (1999): Ketamine-induced NMDA receptor hypofunction as a model of memory impairment and psychosis. *Neuropsychopharmacology* 20: 106–118.

Nichols DE (2004): Hallucinogens. *Pharmacol. Ther.* 101: 131–181.

Nordstrom AL; Farde L; Nyberg S; Karlsson P; Halldin C and Sedvall G (1995): D1, D2, and 5-HT<sub>2</sub> receptor occupancy in relation to clozapine serum concentration: a PET study of schizophrenic patients. *Am.J.Psychiatry* 152: 1444–1449.

---

O

O'Donnell P; Lavin A; Enquist LW; Grace AA and Card JP (1997): Interconnected parallel circuits between rat nucleus accumbens and thalamus revealed by retrograde transynaptic transport of pseudorabies virus. *J. Neurosci.* 17: 2143–2167.

O'Donnell P; Lewis BL; Weinberger DR and Lipska BK (2002): Neonatal hippocampal damage alters electrophysiological properties of prefrontal cortical neurons in adult rats. *Cereb. Cortex* 12: 975–982.

Oerther S and Ahlenius S (2000): Atypical antipsychotics and dopamine D(1) receptor agonism: an in vivo experimental study using core temperature measurements in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292: 731–736.

Okubo Y; Suhara T; Suzuki K; Kobayashi K; Inoue O; Terasaki O; Someya Y; Sassa T; Sudo Y; Matsushima E; Iyo M; Tateno Y and Toru M (1997): Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature* 385: 634–636.

Olney JW; Newcomer JW and Farber NB (1999): NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 33: 523–533.

- Park S; Puschel J; Sauter BH; Rentsch M and Hell D (1999): Spatial working memory deficits and clinical symptoms in schizophrenia: a 4-month follow-up study. *Biol.Psychiatry* 46: 392–400.
- Patel S; Fernandez-Garcia E; Hutson PH and Patel S (2001): An in vivo binding assay to determine central alpha(1)-adrenoceptor occupancy using [(3)H]prazosin. *Brain Res.Brain Res.Protoc.* 8: 191–198.
- Patil ST; Zhang L; Martenyi F; Lowe SL; Jackson KA; Andreev BV; Avedisova AS; Bardenstein LM; Gurovich IY; Morozova MA; Mosolov SN; Neznanov NG; Reznik AM; Smulevich AB; Tochilov VA; Johnson BG; Monn JA and Schoepp DD (2007): Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nat.Med.* 13: 1102–1107.
- Paus T; Zijdenbos A; Worsley K; Collins DL; Blumenthal J; Giedd JN; Rapoport JL and Evans AC (1999): Structural maturation of neural pathways in children and adolescents: in vivo study. *Science* 283: 1908–1911.
- Paxinos G; Watson C (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Pazos A; Cortes R and Palacios JM (1985): Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res.* 346: 231–249.
- Pazos A and Palacios JM (1985): Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res.* 346: 205–230.
- Pehek EA and Yamamoto BK (1994): Differential effects of locally administered clozapine and haloperidol on dopamine efflux in the rat prefrontal cortex and caudate-putamen. *J.Neurochem.* 63: 2118–2124.
- Peters JA; Malone HM and Lambert JJ (1992): Recent advances in the electrophysiological characterization of 5-HT3 receptors. *Trends Pharmacol.Sci.* 13: 391–397.
- Petryshen TL; Middleton FA; Kirby A; Aldinger KA; Purcell S; Tahl AR; Morley CP; McGann L; Gentile KL; Rockwell GN; Medeiros HM; Carvalho C; Macedo A; Dourado A; Valente J; Ferreira CP; Patterson NJ; Azevedo MH; Daly MJ; Pato CN; Pato MT and Sklar P (2005): Support for involvement of neuregulin 1 in schizophrenia pathophysiology. *Mol.Psychiatry* 10: 366–74, 328.

- Pieribone VA; Nicholas AP; Dagerlind A and Hokfelt T (1994): Distribution of alpha 1 adrenoceptors in rat brain revealed by in situ hybridization experiments utilizing subtype-specific probes. *J.Neurosci.* 14: 4252–4268.
- Pinault D and Deschenes M (1998): Projection and innervation patterns of individual thalamic reticular axons in the thalamus of the adult rat: a three-dimensional, graphic, and morphometric analysis. *J.Comp Neurol.* 391: 180–203.
- Pompeiano M; Palacios JM and Mengod G (1992): Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT1A receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J.Neurosci.* 12: 440–453.
- Pompeiano M; Palacios JM and Mengod G (1994): Distribution of the serotonin 5-HT2 receptor family mRNAs: comparison between 5-HT2A and 5-HT2C receptors. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 23: 163–178.
- Potkin SG; Alva G; Fleming K; Anand R; Keator D; Carreon D; Doo M; Jin Y; Wu JC and Fallon JH (2002): A PET study of the pathophysiology of negative symptoms in schizophrenia. Positron emission tomography. *Am.J.Psychiatry* 159: 227–237.
- Potkin SG; Buchsbaum MS; Jin Y; Tang C; Telford J; Friedman G; Lottenberg S; Najafi A; Gulasekaram B; Costa J and . (1994): Clozapine effects on glucose metabolic rate in striatum and frontal cortex. *J.Clin.Psychiatry* 55 Suppl B: 63–66.
- Puig MV; Artigas F and 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 and Artigas F (2004): [Serotonergic control of prefrontal cortex]. *Rev.Neurol.* 39: 539–547.
- Puig MV; Celada P; Diaz-Mataix L and Artigas F (2003): In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT2A receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cereb.Cortex* 13: 870–882.
- 
- R**
- Ray JP and Price JL (1993): The organization of projections from the mediodorsal nucleus of the thalamus to orbital and medial prefrontal cortex in macaque monkeys. *J.Comp Neurol.* 337: 1–31.
- Rice DS and Curran T (2001): Role of the reelin signaling pathway in central nervous system development. *Annu.Rev.Neurosci.* 24: 1005–1039.

- Rollema H; Lu Y; Schmidt AW; Sprouse JS and Zorn SH (2000): 5-HT(1A) receptor activation contributes to ziprasidone-induced dopamine release in the rat prefrontal cortex. *Biol.Psychiatry* 48: 229–237.
- Rollema H; Lu Y; Schmidt AW and Zorn SH (1997): Clozapine increases dopamine release in prefrontal cortex by 5-HT1A receptor activation. *Eur.J.Pharmacol.* 338: R3–R5.
- Room P; Russchen FT; Groenewegen HJ and Lohman AH (1985): Efferent connections of the prelimbic (area 32) and the infralimbic (area 25) cortices: an anterograde tracing study in the cat. *J.Comp Neurol.* 242: 40–55.
- Roth BL; Hanizavareh SM and Blum AE (2004): Serotonin receptors represent highly favorable molecular targets for cognitive enhancement in schizophrenia and other disorders. *Psychopharmacology (Berl)* 174: 17–24.
- Roth BL; Tandra S; Burgess LH; Sibley DR and Meltzer HY (1995): D4 dopamine receptor binding affinity does not distinguish between typical and atypical antipsychotic drugs. *Psychopharmacology (Berl)* 120: 365–368.

## S

- Sakai K and Crochet S (2001): Differentiation of presumed serotonergic dorsal raphe neurons in relation to behavior and wake-sleep states. *Neuroscience* 104: 1141–1155.
- Sams-Dodd F (1996): Phencyclidine-induced stereotyped behaviour and social isolation in rats: a possible animal model of schizophrenia. *Behav.Pharmacol.* 7: 3–23.
- Santana N; Bortolozzi A; Serrats J; Mengod G and Artigas F (2004): Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb.Cortex* 14: 1100–1109.
- Santana N; Mengod G and Artigas F (2009): Quantitative analysis of the expression of dopamine D1 and D2 receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb.Cortex* 19: 849–860.
- Sara SJ and Herve-Minvielle A (1995): Inhibitory influence of frontal cortex on locus coeruleus neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 92: 6032–6036.
- Schaffhauser H; Cartmell J; Jakob-Rotne R and Mutel V (1997): Pharmacological characterization of metabotropic glutamate receptors linked to the inhibition of adenylate cyclase activity in rat striatal slices. *Neuropharmacology* 36: 933–940.

- Scherzer CR; Landwehrmeyer GB; Kerner JA; Counihan TJ; Kosinski CM; Standaert DG; Daggett LP; Velicelebi G; Penney JB and Young AB (1998): Expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the human brain: hippocampus and cortex. *J.Comp Neurol.* 390: 75–90.
- Schmidt CJ and Fadayel GM (1996): Regional effects of MK-801 on dopamine release: effects of competitive NMDA or 5-HT<sub>2A</sub> receptor blockade. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 277: 1541–1549.
- Scorza MC; Meikle MN; Hill XL; Richeri A; Lorenzo D and Artigas F (2008): Prefrontal cortex lesions cause only minor effects on the hyperlocomotion induced by MK-801 and its reversal by clozapine. *Int.J.Neuropsychopharmacol.* 11: 519–532.
- Seamans JK; Gorelova N; Durstewitz D and Yang CR (2001): Bidirectional dopamine modulation of GABAergic inhibition in prefrontal cortical pyramidal neurons. *J.Neurosci.* 21: 3628–3638.
- Seeger TF; Seymour PA; Schmidt AW; Zorn SH; Schulz DW; Lebel LA; McLean S; Guanowsky V; Howard HR; Lowe JA, III and . (1995): Ziprasidone (CP-88,059): a new antipsychotic with combined dopamine and serotonin receptor antagonist activity. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 275: 101–113.
- Seeman P; Chau-Wong M; Tedesco J and Wong K (1975): Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 72: 4376–4380.
- Seeman P and Lee T (1975): Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science* 188: 1217–1219.
- Seeman P; Lee T; Chau-Wong M and Wong K (1976): Antipsychotic drug doses and neuroleptic/dopamine receptors. *Nature* 261: 717–719.
- Selemon LD; Rajkowska G and Goldman-Rakic PS (1995): Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch.Gen.Psychiatry* 52: 805–818.
- Sesack SR; Deutch AY; Roth RH and 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; Hawrylak VA; Melchitzky DS and Lewis DA (1998): Dopamine innervation of a subclass of local circuit neurons in monkey prefrontal cortex: ultrastructural analysis of tyrosine hydroxylase and parvalbumin immunoreactive structures. *Cereb.Cortex* 8: 614–622.

- Smiley JF and Goldman-Rakic PS (1996): Serotonergic axons in monkey prefrontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy. *J.Comp Neurol.* 367: 431–443.
- Somogyi P; Tamas G; Lujan R and Buhl EH (1998): Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 26: 113–135.
- Sowell ER; Thompson PM; Holmes CJ; Jernigan TL and Toga AW (1999): In vivo evidence for post-adolescent brain maturation in frontal and striatal regions. *Nat.Neurosci.* 2: 859–861.
- Stefansson H; Sigurdsson E; Steinthorsdottir V; Bjornsdottir S; Sigmundsson T; Ghosh S; Brynjolfsson J; Gunnarsdottir S; Ivarsson O; Chou TT; Hjaltason O; Birgisdottir B; Jonsson H; Gudnadottir VG; Gudmundsdottir E; Bjornsson A; Ingvarsson B; Ingason A; Sigfusson S; Hardardottir H; Harvey RP; Lai D; Zhou M; Brunner D; Mutel V; Gonzalo A; Lemke G; Sainz J; Johannesson G; Andresson T; Gudbjartsson D; Manolescu A; Frigge ML; Gurney ME; Kong A; Gulcher JR; Petursson H and Stefansson K (2002): Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia. *Am.J.Hum.Genet.* 71: 877–892.
- Suzuki Y; Jodo E; Takeuchi S; Niwa S and Kayama Y (2002): Acute administration of phencyclidine induces tonic activation of medial prefrontal cortex neurons in freely moving rats. *Neuroscience* 114: 769–779.
- Svensson TH (2003): Alpha-adrenoceptor modulation hypothesis of antipsychotic atypicality. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry* 27: 1145–1158.
- Swanson LW and Cwan WM (1975): A note on the connections and development of the nucleus accumbens. *Brain Res.* 92: 324–330.
- Swanson LW (1998). Brain maps: structure of the rat brain. Elsevier, Amsterdam.
- 
- T
- Tamminga CA (1998): Schizophrenia and glutamatergic transmission. *Crit Rev.Neurobiol.* 12: 21–36.
- Tamminga CA; Thaker GK; Buchanan R; Kirkpatrick B; Alphas LD; Chase TN and Carpenter WT (1992): Limbic system abnormalities identified in schizophrenia using positron emission tomography with fluorodeoxyglucose and neocortical alterations with deficit syndrome. *Arch.Gen.Psychiatry* 49: 522–530.
- Tao R and Auerbach SB (2000): Regulation of serotonin release by GABA and excitatory amino acids. *J.Psychopharmacol.* 14: 100–113.

Thierry AM; Deniau JM; Chevalier G; Ferron A and Glowinski J (1983): An electrophysiological analysis of some afferent and efferent pathways of the rat prefrontal cortex. *Prog.Brain Res.* 58: 257–261.

Thierry AM; Deniau JM and Feger J (1979): Effects of stimulation of the frontal cortex on identified output VMT cells in the rat. *Neurosci.Lett.* 15: 102–107.

Timmerman W; Cisci G; Nap A; De Vries JB and Westerink BH (1999): Effects of handling on extracellular levels of glutamate and other amino acids in various areas of the brain measured by microdialysis. *Brain Res.* 833: 150–160.

Timmerman W and Westerink BH (1997): Brain microdialysis of GABA and glutamate: what does it signify? *Synapse* 27: 242–261.

Tsai G and Coyle JT (1995): N-acetylaspartate in neuropsychiatric disorders. *Prog.Neurobiol.* 46: 531–540.

Tsai G and Coyle JT (2002): Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 42: 165–179.

Tsuang MT; Stone WS and Faraone SV (2001): Genes, environment and schizophrenia. *Br.J.Psychiatry Suppl* 40: s18–s24.

Tukker JJ; Fuentealba P; Hartwich K; Somogyi P and Klausberger T (2007): Cell type-specific tuning of hippocampal interneuron firing during gamma oscillations in vivo. *J.Neurosci.* 27: 8184–8189.

---

## U

Uylings HB and van Eden CG (1990): Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Prog.Brain Res.* 85: 31–62.

---

## V

Vazquez-Borsetti P; Cortes R and Artigas F (2008): Pyramidal Neurons in Rat Prefrontal Cortex Projecting to Ventral Tegmental Area and Dorsal Raphe Nucleus Express 5-HT<sub>2A</sub> Receptors. *Cereb.Cortex* .

Verge D; Daval G; Patey A; Gozlan H; el Mestikawy S and Hamon M (1985): Presynaptic 5-HT autoreceptors on serotonergic cell bodies and/or dendrites but not terminals are of the 5-HT<sub>1A</sub> subtype. *Eur.J.Pharmacol.* 113: 463–464.

Vertes RP (2002): Analysis of projections from the medial prefrontal cortex to the thalamus in the rat, with emphasis on nucleus reuniens. *J.Comp Neurol.* 442: 163–187.



- Vertes RP (2004): Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51: 32–58.
- Vertes RP; Hoover WB; Do Valle AC; Sherman A and Rodriguez JJ (2006): Efferent projections of reuniens and rhomboid nuclei of the thalamus in the rat. *J.Comp Neurol.* 499: 768–796.
- Vertes RP; Hoover WB; Szigeti–Buck K and Leranth C (2007): Nucleus reuniens of the midline thalamus: link between the medial prefrontal cortex and the hippocampus. *Brain Res.Bull.* 71: 601–609.
- Vincent SL; Khan Y and Benes FM (1995): Cellular colocalization of dopamine D1 and D2 receptors in rat medial prefrontal cortex. *Synapse* 19: 112–120.
- 
- W**
- Wang F; Kalmar JH; Edmiston E; Chepenik LG; Bhagwagar Z; Spencer L; Pittman B; Jackowski M; Papademetris X; Constable RT and Blumberg HP (2008a): Abnormal corpus callosum integrity in bipolar disorder: a diffusion tensor imaging study. *Biol.Psychiatry* 64: 730–733.
- Wang H; Stradtman GG, III; Wang XJ and Gao WJ (2008b): A specialized NMDA receptor function in layer 5 recurrent microcircuitry of the adult rat prefrontal cortex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105: 16791–16796.
- Wang Y and Goldman–Rakic PS (2004): D2 receptor regulation of synaptic burst firing in prefrontal cortical pyramidal neurons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101: 5093–5098.
- Wedzony K; Chocyk A; Mackowiak M; Fijal K and Czyrak A (2000): Cortical localization of dopamine D4 receptors in the rat brain—immunocytochemical study. *J.Physiol Pharmacol.* 51: 205–221.
- Weinberger DR (1999): Cell biology of the hippocampal formation in schizophrenia. *Biol.Psychiatry* 45: 395–402.
- Weinberger DR; Berman KF and Daniel DG (1992): Mesoprefrontal cortical dopaminergic activity and prefrontal hypofunction in schizophrenia. *Clin.Neuropharmacol.* 15 Suppl 1 Pt A: 568A–569A.
- Weinberger DR and Gallhofer B (1997): Cognitive function in schizophrenia. *Int.Clin.Psychopharmacol.* 12 Suppl 4: S29–S36.
- West AR and Grace AA (2002): Opposite influences of endogenous dopamine D1 and D2 receptor activation on activity states and electrophysiological properties of striatal neurons: studies combining in vivo intracellular recordings and reverse microdialysis. *J.Neurosci.* 22: 294–304.

Williams GV; Rao SG and Goldman-Rakic PS (2002): The physiological role of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in working memory. *J.Neurosci.* 22: 2843–2854.

Willins DL; Deutch AY and Roth BL (1997): Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex. *Synapse* 27: 79–82.

Woo TU; Kim AM and Viscidi E (2008): Disease-specific alterations in glutamatergic neurotransmission on inhibitory interneurons in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Brain Res.* 1218: 267–277.

---

**Y**

Yeterian EH and Pandya DN (1985): Corticothalamic connections of the posterior parietal cortex in the rhesus monkey. *J.Comp Neurol.* 237: 408–426.

---

**Z**

Zahm DS; Williams E and Wohltmann C (1996): Ventral striatopallidothalamic projection: IV. Relative involvements of neurochemically distinct subterritories in the ventral pallidum and adjacent parts of the rostroventral forebrain. *J.Comp Neurol.* 364: 340–362.

Zikopoulos B and Barbas H (2006): Prefrontal projections to the thalamic reticular nucleus form a unique circuit for attentional mechanisms. *J.Neurosci.* 26: 7348–7361.