

Modulació dels sistemes monoaminèrgics a l'escorça prefrontal. Implicacions en esquizofrènia i depressió

Mercè Masana Nadal

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA



Modulació dels sistemes monoaminèrgics a l'escorça prefrontal.

Implicacions en esquizofrènia i depressió

Tesis Doctoral presentada per

Mercè Masana Nadal

Barcelona, abril 2011

Treball presentat per optar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona,
Programa de Doctorat de Neurociències (Departament de Biologia Cel·lular,
Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona).

Departament de Neuroquímica i Neurofarmacologia
Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB)
Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)
Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

Els directors:

Dra. Analía Bortolozzi Biasoni
Investigadora IDIBAPS

Dr. Francesc Artigas Pérez
Professor d'Investigació CSIC

Signat: Mercè Masana Nadal
Barcelona, abril 2011

El present treball ha estat finançat amb els següents projectes:

-Papel de la corteza prefrontal en la fisiopatología de la esquizofrenia y acción terapéutica de los fármacos antipsicóticos. SAF 2004-05525

-Modulación serotoninérgica de la corteza prefrontal: Relevancia en el tratamiento de la esquizofrenia y la depresión. SAF2007-62378

-Monoaminergic neurotransmission in prefrontal cortex: Target for augmentation strategies in schizophrenia. Fundació SENY

I ha estat realitzat amb el suport econòmic d'una beca predoctoral del programa I3P del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

A la meva família

Agraïments

Aquesta Tesi ha arribat a ser el que és gràcies a l'ajuda i recolzament de moltíssima gent. Han estat molts anys, en els quals he conegut moltes persones, algunes ja han marxat i altres tot just acaben d'arribar, però totes han aportat el seu granet d'arena en aquest projecte, ja sigui tant a nivell personal com també professional.

Primer de tot, aquest treball no s'hagués fet sense l'ajuda dels meus directors de tesi, Paco i Analía. Amb vosaltres he crescut com a persona i com la científica. M'heu servit d'exemple d'entusiasme per la ciència i d'il·lusió per la vida, ja sigui des d'un punt de vista de l'experiència i gran coneixement, com des de la visió d'algú que lluita -i sense dubte aconseguirà- fer-se un lloc en la Neurociència.

També a tu, Anna, la meua tercera directora! M'alegro molt d'haver treballat amb tu, m'has ensenyat a ser rigorosa amb la feina i m'has contagiats amb el teu entusiasme. Gràcies per tota l'ajuda, per ensenyar-me i aconsellar-me i sobretot per fer-ho sense esperar res a canvi, a part d'un paràgraf als agraïments, que menys!;-). Ets una lluitadora que segur que trobaràs l'espai per ser "la presidenta", i sinó sempre ens quedarà las Vegas!;-)

A l'Albert, per ser el rei de la diàlisi, per la seva confiança i ajuda, i pel seu humor a vegades irònic! I la Tamara (i la petita Marina) pel seu riure i la seva espontaneïtat. A la Pau, per les aportacions als seminaris i pels seus consells. Tambien a mis jefes en Albany, Yolanda i Joe, por ser mi familia allí, y por el futuro que me han proporcionado aquí.

Al Xavi, pel "*you are beautiful*", per ajudar-me sempre al labo, pel clínic, per "un cafè i un tallat", per totes les nostres diferències, però sobretot, per la complicitat i perquè no ens agrada gens discutir!;-). La Laia, gran companya de viatges, per totes les nostres escapades, platgetes, festes, i sobretot riures. La Lu, por todos los cafés y charlas en la terraza, y por seguir teniéndolas fuera del labo. Al Giuseppe, compañero de penas y confiancias... espero que te vaya muy bien con tu nuevo "padre", que encuentres la manzana, y que vuelvas con un Nature! Estamos en contacto! :-)

A la Leti, la súper mama del laboratori, i últimament dels italians. Gràcies per la teva ajuda! Per la teva paciència, experiència, i perquè aquesta tesi sense tu no seria possible. A la Mireia, per totes les xerrades a última hora del dia, pel teu positivisme i confiança. M'alegro d'haver-te conegut més els últims anys. I estic segura que tot t'anirà bé, perquè ser una moneda et posa en el mercat!;-)

A la organitzadora María, per ser la "soluciona-todo". I a la mamá Noe, por su cariño y sinceridad. A las niñas del labo, la organizada y orgullosa de ser friki Vero, y a Noemiiii, la reina de las manualidades y a quien le habla el bolsillo. Gràcies per la vostra ajuda, sense vosaltres no hauria fet ni la meitat! A la nueva generación, Lau, por hacerme sentir orgullosa de Villamasana i por todas las cervezas después del labo. A la mística Eva per la seva expressivitat. A Mau, por ser la fiesta personificada. I a l'Albert petit (o altrament dit de l'Analia) per aportar nova energia al lab. A la Merseditas, por sus risas, per "casa nostra" y porque Houston no sea un problema. I a la resta del passadís, al Victor i les cases rurals, a la Sílvia i el seu somriure, a la Cris i la Emili, l'Anna, la Ro, l'Aina...vaja, les lupes i el 631. Als de fàrmaco, Marco, Nuria, Míriam, els Planes i la Coral. I als que ja han marxat, Anna S, Joan, Lola, Roser, Llorenç, Zoila, Mónica, Jordi, Rubén, Santi, Abraham, Eli, Olga, Mari, Sus, Roci, Pablo, Julián, Raúl, ... I sobretot a la guapíssima y gran amiga Ju.

A les "nenes" de Sant Guim, sobretot a la inquieta i gran amiga Gemma, que és qui ha viscut de més a prop aquesta experiència, a la súper profe lluitadora i entusiasta Carmeta, la organitzadora i realista Montse, a la Mire i les Rosers, i a la treballadora Marieta (que es com si fos de Sant Guim), al Pietro, als respectius, perquè totes vosaltres m'heu animat, escoltat i viscut tot el procés d'aquest projecte meu de vida.

Als companys de químiques, Caro, Maria, Carles, Eva i Jordi, i també al Xavi, i a la família de bioquímics, al Luis, al Jean-Claude, la Vale, Manu... I a tota la gent que no he mencionat però que m'han acompanyat en aquest viatge i als quals també agraeixo la seva amistat!

Finalment vull agrair a la meva família, que encara segueixen sense entendre que tingui tants estudis i sigui tant difícil tenir una feina fixa. Però tot i no entendre massa el que faig, espero que es sentin orgullosos de mi!

I al meu Piñolet, per tots els ànims que m'has donat, per entendre'm, per la paciència que has tingut, i perquè ets "el Millor".

*Experience is what you get
when you didn't get what you wanted.*

*And experience is often the most valuable thing
you may have to offer*

Randy Pausch, *The Last Lecture*

Índex

Abreviacions	5
I. Introducció	7
1. Introducció general	9
2. Esquizofrènia	9
2.1. Introducció	9
2.2. Etiologia i fisiopatologia	10
2.3. Hipòtesis	12
2.3.1. Hipòtesi dopaminèrgica de l'esquizofrènia	13
2.3.2. Hipòtesi del neurodesenvolupament	14
2.4. Tractaments	15
3. Depressió	18
3.1. Introducció	18
3.2. Etiologia i fisiopatologia	19
3.3. Hipòtesis	20
3.3.1. Hipòtesi monoaminèrgica	21
3.3.2. Hipòtesi de l'alteració de l'eix HPA	22
3.3.3. Hipòtesi neurotròfica	23
3.4. Tractaments	24
4. Escorça prefrontal	26
4.1. Anatomia i connectivitat	26
4.2. Citoarquitectura	28
4.3. Alteracions en esquizofrènia i depressió	29
5. Nucli accumbens	31
5.1. Anatomia i connectivitat	31
5.2. Citoarquitectura	32
5.3. Alteracions en esquizofrènia i depressió	33
6. Sistemes monoaminèrgics	34
6.1. Origen i innervació dels sistemes monoaminèrgics en el sistema nerviós central	34
6.2. Mecanismes de regulació de les neurones monoaminèrgiques	36
6.2.1. Síntesi	37
6.2.2. Transportadors	38
6.2.3. Inactivació enzimàtica	38

6.2.4. Receptors	39
6.3. Paper de la dopamina a l'escorça prefrontal	41
II. Objectius	45
1. Hipòtesi i objectiu general	47
1.1. Objectius concrets	47
III. Materials i Mètodes	49
1. Materials	51
1.1. Animals	51
1.2. Fàrmacs i compostos	51
2. Mètodes	53
2.1. Microdiàlisi intracerebral <i>in vivo</i>	53
2.1.1. Construcció de sondes de microdiàlisi	53
2.1.2. Implantació de les sondes de diàlisi	54
2.1.3. Obtenció de mostres de dialitzat cerebral	56
2.1.4. Obtenció de mostres de teixit cerebral	57
2.1.5. Comprovació de la localització de les sondes de microdiàlisi	58
2.1.6. Anàlisi de mostres per HPLC	58
2.2. Inactivació química de receptors, estimulació elèctrica i lesions	60
2.2.1. Inactivació dels receptors acoblats a proteïna G	60
2.2.2. Estimulació elèctrica	60
2.2.3. Lesió del sistema noradrenèrgic	61
2.2.4. Lesió unilateral de l'àrea tegmental ventral	62
2.3. Autoradiografia de receptors	62
2.4. Hibridació <i>In Situ</i>	63
2.5. Activitat locomotora	64
2.6. Test de natació forçada	64
2.7. Dades i anàlisi estadístic	66
IV. Resultats	67
1. Treball 1 :	69
Dopamine release induced by atypical antipsychotics in prefrontal cortex requires 5-HT _{1A} receptors but not 5-HT _{2A} receptors.	69
2. Treball 2:	87
Selective enhancement of mesocortical dopaminergic transmission by noradrenergic drugs: Therapeutic opportunities in schizophrenia.	87

3. Treball 3:	105
Selective enhancement of cortical catecholamine release as a way to potentiate antidepressant treatments.	105
V. Discussió	145
1. Consideracions generals	147
1.1. Modulació dels nivells de dopamina cortical per antipsicòtics. Paper dels receptors 5-HT _{1A} i 5-HT _{2A}	148
1.2. Modulació de la dopamina cortical pel sistema noradrenèrgic	150
1.3. Noves estratègies farmacològiques per tractar la esquizofrènia i depressió	152
VI. Conclusions	155
VII. Bibliografia	159

Abreviacions

Abreviació	Significat
[³ H]8-OH-DPAT	8-hidroxi-N,N-dipropil-2-aminotetralina
5-HT	5-hidroxitriptofan; serotonina
5-HT _{1A}	Receptor de serotonina del subtipus 1A
5-HT _{2A}	Receptor de serotonina del subtipus 2A
6-OHDA	clorhidrat de 6-hidroxi-dopamina
AADC	l'enzim <i>aromàtic L-aminoàcid descarboxilasa</i>
ACTH	Adrenocorticotropina
ADN	Àcid desoxiribonucleic
AP	Coordenada anteroposterior
APTS	3-aminopropiltriètoxilà
ARNm	Àcid ribonucleic missatger
ATV	Àrea tegmental ventral
BDNF	Factor neurotròfic (<i>Brain-derived neurotrophic factor</i> , en anglès)
BNST	<i>Bed nucleus of stria terminalis</i> , en anglès
COMT	catecol-O-metil-transferasa
CRF	Factor d'alliberament de la corticotropina (<i>corticotropin-releasing factor</i> , en anglès)
D.O.R.	Densitat òptica relativa
DA	Dopamina
DAOA	Activador de D-aminoàcid oxidasa
DAT	Transportador de DA
DE	Diàmetre extern
DI	Diàmetre intern
DISC1	<i>Disrupted in Schizophrenia 1</i> , en anglès
DOI	1-[2,5-dimetoxi-4-iodofenil-2-aminopropà]
DOPA	3,4 dihidroxifenilalanina
DOPAC	Àcid 3,4-Dihidroxifenilacètic
DSM-IV	Manual de diagnosi i estadística 4 (<i>Diagnostic and statistical manual IV</i> , en anglès)
DSP-4	clorhidrat de N-(2-cloretil)-N-etil-2-bromobenzilamina
DTNBP1	Disbindina
DV	Coordenada dorsoventral
EEDQ	N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina
EPF	Escorça prefrontal
EPFm	Escorça prefrontal medial

EUA	Estats Units d'Amèrica
FAA	Fàrmacs antipsicòtics atípics
FST	Test natació forçada (<i>Forced swimming test</i> , anglès)
GPCRs	Receptors acoblats a proteïna G (<i>G-protein coupled detectors</i> , en anglès)
HClO₄	Àcid perclòric
HPA	Hipotàlem-pituitaria-adrenal
HPLC	cromatografia líquida d'alta resolució
i.p.	Intraperitoneal
KO	Ratolins genoanul·lats (<i>Knockout</i> , en anglès)
L	Coordenada lateral
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LCRa	líquid cefaloraquidi artificial
LSD	Dietilamida d'àcid lisèrgic
MAO	Monoamina oxidasa
MD	Nucli mediodorsal del tàlem
MeOH	metanol
Mirt	Mirtazapina
NAc	Nucli accumbens
NDRI	Inhibidor selectiu del NET i el DAT
NE	Noradrenalina
NET	Transportador de NE
NMDA	N-metil-D-Aspartat
NRG1	Neuregulina
PIC B8	àcid 1-octanosulfònic
PVN	Nucli paraventricular de l'hipotàlem
R 5-HT_{1A}	Receptor de serotonina del subtipus 1A
R 5-HT_{2A}	Receptor de serotonina del subtipus 2A
RD	Nuclis del rafe dorsal
Reb	Reboxetina
RM	Nuclis de rafe medial
s.c.	Subcutàni
SB-242084	6-clor-5-metil-1-[6-(2-metilpiridina-3-iloxi) piridina-3-il carbamoil] indol
SERT	Transportador de serotonina (<i>Serotonin transporter</i> , en anglès)
SNRI	Inhibidor selectiu del SERT i del NET
SSRI	Inhibidors selectius de la recaptació de serotonina (<i>Selective serotonin reuptake inhibitor</i> , en anglès)
WAY-100635	3 clorhidrat de N-[2-(4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil)etil]-N-(2-piridil) ciclohexà carboxamida
WM	Memòria de treball (<i>working memory</i> , en anglès)

I. *Introducció*

1. **Introducció general**

Les malalties del cervell representen avui en dia un dels problemes de salut més importants del món desenvolupat, tant pel que fa a malalties neurològiques d'ampli abast, com la malaltia d'Alzheimer, com pel que fa a malalties psiquiàtriques greus, com l'esquizofrènia i la depressió. Els costos socioeconòmics directes (tractaments) i indirectes (baixes laborals, incidència familiar, atenció al malalt, etc.) de les malalties del cervell a la UE dels 25 pugen fins als 286.000 milions de € anuals, dels quals gairebé 240.000 milions són deguts a malalties mentals (Andlin-Sobocki et al., 2005). Dins d'aquestes, depressió i esquizofrènia. La prevenció i correcte tractament d'aquestes dues malalties representen avui en dia un dels reptes més importants de la Neurociència.

2. **Esquizofrènia**

2.1. **Introducció**

L'esquizofrènia és un trastorn mental crònic i greu que afecta un 1 % de la població. Actualment mostra un 14 % de recuperació si es conta en els primers 5 anys després del diagnòstic (Robinson et al., 2004), i suma fins un 16 % si es mira la recuperació entre 15 i 25 anys després del primer episodi psicòtic (Harrison et al., 2001). A Europa, menys del 20 % dels malalts treballa (Marwaha et al., 2007), fet que demostra el greu caràcter invalidant de la malaltia.

L'esquizofrènia comprèn una gran varietat de símptomes que es solen classificar en tres classes de manifestacions clíniques (Lewis and Gonzalez-Burgos, 2006; Lewis and Lieberman, 2000):

1. Síntomes positius (psicòtics): amb al·lucinacions (percepcions sensorials falses sobretot de tipus auditiu), falses creences, dèficits en processar i avaluar informació, així com desorganització del pensament.

2. Síntomes afectius/negatius: pèrdua de motivació, apatia, desinterès social, i higiene personal i domèstica descurada. Dins d'aquest símptomes també s'inclou la depressió que pateixen molts d'aquest malalts.

3. Síntomes cognitius: greus problemes d'atenció, realització de funcions executives, i de memòria, en especial la memòria operativa o de curt termini (*WM, working memory*, en anglès).

A més, l'esquizofrènia està associada a una alta comorbiditat, com pot ser en un 30-50 % amb depressió i en un 50 % amb abús de drogues, i la severitat i cronicitat de la malaltia fa que un 5-10 % dels pacients cometi amb suïcidi.

Tradicionalment s'ha descrit que els primers símptomes de la malaltia acostumen a aparèixer durant l'adolescència o als inicis de l'edat madura, en referència sobretot a l'aparició de símptomes psicòtics (Figura 1). Més recentment, s'està plantejant que els símptomes psicòtics serien l'última etapa d'aquest trastorn (Insel, 2010), on una simptomatologia cognitiva i negativa és present en els anys previs al primer episodi psicòtic (Emilien et al., 1999; Jaber et al., 1996; Reichenberg et al., 2010; Sorensen et al., 2010; Woodberry et al., 2008).

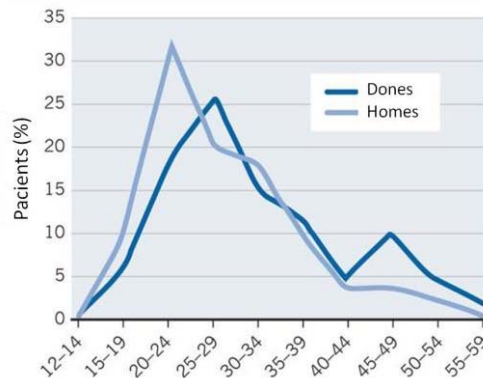


Figura 1. Distribució d'edats de la primera aparició de l'esquizofrènia en dones i homes (Dobbs, 2010).

2.2. Etiologia i fisiopatologia

Després de 100 anys d'estudi, l'esquizofrènia segueix tenint una etiologia desconeguda. En diversos estudis epidemiològics i d'adopció s'ha posat de manifest un fort component genètic a l'esquizofrènia. Així, de l' 1 % d'incidència a la població general es passa a un 50 % en el cas de bessons univitel·lins o fills de dos pacients esquizofrènics. S'han descrit diversos factors genètics (mutacions en determinats gens com COMT, DISC1, NRG1, DTNBP1...; per detall

Gen	Regió cromosomal	Funció del gen
NRG1	8p21-22	Guia axonal, sinaptogènesi, diferenciació glial, mielinització, neurotransmissió glutamatèrgica
DTNBP1	6p22.3	Funció glutamatèrgica presinàptica
DISC1	T(1, 11) (q42; q14.3)	Migració neuronal, arquitectura de les neurites i transport intracel·lular
COMT	22q11	Metabolisme dopaminèrgic
DAOA	13q22-34	Sistema glutamatèrgic

Taula 1. Gens implicats en l'esquizofrènia, modificat de (Di Forti et al., 2007). NRG1= neuregulina; DTNBP1=disbindina; DISC1= *disrupted in squizophrenia 1*, en anglès; COMT=catecol-O-metil-transferasa; DAOA=Activador de D-aminoàcid oxidasa.

revisar Taula 1) i ambientals (infeccions prenatales, complicacions obstètriques) que semblen donar certa vulnerabilitat a la malaltia (Tsuang, 2000). Però la influència de factors psicosocials (situació socioeconòmica baixa, estrès, soledat) són els que afavoreixen el desenvolupament d'aquesta malaltia en l'adolescència o principi de l'edat adulta (Insel, 2010; Lewis and Lieberman, 2000; Murray et al., 2008) (Figura2).

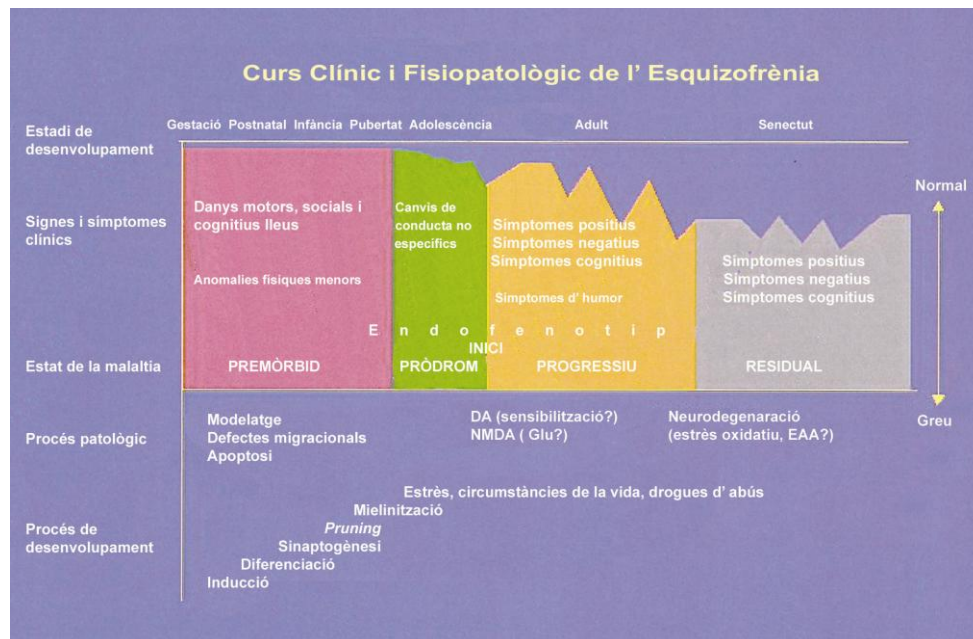


Figura 2. Esquema representatiu del curs clínic i fisiopatològic de l'esquizofrènia (Lewis and Lieberman, 2000).

Estudis post-mortem i de neuroimatge han revelat un gran nombre d'alteracions anatomopatològiques i neuroquímiques en el cervell d'esquizofrèncs (Harrison, 1999a; 1999b; Reynolds, 1995). Entre elles destaquen l'engrandiment dels ventricles i la disminució del volum cortical, hipocampal i talàmic, així com alteracions en els sistemes de neurotransmissió dopaminèrgic, serotoninèrgic, glutamatèrgic i GABAèrgic.

2.3. **Hipòtesis**

La primera hipòtesis de la esquizofrènia va ser postulada per Arvid Carlsson el 1978, on suggeria que una hiperactivitat del sistema dopaminèrgic era la causa de la malaltia (Carlsson, 1978). Des de llavors s'han postulat varies hipòtesis neuroquímiques, com la serotoninèrgica (Gouzoulis-Mayfrank et al., 1998), glutamatèrgica (Goff and Coyle, 2001) o GABAèrgica (Gonzalez-Burgos and Lewis, 2008; Lewis et al., 2005).

Amb els anys s'ha demostrat una disfunció dopaminèrgica en esquizofrènia (Laruelle et al., 1999) (Taula 2), però sembla que aquesta seria la conseqüència d'alguna altra alteració (Di Forti et al., 2007; Murray et al., 2008). De fet, diferents alteracions cerebrals en rosegadors relacionades amb psicosis, com poden ser lesions (hipocamp), drogues (amfetamina, fenciclidina, LSD), alteracions genètiques (COMT, Taula 1), tenen com a conseqüència comuna l'augment dels receptors D2 d'alta afinitat de dopamina (DA) en l'estriat (Seeman et al., 2005), fet que correlaciona amb l'augment dels receptors D2 de DA en estriat observats en pacients esquizofrèncs (Joyce et al., 1988; Mita et al., 1986; Wong et al., 1986).

Aquestes evidències promouen una creixent visió multifactorial de la malaltia, on s'inclouen la interacció entre monoamines, glutamat i GABA (Carlsson et al., 2001), i fins a una de les hipòtesis més acceptades recentment, i que engloba en part les anteriors, que és la del neurodesenvolupament (Insel, 2010; Lewis and Lieberman, 2000).

		Força de l'evidència
DA	Augment dels receptors D ₂ en l'estriat	++++*
	Augment del metabolisme i contingut de dopamina	+++*
	Augment de la transmissió dopaminèrgica estimulada per amfetamina	+++
	Disminució dels receptors de dopamina D ₁ corticals	+
	Augment dels receptors D ₃ corticals	+
	Augment dels receptors D ₄	+/-
	Configuració anormal dels receptors D ₂	+/-
	Alteració de l'acoblament dels receptors de DA amb la proteïna G	+/-
5-HT	Disminució dels receptors 5-HT _{2A} corticals	+++
	Augment dels receptors 5-HT _{1A} corticals	++
	Relació concentració de 5-HIAA en LCRa amb simptomatologia negativa	+
Glutamat	Disminució de l'expressió de receptors no-NMDA d'hipocamp	++
	Augment de l'expressió cortical d'algunes subunitats del receptor NMDA	++
	Augment de la recaptació de glutamat en l'escorça frontal	+
	Disminució de l'alliberació de glutamat a l'escorça	+
	Concentracions alterades de glutamat i els seus metabòlits	+/-

Taula 2. Resum de canvis neuroquímics en l'esquizofrènia. +/- =poc; +=moderat; += bona; +++=forta i ++++=demostrat en metanàlisis. *Tot i que l'augment es degut principalment al tractament (Harrison, 1999a).

2.3.1. Hipòtesi dopaminèrgica de l'esquizofrènia

Arvid Carlsson es va basar en observacions farmacològiques indirectes per postular una hiperactivació general del sistema dopaminèrgic en esquizofrènia (Carlsson, 1978). Entre elles hi havia l'evidència de que els agents antipsicòtics disminueixen transmissió dopaminèrgica (bloquejant receptors DA D₂), que els agonistes dopaminèrgics indirectes com la d-amfetamina a dosis altes indueixen psicosis en subjectes no esquizofrènics, i finalment, que dosis baixes d'agonistes dopaminèrgics empitjoren els símptomes de pacients esquizofrènics.

Anys més tard, Weinberger va refinar aquesta hipòtesi (Weinberger, 1987; Weinberger et al., 1994) i va postular que en l'esquizofrènia hi ha una hiperactivació del circuit dopaminèrgic mesolímbic (circuit de recompensa), que seria el responsable de la simptomatologia positiva, mentre que la via dopaminèrgica mesocortical (responsable de la modulació de funcions cognitives) estaria hipoactiva, i seria responsable dels danys cognitius i negatius de la malaltia.

2.3.2. Hipòtesi del neurodesenvolupament

En aquesta hipòtesi es postula que l'acumulació de factors de risc en diferents etapes de la vida és el que dona vulnerabilitat a desenvolupar esquizofrènia. Així, una càrrega genètica determinada conjuntament amb factors ambientals podrien alterar el desenvolupament normal del cervell, i en particular de l'escorça prefrontal que es troba en fase de maduració fins arribar a l'edat adulta (Figura 3) (Insel, 2010; Lewis and Lieberman, 2000).

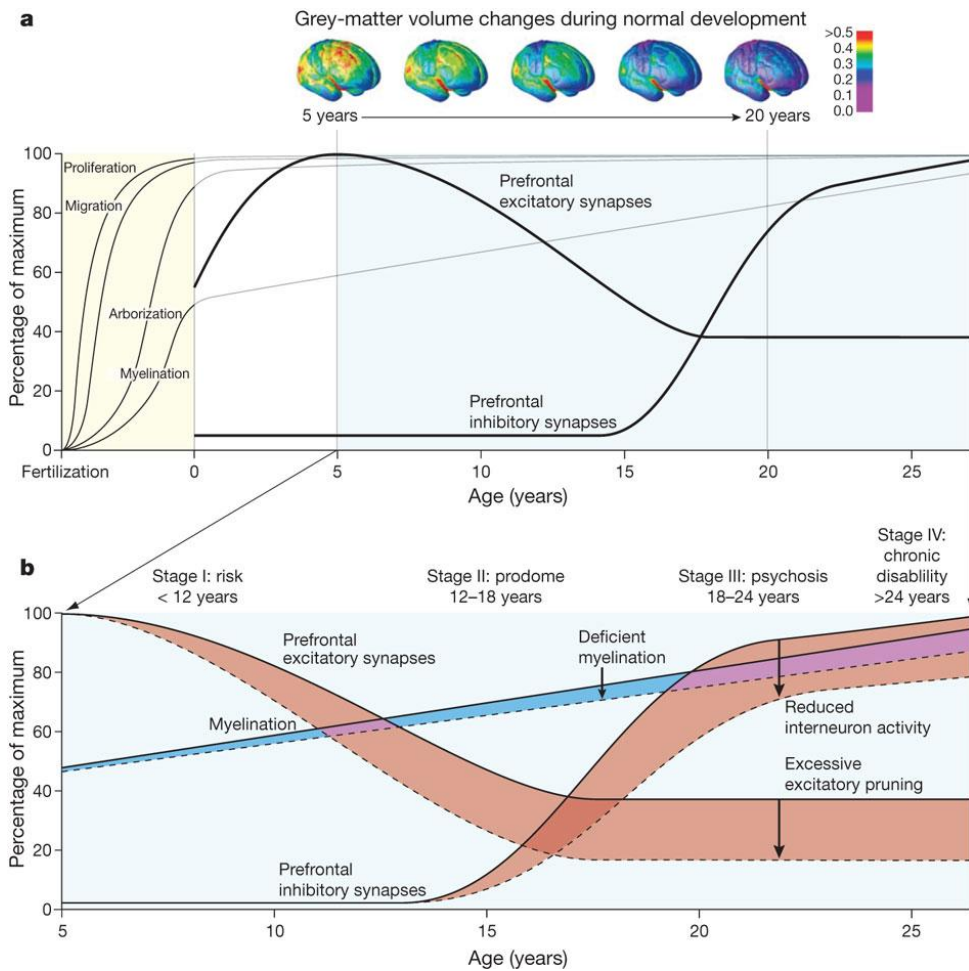


Figura 3. Canvis produïts en el cervell durant un desenvolupament normal (Insel, 2010).

De fet, els gens que s'han vist implicats en l'esquizofrènia són bàsicament de dos tipus (Harrison and Weinberger, 2005) (Taula 1), gens implicats en el desenvolupament i plasticitat sinàptica (NRG1, DISC1, DTNBP1) i gens implicats en el metabolisme de la catecolamines (COMT, veure apartat 1.6.2.3).

La càrrega genètica sola no explica la malaltia, però juntament amb factors ambientals tant pre-, peri- com postnatsals poden resultar en una connectivitat deficient entre diferents zones cerebrals com el cervell mig, nucli accumbens, tàlem, temporal-límbic i escorça prefrontal (Selemon and Goldman-Rakic, 1999). Al finalitzar l'etapa de desenvolupament del cervell i canvis durant l'adolescència (mielinització, eliminació de sinapsis excitadores, creació de sinapsis inhibidores, canvis hormonals en la pubertat...), és quan els circuits neuronals es mostren més vulnerables a l'estrès i poden desembocar en l'aparició de símptomes psicòtics (Figura 3) (Insel, 2010; Lewis and Lieberman, 2000).

2.4. **Tractaments**

El primer fàrmac antipsicòtic, la clorpromazina, es va descobrir a mitjans dels anys 50 i va ser el primer d'una sèrie de fàrmacs anomenats clàssics. Els antipsicòtics clàssics, com l'haloperidol, tenen com a característica fonamental el bloqueig del receptor D2 de DA, fet que correlaciona amb la seva efectivitat clínica (Seeman and Lee, 1975) (Figura 4). Aquests fàrmacs tenen gran capacitat de millorar els símptomes positius de la malaltia, però produeixen efectes motors adversos (efectes extrapiramidals), hiperprolactinèmia i discinèsia tardana, fet que dificulta el tractament a llarg termini.

A meitats dels anys 70 es va descobrir la clozapina (Burki et al., 1973), amb un perfil farmacològic complex (Figura 4), on destaca la menor afinitat pel receptor D2 de DA que pel receptor de serotonina (5-HT) 5-HT_{2A}. La clozapina és l'únic fàrmac que ha mostrat superioritat en el tractament de l'esquizofrènia (Davies et al., 2008; Leucht et al., 2009; Swartz et al., 2008) però presenta un greu símptoma advers com és la agranulocitosis (Alvir et al., 1993).

A partir de la clozapina van començar a aparèixer la segona generació de fàrmacs antipsicòtics, anomenats antipsicòtics atípics (olanzapina, risperidona), i que pretenien assemblar-se a la clozapina evitant alguns dels seus efectes

secundaris. Al igual que la clozapina, aquests fàrmacs també tenen certa afinitat per receptor D2 de DA però presenten major afinitat per receptor 5-HT_{2A} (Figura 4).

Sembla que l'antagonisme d'aquests fàrmacs pel receptor 5-HT_{2A} seria el responsable de la millora dels símptomes negatius i cognitius de l'esquizofrènia, (Kuroki et al., 1999; Meltzer, 1999), com a conseqüència d'un augment de l'alliberació de DA a l'escorça prefrontal (Rollema et al., 1997). Una altra hipòtesi és que la baixa afinitat i ràpida dissociació dels fàrmacs antipsicòtics atípics al receptor D2 de DA és la responsable de les seves propietats atípiques (Kapur and Seeman, 2000).

Més recentment s'estan introduint una nova classe d'antipsicòtics (de tercera generació), com l'aripirazol, que presenten un agonisme parcial pel receptor D2

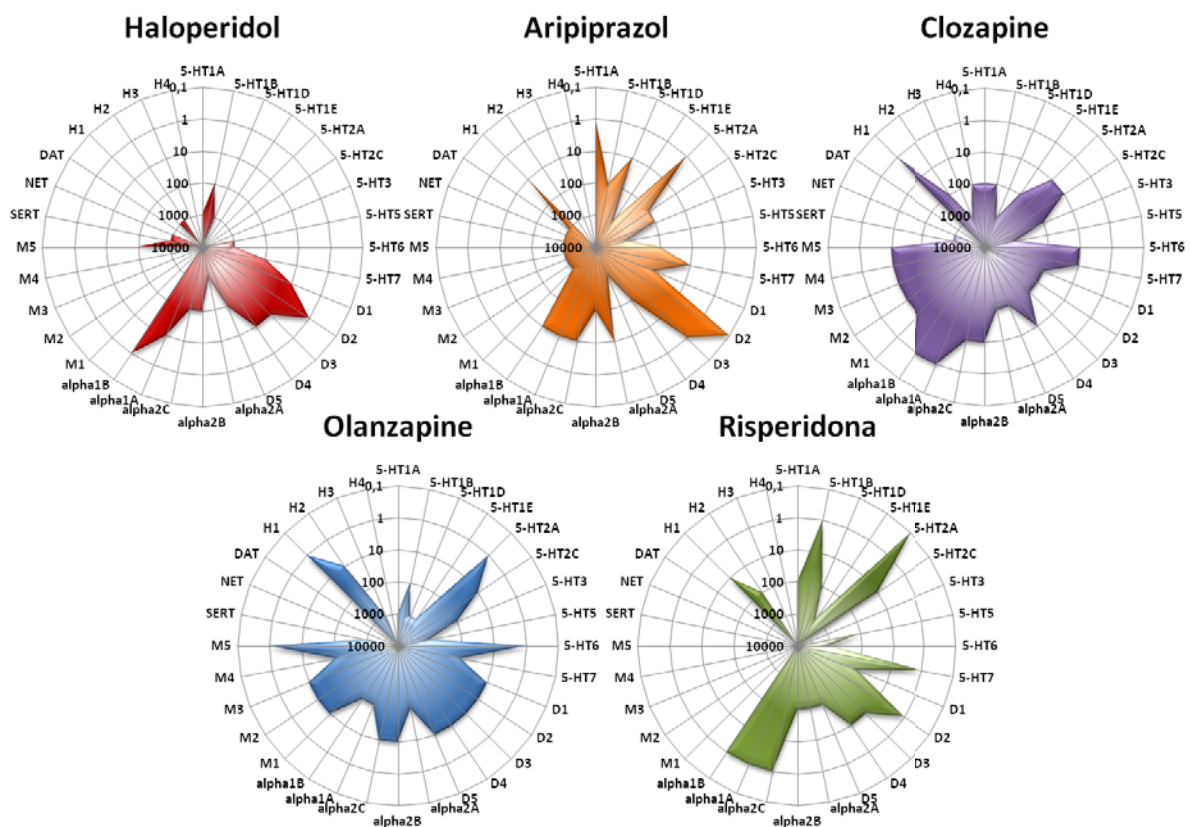


Figura 4. Representació radial d'afinitats (K_i) de diferents antipsicòtics sobre múltiples receptors, dades obtingudes a la PDSP K_i Database (<http://kidd.cwru.edu/>), i modificades de (Dobbs, 2010; Roth et al., 2004). L'eix radial expressa els valors de K_i desde menor de 10000 (centre, poca afinitat) a 0.1 (exterior, molta afinitat).

de DA i un agonisme al receptor 5-HT_{1A} de 5-HT (Bishara and Taylor, 2008; Lieberman, 2004). Aquest agonisme parcial al receptor D2 de DA permetria que actués com a antagonista en la via mesolímbica (hiperactivada en esquizofrènia) mentre que faria d'agonista en la via mesocortical (hipoactivada en esquizofrènia) (Lieberman, 2004).

Per últim, també s'estan provant una nova classe d'antipsicòtics amb agonisme pel receptor metabotrópic de glutamat (mGlu2/3) (Patil et al., 2007), i que serien els primers en presentar una farmacologia diferent a l'afinitat pel receptor D2 de DA, fet que obre la porta al desenvolupament d'una nova generació de fàrmacs antipsicòtics.

Tot i els esforços per millorar el tractament dels pacients esquizofrènics, dos estudis recents, el primer dels EUA, anomenat CATIE (*Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness*, en anglès) i el segon del Regne Unit, anomenat CUtLASS (*Cost Utility of the Latest Antipsychotic Drugs in Schizophrenia Study*, en anglès), van concloure que en general els antipsicòtics de segona generació eren terapèuticament similars als de primera generació, però amb diferents efectes adversos, i només la clozapina era considerada superior en pacients resistent al tractament (Davies et al., 2008; Swartz et al., 2008).

3. **Depressió**

3.1. **Introducció**

La depressió és un trastorn psiquiàtric freqüent i una de les malalties més greus de la societat, amb grans costos personals i socials degut a la baixa productivitat laboral dels pacients, amb gran absentisme i utilització de serveis sanitaris (Simon, 2003). Existeixen diferents subtipus de depressió basats només en la simptomatologia, on la depressió major (o unipolar) és el tipus de depressió més severa i comuna. Altres subtipus de depressió inclouen la distímia, la bipolar, la depressió melancòlica, la reactiva, la psicòtica i la atípica (Nestler et al., 2002).

La depressió major té un prevalença total d'un 17 % als EUA, considerada greu en un 30 % dels pacients, amb un percentatge major en dones, i una prevalença de 12 mesos d'un 7 % (Kessler et al., 2005a; Kessler et al., 2005b). A més a més, entre un 40 i un 50 % dels pacients depressius no responen correctament als tractaments antidepressius (Nierenberg and Amsterdam, 1990; Trivedi et al., 2006).

Els principals símptomes de la depressió major estan resumits a la Taula 3. Entre altres es troben alteracions de l'estat d'ànim i de funcions cognitives. Els pacients depressius també tenen alta comorbiditat (trastorns d'ansietat,

Sintomatologia de la depressió major
Estat d'ànim depressiu la major part del dia
Irritabilitat
Autoestima baixa
Sentiments de desesperança, inutilitat, falta de valor i culpabilitat
Disminució d'interès o plaer per totes o la majoria d'activitats del dia
Disminució de la capacitat de pensar i concentrar-se
Augment o disminució de la gana
Augment o disminució de pes
Insomni o son excessiu
Fatiga o pèrdua d'energia
Augment o retard psicomotor
Pensaments recurrents en la mort o el suïcidi

Taula 3. Síntomes de la depressió major. El diagnòstic (segons DSM-IV, 2000) es produeix quan alguns dels símptomes mencionats a sobre es perllonguen durant un període superior a dues setmanes i afecten el funcionament normal social i ocupacional (Cryan et al., 2002a; Nestler et

cardiovasculars, diabetis, Parkinson, Alzheimer) i solen tenir alta mortalitat (associada a l'alt risc de suïcidi i a trastorns cardiovasculars).

3.2. Etiologia i fisiopatologia

La etiologia de la depressió actualment s'explica per una moderada contribució genètica (30-40 % hereditari) i una complexa interacció amb l'ambient (Nestler et al., 2002; Sullivan et al., 2000). Tot i que no s'ha identificat de forma consistent cap alteració gènica en pacients depressius, sembla que alteracions en els promotors del receptor 5-HT_{1A} (Savitz et al., 2009), el transportador de 5-HT (SERT) (Caspi et al., 2003) i polimorfismes dels enzims triptòfan hidroxilasa 2, COMT i monoamina oxidasa (MAO) A, així com del factor neurotròfic BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*, en anglès), estarien implicats en la patologia (Savitz and Drevets, 2009b). Per altra banda, els factors ambientals més importants per desenvolupar la malaltia són conseqüència de l'estrès i els traumes emocionals. També s'ha descrit que alteracions endocrines (hipercortisolisme o hipotiroidisme), càncers, efectes secundaris de fàrmacs, etc, poden ser factors de risc per desenvolupar depressió (Krishnan and Nestler, 2008).

L'eix hipotàlem – pituïtari - adrenal (HPA) es troba hiperactivat en aproximadament un 50 % dels malalts depressius (Holsboer, 2001; Sachar and Baron, 1979). Aquesta hiperactivació de l'eix sembla la responsable dels símptomes neurovegetatius (alteració del son, gana, energia i ritme circadià) dels pacients depressius (Nestler et al., 2002; Slattery et al., 2004).

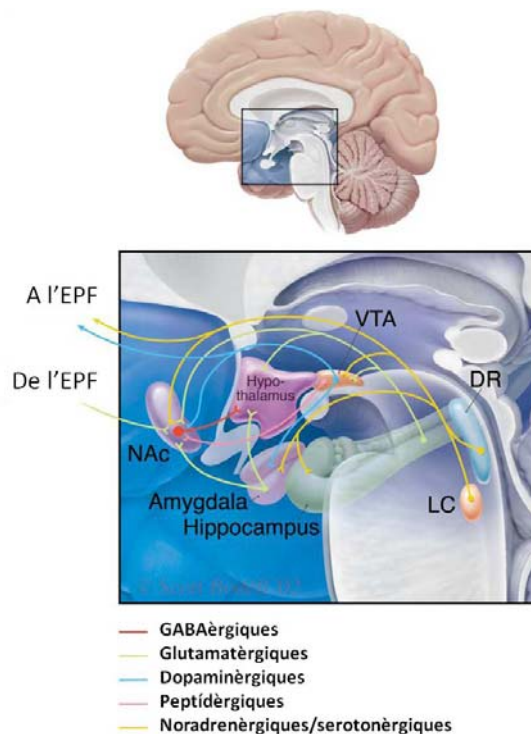
També s'ha descrit una hipodopaminèrgia en malalts depressius, que explicaria l'augment dels receptors de DA D2 a nivell estriatal i la hipersensibilitat a psicoestimulants (Dunlop and Nemeroff, 2007; Papakostas, 2006; Tremblay et al., 2005).

A més, estudis anatòmics i funcionals han descrit disminucions de la matèria gris, de densitat glial i hipometabolisme en escorça prefrontal dorsolateral. També s'han descrit disminucions de l'hipocamp de pacients així com de l'activitat estriatal, i augments de l'activitat de l'amígdala i de la zona cingulada 25 (Cg25) (Krishnan and Nestler, 2008; Savitz and Drevets, 2009a). Tot i així, els circuits

neuronal implicats en depressió no estan ben definits i sembla que són diferents regions les que explicarien diferents símptomes. Per exemple, l'escorça prefrontal i l'hipocamp estarien implicades en els símptomes cognitius, mentre que l'estriat ventral i l'amígdala en les alteracions emocionals (anhedonia, motivació, etc.).

3.3. Hipòtesis

La primera hipòtesi de la depressió es va postular a meitats dels anys 60 (Coppen, 1967; Schildkraut, 1965) i postulava una disminució general de l'activitat monoaminèrgica en el cervell de depressius. Més tard, i per la gran relació entre estrès i depressió, es va descriure el model d'alteració de l'eix HPA (Holsboer, 2001; Holsboer and Barden, 1996). Com que les hipòtesis anteriors no expliquen el retard en l'efecte dels tractament, es va pensar que es necessitaven



Circuits neuronals implicats en la depressió.

La figura mostra un resum simplificat dels circuits cerebrals que contribueixen en els símptomes depressius. Mentre que la recerca en aquest camp s'ha centrat a l'estudi de l'hipocamp i l'escorça frontal (p.ex. l'EPF), cada cop més s'impliquen altres estructures subcorticals relacionades amb recompensa, por i motivació. Aquestes inclouen el NAc, amígdala, i hipotàlem. La figura només mostra una part de totes les interconnexions entre aquestes regions cerebrals. La figura també mostra la innervació d'aquestes regions per les neurones monoaminèrgiques. L'ATV proveeix d'inputs dopaminèrgics al NAc, amígdala, EPF, i altres estructures límbiques. La NE (del LC) i la 5-HT (dels nuclis del rafe) innerven totes les regions mostrades en la figura. A més, hi ha fortes connexions entre l'hipotàlem i la via ATV-NAc.

Figura 5. Esquema dels circuits neuronals implicats en depressió i la seva innervació monoaminèrgica (Nestler et al., 2002). EPF, escorça prefrontal; VTA, àrea tegmental ventral; DR, nucli del rafe dorsal; LC, *locus coeruleus*; NAc, nucli accumbens.

canvis en l'expressió de factors de transcripció i d'expressió gènica, i d'aquí va sorgir la hipòtesi neurotròfica de la depressió (Duman, 2004; Duman et al., 1997). Totes tres hipòtesis estan relacionades (Figura 5) i han servit per ampliar el coneixement sobre la fisiopatologia de la depressió i per explicar diferents processos alterats en la malaltia (per revisió mirar (Ansorge et al., 2007; Krishnan and Nestler, 2008; Nestler et al., 2002; Slattery et al., 2004). Per exemple, l'activitat monoaminèrgica modula en part l'activitat de l'eix HPA i també l'expressió de BDNF, i a la inversa, l'eix HPA modula l'activitat de les neurones monoaminèrgiques.

3.3.1. Hipòtesi monoaminèrgica

Schildkraut va descriure la hipòtesi catecolaminèrgica de la depressió el 1965, (Schildkraut, 1965) a partir dels efectes de la reserpina, la imipramina i el iproniazid. La reserpina, fàrmac que buida les vesícules sinàptiques monoaminèrgiques, s'utilitzava contra la hipertensió i produïa símptomes depressius en alguns pacients, mentre que el iproniazid (fàrmac contra la tuberculosi) i la imipramina (fàrmac desenvolupat com a antihistamínic) tenien activitat antidepressiva, i ambdós augmenten la noradrenalina (NE) i serotonina en l'espai extracel·lular.

Poc després, Coppen (Coppen, 1967) va donar-li un paper més destacat a la serotonina, pel paper del triptòfan en la depressió. De fet, la hipòtesi serotoninèrgica va guanyar importància als anys 70 a l'aparèixer uns fàrmacs que inhibeixen selectivament el SERT, els SSRI (*Selective serotonin reuptake inhibitor*, en anglès), i que actualment encara són els més prescrits (Cipriani et al., 2009).

Els fàrmacs antidepressius que s'utilitzen actualment tenen menys efectes adversos, però encara estan dissenyats per augmentar la transmissió monoaminèrgica de forma aguda. Però independentment de l'estructura química, propietats farmacocinètiques o diana molecular o cel·lular en el cervell, tots els medicaments antidepressius s'han d'administrar durant setmanes per a produir una millora clínica significativa (per exemple un 50 % de reducció de la gravetat). Aquest retard es considera necessari perquè es duguin a terme processos adaptatius en el cervell responsables de la millora clínica (que involucren canvis moleculars i cel·lulars, degut en part a l'activació

d'autoreceptors inhibitoris en les neurones monoaminèrgiques), i que serien secundaris a l'augment de les monoamines.

3.3.2. Hipòtesi de l'alteració de l'eix HPA

L'eix HPA s'ha vist hiperactivat en una part dels malalts depressius (Holsboer, 2001). En resposta a l'estrès, s'ha descrit que el cervell reacciona activant aquest eix HPA (Figura 6) (Riedemann et al., 2010). Les neurones del nucli paraventricular de l'hipotàlem secreten el factor d'alliberament de la corticotropina (CRF), que estimula la síntesis i la secreció de la adrenocorticotropina (ACTH) en la pituitària anterior. Aquesta ACTH estimula la síntesi i secreció de glucocorticoides (cortisol en humans, corticosterona en rosegadors) de l'escorça adrenal, i són els glucocorticoides, via l'acció directa a diferents zones cerebrals, que afecten àmpliament el metabolisme general i el comportament.

Els glucocorticoides també autoregulen l'activitat de l'eix HPA de forma precisa a través de diferents àrees del cervell. Així, l'augment de glucocorticoides (degut a l'estrès) actua sobre l'hipocamp i les neurones del nucli paraventricular de l'hipotàlem (PVN), inhibint la síntesi i alliberació de CRF, restablint el sistema i finalitzant la resposta a l'estrès (Riedemann et al., 2010). Però un increment sostingut del nivell dels glucocorticoides (com els produïts per un estrès perllongat), pot danyar les neurones de l'hipocamp (arborització i espines dendrítiques), reduir-ne la neurogènesis, i, degut a la reducció del control inhibitori de l'eix HPA per part de l'hipocamp, afavorir que aquest entri en una retroalimentació positiva (Fuchs and Gould, 2000; Grote and Hannan, 2007; Riedemann et al., 2010). Aquestes alteracions explicarien l'augment sostingut de glucocorticoides en la meitat dels pacients depressius, el volum reduït de l'hipocamp i també alteracions neurovegetatives i cognitives de la malaltia.

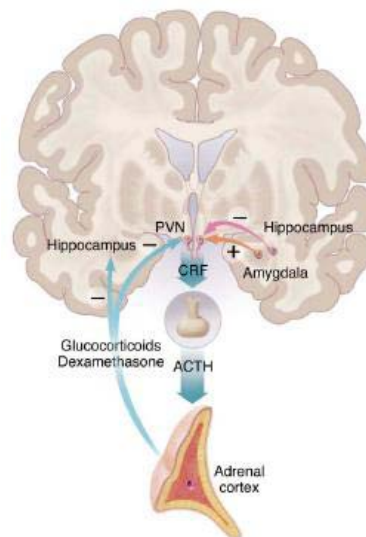


Figura 6. Regulació del eix hipotàlem-pituitari-adrenal (Nestler et al., 2002).

3.3.3. Hipòtesi neurotròfica

La hipòtesi neurotròfica de la depressió (Duman, 2004; Duman et al., 1997) postula una disminució dels factors neurotròfics durant el desenvolupament de la depressió, que seria el responsable dels volums reduïts d'hipocamp i d'altres àrees del prosencèfal. A més, els antidepressius millorarien la simptomatologia depressiva revertint aquest dèficit (Figura 7).

Els factors neurotròfics es van caracteritzar inicialment com factors de creixement i diferenciació neuronal que s'expressaven durant el desenvolupament. Actualment també es coneix que en l'adult regulen la plasticitat i la supervivència de neurones adultes i glia.

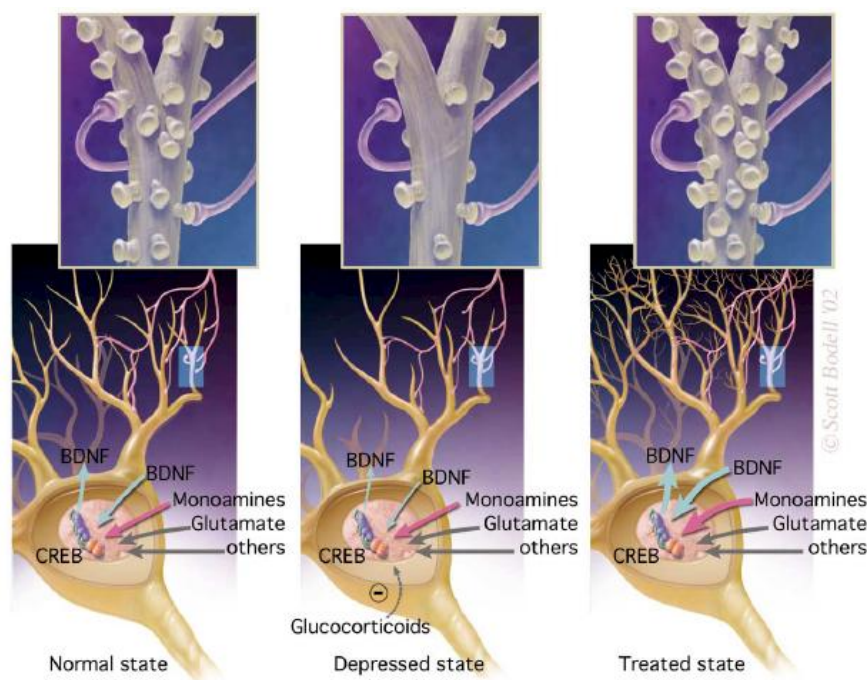


Figura 7. Mecanismes neurotròfics en depressió (Nestler et al., 2002). Al panell de l'esquerra es mostra una neurona piramidal hipocàmpica i la seva innervació per neurones glutamatèrgiques, monoaminèrgiques i altres. També es mostra la seva regulació per BDNF (derivat de l'hipocamp o altres àrees cerebrals). L'estrès sever provoca canvis en aquestes neurones (panell central), que inclou una reducció de l'arborització dendrítica, reducció de l'expressió de BDNF (que podria ser un dels factors que produeixen els efectes dendrítics). La reducció de BDNF es produïda en part per l'excés de glucocorticoides, que poden interferir en els mecanismes normals de transcripció (p.ex. CREB) que controlen l'expressió de BDNF. Els antidepressius produeixen l'efecte oposat (panell dret): augmenten les arboritzacions dendrítiques i l'expressió de BDNF de les neurones hipocàmpals. Amb aquestes accions, els antidepressius semblen revertir i prevenir les accions de l'estrès a l'hipocamp, i millorar alguns símptomes de la depressió.

Concretament, el factor neurotròfic BDNF ha sigut el centre d'atenció en depressió. És un factor que s'expressa en les estructures límbiques adultes de forma abundant. A més, s'ha vist que l'estrès disminueix els nivells de BDNF d'hipocamp (Smith et al., 1995a), que aquesta disminució es deguda en part a l'excés de glucocorticoides (Smith et al., 1995b), que antagonistes del receptor 5-HT_{2A/2C} de 5-HT impedeixen aquesta reducció provocada per estrès (Vaidya et al., 1997), i finalment que el tractament crònic amb antidepressius n'augmenta l'expressió (Nibuya et al., 1995; Smith et al., 1995a).

Tot i així, estudis recents proposen una revisió d'aquesta hipòtesi, ja que tant en estudis preclínic com en rosegadors donen resultats inconsistents (Groves, 2007), i tot i que s'accepta que el BDNF està implicat en la simptomatologia i tractament de la depressió, no es clar que estigui relacionat amb l'etiologia de la malaltia.

3.4. **Tractaments**

Actualment existeixen diferents aproximacions per tractar la depressió, que van des de psicoteràpia per tractar la simptomatologia més lleu, passant per farmacoteràpia, la estimulació magnètica transcranial, i fins a electroteràpia per les més severes, que inclou la estimulació cerebral profunda, la estimulació del nervi vago i la teràpia electroconvulsiva. Per revisió mirar (Fava and Kendler, 2000; Millan, 2006; Nemeroff, 2007).

Els tractaments farmacològics clàssics es basen en incrementar la transmissió monoaminèrgica (Figura 8). Els primers fàrmacs que es van utilitzar com antidepressius eren inhibidors irreversibles de la MAO (enzim que degrada les monoamines; veure apartat 1.6.2.3), i els antidepressius tricíclics, que bloquegen el SERT i el transportador de NE (NET) i es caracteritzen per tenir tres anells en la seva estructura molecular. Ambdós antidepressius produeixen molts efectes secundaris, sobretot cardiovasculars, i per això s'ha limitat el seu ús.

A partir d'aquí va sorgir la segona generació d'antidepressius, que comprenen els inhibidors selectius de la recaptació, tant de serotonina (SSRI), com de NE i que són millor tolerats. Els inhibidors selectius del transportador de DA (DAT), tot i ser bons antidepressius (per exemple amineptina), no s'utilitzen degut a

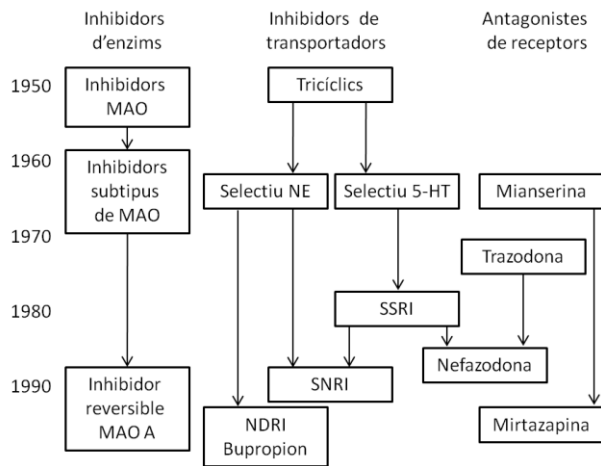


Figura 8. Evolució dels fàrmacs antidepressius monoaminèrgics (Nutt, 2006; Slattery et al., 2004).

problemes relacionats amb l'addicció com la tolerància (Haddad, 1999). Així doncs, els SSRI encara són els fàrmacs més utilitzats en depressió, tot i que cada cop es tendeix a buscar accions combinades, com fàrmacs que inhibeixen tant el SERT com el NET (SNRI), el NET i el DAT (NDRI) i últimament els inhibidors triples de la recaptació (SERT + NET + DAT) (Chen

and Skolnick, 2007; Millan, 2009). Més recentment s'estan dissenyant nous fàrmacs antidepressius amb dianes moleculars diferents de les amines, com per exemple els antagonistes dels receptors de CRF, antagonistes de receptors de neuropèptids, i fins i tot antagonistes del receptor NMDA de glutamat (ketamina).

A part, actualment s'utilitzen moltes estratègies de combinació de fàrmacs

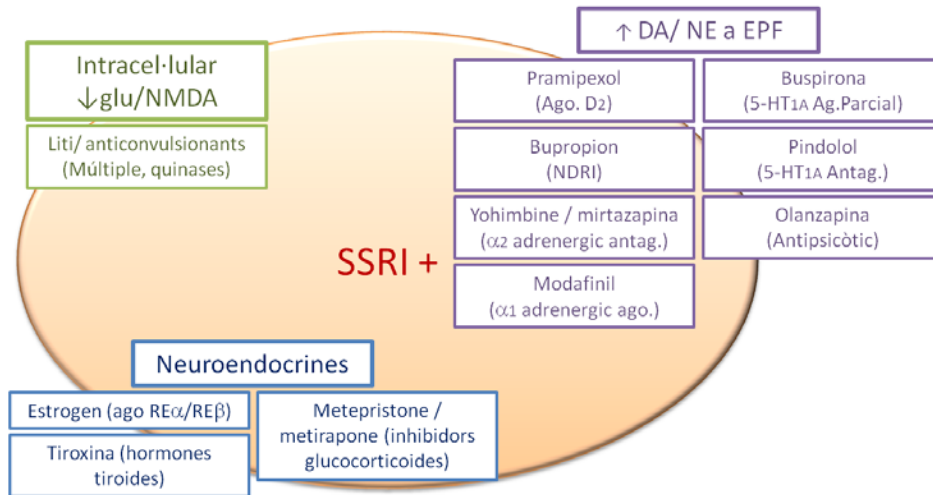


Figura 9. Esquema d'algunes estratègies de combinació de fàrmacs per augmentar la resposta terapèutica dels antidepressius. Normalment els coadjuvants s'afegeixen al tractament amb SSRI. Els tres tipus d'acció dels coadjuvants no s'exclouen mútuament (Millan, 2006).

antidepressius amb altres fàrmacs, no necessàriament antidepressius (Figura 9) i que intenten suplir les mancances i el retard en la resposta terapèutica d'aquests.

També s'estan buscant estratègies per identificar i utilitzar la farmacoteràpia més adequada en cada cas, com ho representen els projectes IMPACTS (*Implementation of Algorithms using Computerized Treatment Systems*, en anglès) i el STAR*D (*Sequenced Treatment Alternatives to Relieve Depression*, en anglès) (Trivedi et al., 2007; Trivedi and Daly, 2008).

4. **Escorça prefrontal**

L'escorça prefrontal (EPF) és l'àrea cerebral responsable de funcions cognitives i emocionals superiors, essencialment més integradores, i dedicades a la representació i execució d'accions. Així doncs, l'EPF pot processar informació externa (amb tots els sistemes sensorials, i amb estructures motores corticals i subcorticals) així com informació interna (límbica i estructures del cervell mig implicades en afecte, memòria i recompensa), sintetitzar-la, i controlar l'execució d'accions en funció de l'entorn (Fuster, 2001; Miller and Cohen, 2001; Miller et al., 2002). La dopamina té un paper clau en aquestes funcions que es detalla en l'apartat 1.6.3.

4.1. **Anatomia i connectivitat**

L'EPF es troba en la part més rostral del lòbul frontal i constitueix el nivell més alt en la jerarquia de les escorces cerebrals, amb un desenvolupament filogenètic i ontogenètic més tardà. De fet, l'EPF en el cervell dels humans arriba a tenir el creixement relatiu més gran, on ocupa aproximadament un terç del neocòrtex, i no assoleix la maduresa (completa mielinització i sinaptogènesis) fins a l'adolescència (Fuster, 2001).

L'EPF d'humans i primats està dividida en tres subregions: orbital, medial i lateral. L'EPF orbital i medial estan implicades principalment en comportament

emocional i controla activitats visceral i autònomes. En canvi, L'EPF lateral –en particular la dorsolateral- que és la més desenvolupada en humans, proporciona el suport cognitiu necessari per a l'organització temporal del comportament, la parla i el raonament. Aquesta organització temporal està basada en xarxes neuronals que representen la memòria a llarg termini de seqüències comportamentals, plans i esquemes d'acció (memòria executiva), i és necessària per altres funcions relacionades com és la WM o memòria operativa (Fuster, 2001).

La funcionalitat de l'EPF no es deguda a l'estructura *per se*, sinó que depèn de la seva gran connectivitat, generalment recíproca. Concretament, l'EPF rep i envia projeccions a pràcticament totes les escorces sensorials i motores així com a estructures subcorticals (Figura 10) (Fuster, 1997; Groenewegen and Uylings, 2000; Hoover and Vertes, 2007; Vertes, 2004).

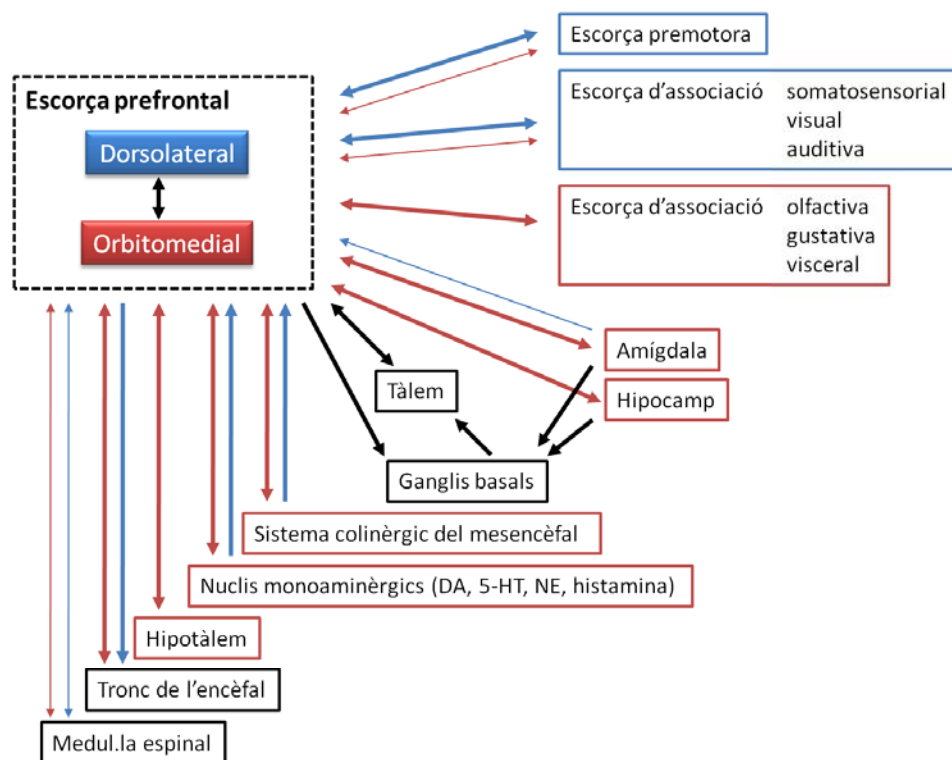


Figura 10. Esquema representatiu de la connectivitat de l'escorça prefrontal dorsolateral (blau) i orbitomedial (vermell) de primat. En negre connexions comunes (modificat de (Groenewegen and Uylings, 2000).

Entre les estructures subcorticals destaca la gran connectivitat recíproca de l'EPF amb el tàlem, concretament el nucli mediodorsal (MD), que ha estat utilitzat com un criteri per poder definir l'EPF de diferents espècies (Fuster, 1997; Rose and Woolsey, 1947). L'EPF també projecta als nuclis monoaminèrgics (ATV, àrea tegmental ventral; LC, *locus coeruleus*; i RD i RM, nuclis del rafe dorsal i medial), l'hipotàlem lateral, el sistema límbic (amígdala i hipocamp), ganglis basals (caudat-putamen, nucli accumbens) i a l'habènula lateral, entre altres (Figura 10) (Fuster, 2001; Groenewegen and Uylings, 2000; Uylings et al., 2003).

En la rata, l'EPF també es divideix en tres subregions: orbital, medial (EPFm) i lateral. I a la vegada, l'EPFm es divideix en tres zones: cingulada anterior, prelímbica, i infralímbica. Estudis de connectivitat i funcionalitat suggereixen que la zona prelímbica de rata seria anàloga a la EPF dorsolateral de primats, mentre que la zona infralímbica ho seria de la EPF orbitomedial (Uylings et al., 2003; Vertes, 2004; 2006).

4.2. **Citoarquitectura**

L'EPF en humans i primats està formada per sis capes o làmines, numerades de forma creixent des de la superfície de l'escorça fins a la matèria blanca (Figura 11) i mostra també una organització vertical en columnes (DeFelipe, 2002). Aproximadament un 75-80 % de les neurones corticals són piramidals. Aquestes neurones tenen un cos cel·lular amb forma triangular d'aproximadament 25-50 µm de diàmetre, una dendrita apical que es dirigeix cap a la superfície cortical, i diverses dendrites a la base. Les neurones piramidals són excitadores i envien projeccions a diferents àrees cerebrals segons en la capa on es trobi el cos cel·lular (Figura 11). I a la inversa, les aferències d'altres regions també innerven capes corticals específiques, per exemple, el tàlem innerva les capes III i IV, mentre que les neurones dopaminèrgiques innerven capes V i VI, i les noradrenèrgiques i serotoninèrgiques innerven totes les capes però més densament en la capa V. El 20-25 % restant de neurones de l'EPF són interneurons GABAèrgiques. Aquestes neurones tenen molta diversitat morfològica, bioquímica, fisiològica i funcional. A més, es troben distribuïdes per totes les capes corticals i els seus axons són molt arboritzats i innerven de forma

local a l'EPF (Beneyto and Lewis, 2010; DeFelipe, 2002; Lewis and Lieberman, 2000).

En la rata, la capa 4 granular no existeix i degut a la compactació de les capes només es distingeixen 4 capes: I, II/III, V i VI (Groenewegen and Uylings, 2000; Swanson, 1998).

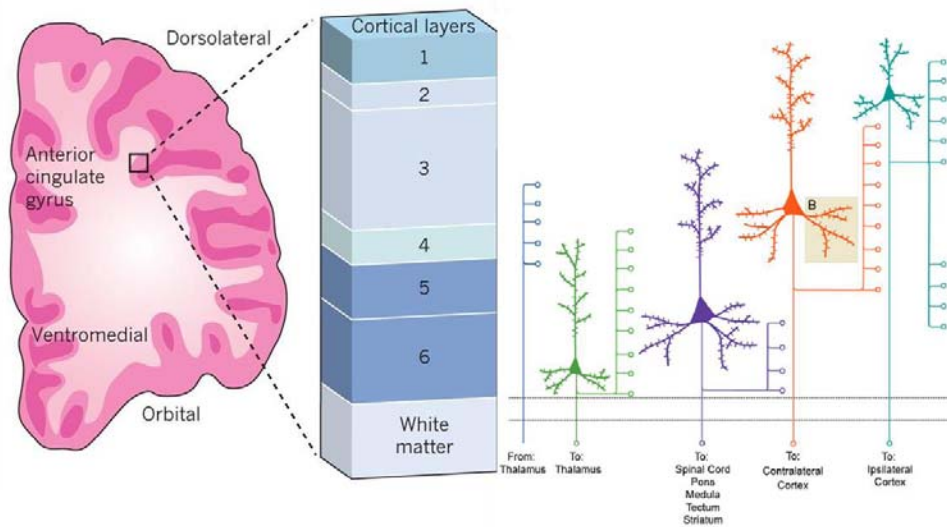


Figura 11. Esquema de les capes corticals de l'EPF i la posició de diferents neurones piramidals en funció de les seves projeccions, modificat de (Beneyto and Lewis, 2010; Dobbs, 2010).

4.3. Alteracions en esquizofrènia i depressió

Les funcions de l'EPF, tant emocionals com cognitives, s'han vist alterades en malalties psiquiàtriques com l'esquizofrènia i la depressió (Lewis and Lieberman, 2000; Nestler et al., 2002). En ambdues malalties s'ha descrit una reducció del volum cortical, així com una reducció de la funció i el metabolisme energètic en l'EPF dels malalts (Harrison, 1999b; Savitz and Drevets, 2009a).

En particular en l'esquizofrènia, s'ha vist que les neurones piramidals de l'EPF són més petites i tenen menys densitat de dendrites de la base, més curtes i menys arboritzades, mentre que les neurones GABAèrgiques també tenen la

transmissió alterada (Figura 12), per més detall revisar (Lewis and Lieberman, 2000; Lewis and Sweet, 2009).

Per altra banda, la dopamina té un paper molt important en la funció prefrontal (veure apartat I.6.3.; (Robbins, 2000; Williams and Goldman-Rakic, 1995). Una prova d'això l'obtenim d'estudis de neuroimatge, on es mostren anomalies en les vies dopaminèrgiques ascendents en pacients esquizofrènics (Abi-Dargham et al., 2002; Laruelle et al., 1996). Curiosament, els fàrmacs antipsicòtics atípics tenen el seu efecte en l'EPF, i sembla que milloren la simptomatologia negativa i cognitiva de l'esquizofrènia degut a l'augment de DA cortical que produeixen (Kuroki et al., 1999). Així mateix, els tractaments farmacològics antidepressius tendeixen a augmentar els nivells de monoamines, però a més s'ha vist que tant tractaments farmacològics com d'altres (teràpia electroconvulsiva, estimulació magnètica transcranial i privació del son) augmenten de forma consistent la dopamina cortical (D'Aquila et al., 2000; Lavergne and Jay, 2010).

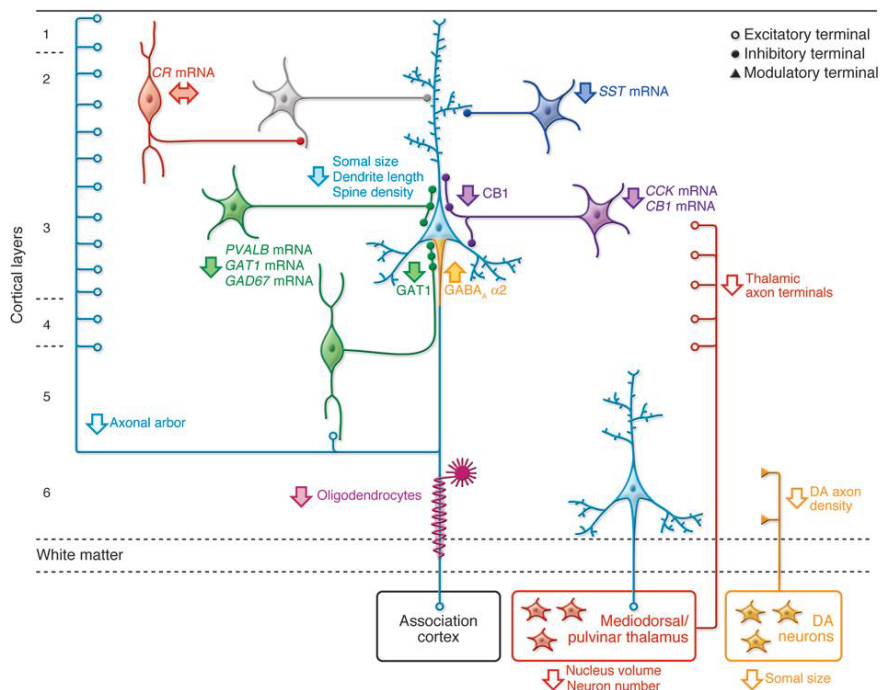


Figura 12. Esquema de alteracions en circuits corticals de l'EPF dorsolateral en humans (Lewis and Sweet, 2009). CB1, receptor de cannabinoides 1; CCK, colecistoquinina; CR, calretinina; GABA, àcid γ -aminobutíric; GABA_A α 2, subunitat α 2 del receptor de GABA_A; GAT1, transportador de GABA; GAD₆₇, glutamat descarboxilasa; PVALB, parvalbúmina; SST, somatostatina.

5. Nucli accumbens

El nucli accumbens (NAc) forma part del sistema límbic i concretament es troba en la part antero-ventral de l'estriat. Tot i així, tradicionalment se li han atribuït funcions diferents del propi estriat. Ja des de el 1980, Mogenson i coautors proposaven que el NAc funcionava com a interfase entre el sistema límbic i el motor (Mogenson et al., 1980). Més endavant, els estudis del NAc s'han centrat en el seu paper en la motivació i recompensa, en el control d'accions en resposta a estímuls imprevisibles temporalment (Nicola, 2007), fins a tenir un paper important en memòria i aprenentatge (Nelson et al., 2010; Pennartz et al., 2009) i en el control de conductes dirigides a l'obtenció de metes (*goal-directed behaviours*, en anglès) (Floresco, 2007; Grace et al., 2007).

5.1. Anatomia i connectivitat

Com ja hem comentat, el NAc està situat en la part antero-ventral de l'estriat, i conté dos subregions principals, *core* i *shell*, i una tercera, el pol rostral. El *core* es troba en la part central, directament sota i a continuació de l'estriat dorsal, i envoltant la comissura anterior, mentre que el *shell* envolta la part ventral i medial del *core* i alhora es pot dividir en medial, lateral i ventral (Groenewegen et al., 1999).

Les diferents subregions del nucli accumbens tenen una distribució d'aferències i eferències topogràficament no homogènia que reflecteix la seva complexa citoarquitectura (veure apartat 1.5.2.) (Groenewegen et al., 1999). Sense entrar en el detall, el NAc rep aferències excitadores d'escorces, com la formació hipocampal, l'escorça prefrontal, i l'amígdala basolateral, així com també del tàlem. Llavors el NAc (a l'igual que l'estriat) envia projeccions a àrees motores com el pàl·lid ventral que alhora projecta al nucli mediodorsal del tàlem i altres divisions talàmiques, completant el cercle cortico-estriat-palid-tàlamo-cortical (Figura 13). A més, el NAc és una zona molt innervada per fibres dopaminèrgiques que provenen principalment de l'ATV i menys de la substància negra pars compacta, i també rep aferències serotoninèrgiques del RM, i del nucli A2 noradrenèrgic, el nucli del tracte solitari (Brog et al., 1993; Delfs et al., 1998;

Groenewegen et al., 1999; Mogenson et al., 1980; Sesack and Grace, 2010). Sembla que aquesta dopamina modularia els processos d'aprenentatge i memòria regulant el flux d'informació provinents dels diferents inputs límbics (Floresco, 2007; Goto and Grace, 2008).

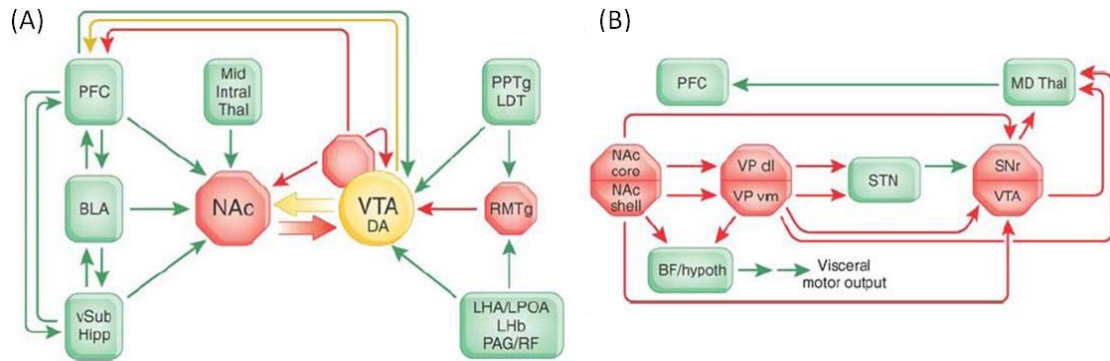


Figura 13. Principals (A) aferències i (B) eferències del NAC i l'ATV de regions cerebrals relacionades amb comportaments dirigits a l'obtenció de metes (Sesack and Grace, 2010). En vermell es mostren les estructures inhibidores, en verd les excitatòries i en groc la influència moduladora de la dopamina. BLA, amígdala basolateral; LHA/LPOA, hipotàlem lateral i àrea preòptica lateral; Lhb, habèntula lateral; Mid/Intra Thal, nucli talàmic medial i intralaminar; NAc, nucli accumbens; PAG/RF formació gris periaqueductal i reticular; PPTg/LDT, tegment pedunculopontí i laterodorsal; RMTg, nucli tegmental mesopontí rostromedial; VP, pàlid ventral; vSub/Hipp, subíclum ventral de l'hipocamp; VTA, àrea tegmental ventral; BF/hypoth, hipotàlem i prosencèfal basal; MD thal, nucli talàmic mediodorsal; SNr, substància negra reticulada; STN, nucli subtalàmic; VP dl/vm, VP dorsolateral i ventromedial.

5.2. Citoarquitectura

El NAC té característiques estriatals en un 90%, i com a tal, està format per neurones GABAèrgiques de projecció (*medium spiny neurons*, en anglès). La resta són interneurons locals, incloent neurones colinèrgiques i amb parvalbúmina (Meredith, 1999).

Tot i així, les subregions *core* i *shell* són morfològicament, neuroquímicament i funcionalment diferents. Una de les principals diferències és la distribució de la proteïna calbindina (proteïna que s'uneix al calci), que és localitzada més densament en el *core* que en el *shell* (Groenewegen et al., 1999). Concretament, el NAC *core* té una estructura compartimentalitzada i amb patrons de connectivitat segregats com en l'estriat, anomenada *patch-matrix*, on els *patches* són rics en acetilcolinesterasa i en receptors μ opiods, mentre que la

matrix és rica en fibres de somatostatina i calbindina, entre d'altres marcadors (Gerfen, 1992). En canvi el NAc *shell*, que com s'ha descrit anteriorment és molt poc immunoreactiu per la calbindina, no manté una estructura *patch-matrix* tant clarament segregada com en el *core*, però també està subdividida en poblacions o grups de neurones amb patrons d'aferències i eferències diferents de la població o grup veí (Groenewegen et al., 1999).

Aquestes diferències es manifesten funcionalment i neuroquímicament, per exemple s'ha descrit que l'estrès augmenta el metabolisme dopaminèrgic en el *shell*, i no en el *core*. Per altra banda, antipsicòtics com l'haloperidol augmenten els nivells de DA en el *core* i no en el *shell*, mentre que la clozapina produeix el mateix efecte en ambdues subregions (Deutch and Cameron, 1992).

5.3. **Alteracions en esquizofrènia i depressió**

El NAc forma part dels circuits implicats en la regulació d'emocions com són l'apatia i la motivació. Aquestes funcions, tot i no ser un criteri clínic per diagnosticar la malaltia per si sols (Levy et al., 1998), s'han vist alterades tant en pacients esquizofrènics com depressius (Levy and Dubois, 2006; Nestler and Carlezon, 2006).

Com ja s'ha esmentat en l'apartat 1.2.3.1., l'hipòtesi dopaminèrgica de l'esquizofrènia descriu una hiperactivitat de la via dopaminèrgica mesolímbica, que seria la responsable de la simptomatologia positiva (Breier et al., 1997; Weinberger, 1987). També s'ha descrit un augment dels receptors D2 de dopamina estriatals (Joyce et al., 1988; Mita et al., 1986; Wong et al., 1986).

En pacients depressius també s'ha trobat un augment dels receptors de dopamina D2 a nivell estriatal (Klimek et al., 2002; Shah et al., 1997) així com hipersensibilitat a psicoestimulants (Tremblay et al., 2005). Per revisió mirar (Dunlop and Nemeroff, 2007; Nestler and Carlezon, 2006; Papakostas, 2006).

A més a més, la gran connectivitat del nucli accumbens (Groenewegen and Uylings, 2000; Groenewegen et al., 1999; Sesack and Grace, 2010), li dona un paper crucial en la integració i processament d'informació d'estructures tant límbiques com corticals. Així doncs, alteracions patològiques en aquestes estructures aferents, com es el cas de l'escorça prefrontal (veure apartat 1.4.3),

hipocamp i el sistema dopaminèrgic en esquizofrènia i depressió, poden resultar en alteracions funcionals associades al nucli accumbens (Goto and Grace, 2005; 2008; Levy and Dubois, 2006).

6. **Sistemes monoaminèrgics**

Els neurotransmissors monoaminèrgics clàssics són la dopamina, la noradrenalina i la serotonina. Aquestes monoamines biogèniques s'han descrit com a sistemes que modulen una gran varietat de funcions, que van des de la locomoció fins a comportaments complexos associats a emocions. A més, alteracions en aquests sistemes s'han relacionat amb diferents patologies com l'esquizofrènia i la depressió (veure apartats 2 i 3).

6.1. **Origen i innervació dels sistemes monoaminèrgics en el sistema nerviós central**

En el sistema nerviós central es distingeixen setze grups neuronals catecolaminèrgics i nou de serotoninèrgics (Dahlstroem and Fuxe, 1964) (Figura 14).

Els grups dopaminèrgics són nou (Figura 14 A), tres es troben en el mesencèfal (A8: grup retrorubral, A9: substància negra i A10: ATV), cinc en el diencèfal (A11, A12, A13, A14 i A15) i un en el bulb olfatori (A16) (Bjorklund and Dunnett, 2007; Dahlstroem and Fuxe, 1964). La dopamina és abundant en l'estriat, el nucli accumbens, el tubercle olfatori, l'amígdala, l'eminència mitja i algunes àrees de l'escorça prefrontal.

Concretament, les vies dopaminèrgiques implicades en esquizofrènia i depressió s'originen en l'ATV. La via mesocortical projecta bàsicament a l'EPFm, escorça cingulada anterior i escorça suprarrenal. Mentre que la via mesolímbica projecta principalment al NAc, amígdala, BNST, tubercle olfatori, sèptum lateral, hipotàlem lateral, tàlem, habènula, hipotàlem i la banda diagonal de Broca.

Els grups noradrenèrgics són set (Figura 14 B), quatre es troben en el bulb raquidi (A1, A2, A3 i A4) i tres en la protuberància (A5, A6, i A7). Les projeccions d'aquests nuclis es divideixen en funció de la seva trajectòria en un feix ventral i un dorsal. La via noradrenèrgica ventral s'origina en els nuclis A1, A2, A5 i A7 i innerva el mesencèfal i de forma massiva l'hipotàlem i el telencèfal. Mentre que

la via noradrenèrgica dorsal s'origina principalment del nucli A6, anomenat *locus coeruleus*, i projecta al tàlem, hipotàlem dorsal, hipocamp i arriba fins a zones distals com l'escorça cerebral (Foote et al., 1983; Seguela et al., 1990).

Per últim, el sistema serotoninèrgic té una distribució molt semblant al noradrenèrgic (Figura 14 C). Els nuclis de les neurones serotoninèrgiques es troben en el tronc de l'encèfal, el mesencèfal i la protuberància i es divideixen en caudals (B1, B2, B3 i B4) i rostrals (B5, B6, B7 i B8) (Pineyro and Blier, 1999; Tork, 1990). Els grups B5 i B8 corresponen al RM, que projecten més al sistema límbic, mentre que el B6 i B7 correspon al RD, que conté aproximadament un 50-60 % dels cossos neuronals serotoninèrgics del sistema nerviós central, i que projecta a escorça i a l'estriat.

Finalment, és important mencionar que els nuclis monoaminèrgics també s'innerven de forma recíproca i, tal com s'ha definit en l'apartat I.4.1, tots estan controlats per l'escorça prefrontal (Figura 15).

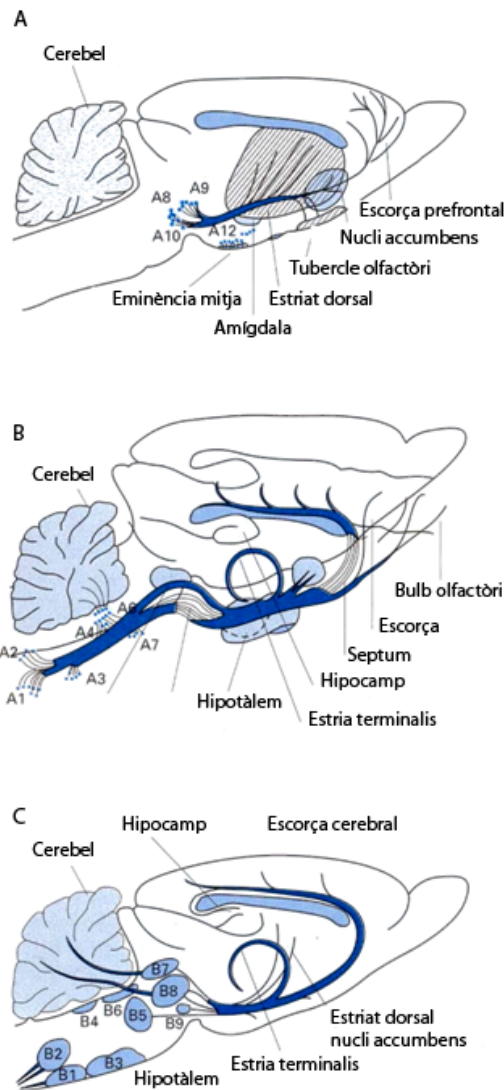


Figura 14. Esquema de les projeccions dels sistemes (A) dopaminèrgic, (B) noradrenèrgic i (C) serotoninèrgic en el cervell de la rata.

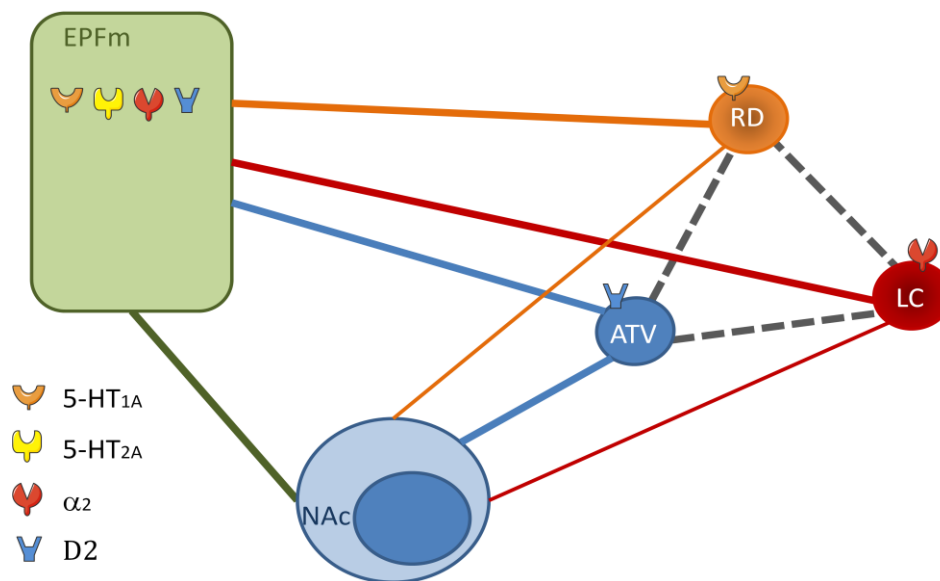


Figura 15. Esquema de interconnexions entre els nuclis monoaminèrgics, l'escorça prefrontal i el nucli acumbens. S'han representat la localització principal dels receptors objecte d'estudi en el present treball.

6.2. Mecanismes de regulació de les neurones monoaminèrgiques

Les neurones monoaminèrgiques (Figura 16) sintetitzen els seus respectius neurotransmissors (Elhwuegi, 2004), que són emmagatzemats pel transportador vesicular de monoamines (Masson et al., 1999), i alliberats per excitació dependent de calci (Llinas, 1977). Un cop alliberat el neurotransmissor a l'espai sinàptic, aquest actuarà sobre els receptors pre- i postsinàptics (Boehm and Kubista, 2002; Starke et al., 1977). La eliminació de les monoamines de l'espai sinàptic es produeix o bé a través de la recaptació pel transportador (Masson et al., 1999; Torres et al., 2003), o bé per inactivació enzimàtica. Per revisió mirar (Elhwuegi, 2004).

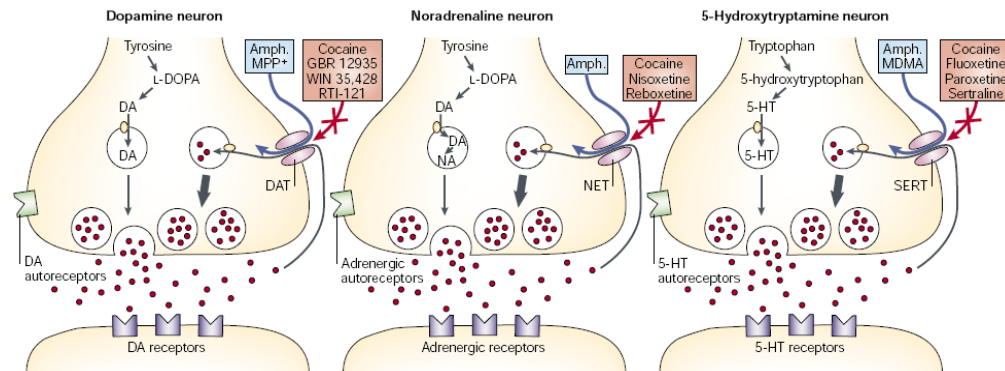


Figura 16. Esquema representatiu de les terminals sinàptiques dopaminèrgiques, noradrenèrgiques i serotoninèrgiques (Torres et al., 2003). Els transportadors de monoamines es localitzen prop de la sinapsi, on són crucials per la finalització de la transmissió monoaminèrgica i el manteniment del magatzem dels respectius neurotransmissors. En la figura es mostren alguns agents farmacològics que actuen sobre els transportadors monoaminèrgics. Amph., amfetamina; L-DOPA, L-3,4-dihidroxifenilalanina; MPP+, 1-metil-4-fenilpiridina; MDMA, (+)-3,4-metilendiòximetamfetamina; NA, noradrenalina.

6.2.1. Síntesi

La DA i la NE comparteixen la ruta de síntesi, on la tirosina és el precursor comú. La tirosina es converteix en la 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA) utilitzant l'enzim *tirosina hidroxilasa* (que és l'enzim limitant), i posteriorment la DOPA es transforma en dopamina gràcies a l'enzim *aromàtic L-aminoàcid descarboxilasa* (AADC). En la neurona noradrenèrgica aquesta DA que es troba en les vesícules serà transformada a NE per la *dopamina- β -hidroxilasa*.

Per altra banda, la serotonina s'origina a partir del triptòfan, on l'enzim limitant triptòfan hidroxilasa el converteix a 5-hidroxi-triptòfan que serà convertit posteriorment per la AADC en 5-hidroxitriptamina (5-HT), o comunament anomenat serotonina.

6.2.2. Transportadors

Els transportadors de monoamines pertanyen a una família de proteïnes transportadores amb 12 dominis transmembrana que requereixen el co-transport de ions Na^+ i Cl^- per a la recaptació de les respectives monoamines de l'espai extracel·lular. El NET i SERT necessiten un ió Na^+ i un Cl^- per al transport d'una molècula de neurotransmissor, mentre que el DAT utilitza dos ions Na^+ i un de Cl^- per molècula (Gu et al., 1994; Torres et al., 2003). S'ha demostrat que el DAT i el NET poden transportar tant dopamina com noradrenalina *in vitro* i *in vivo* amb una constant d'afinitat similar (Carboni et al., 1990; Giros et al., 1994; Moron et al., 2002).

Per altra banda, el SERT i NET són dianes claus en els tractaments antidepressius (veure apartat 1.3.4), mentre que el de dopamina ho és pel trastorn de hiperactivitat i dèficit d'atenció (Iversen, 2006).

6.2.3. Inactivació enzimàtica

Els enzims responsables del metabolisme de les monoamines són la MAO i la COMT (Kopin, 1985; Shih et al., 1994). La MAO es troba en la part externa de la mitocondria i n' existeixen dues isoformes, la MAO-A i la MAO-B. La MAO-A és la responsable de metabolitzar la serotonina i la noradrenalina, mentre que la dopamina es oxidada per igual per les dues isoformes. La COMT s'encarrega de metabolitzar les catecolamines i es troba bàsicament en la neurona postsinàptica i en cèl·lules glials.

És d'especial interès recordar que els inhibidors de la MAO van ser dels primers antidepressius utilitzats (veure apartat 1.3.4.), però es van deixar d'utilitzar degut als efectes secundaris produïts per la inhibició de l'enzim a nivell perifèric, on es troba en major concentració en el fetge i els ronyons. Per altra banda, el gen de la COMT s'ha relacionat amb el risc de desenvolupar esquizofrènia (Taula 1, apartat 1.2.2 i 1.2.3.2) (Harrison and Weinberger, 2005) i polimorfismes de la MAO-A i de la COMT s'han postulat factors de risc de patir depressió (apartat 1.3.2.) (Savitz and Drevets, 2009b).

6.2.4. Receptors

Els receptors de monoamines són receptors de set dominis transmembrana acoblats a proteïna G, a excepció del receptor 5-HT₃ de serotonina, que és l'únic que està acoblat a un canal iònic (Taula 4). En la present Tesis doctoral són d'especial interès els receptors de serotonina 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}, així com els receptors de noradrenalina α_2 .

El receptor HT_{1A} té una localització tant presinàptica com postsinàptica (Hoyer et al., 1994; Hoyer et al., 2002; Pazos and Palacios, 1985). A nivell presinàptic es troba en el soma de neurones serotoninèrgiques dels nuclis del rafe, RM i RD, on actua com a autoreceptor. A nivell postsinàptic es troba principalment en estructures límbiques com hipocamp, sèptum, hipotàlem, amígdala i tàlem, i també a escorça.

En canvi el receptor 5-HT_{2A} té una localització somatodendrítica en neurones no serotoninèrgiques. El receptor es troba àmpliament distribuït a l'escorça, però també s'ha trobat amb menys proporció en el claustre, en el nucli olfactiu i ganglis basals (Hoyer et al., 1994; Hoyer et al., 2002; Pazos et al., 1985).

Finalment el receptor adrenèrgic α_2 es localitza a nivell presinàptic en neurones noradrenèrgiques on actua d'autoreceptor, i també a nivell postsinàptic (Boyajian et al., 1987; Happe et al., 2004; King et al., 1995; Pazos et al., 1988). S'han trobat densitats altes de receptors en l'escorça frontal i entorrinal, en el nucli olfatori anterior, estriat, sèptum, tàlem, hipotàlem, amígdala, hipocamp, nucli parabraquial dorsal, cerebel, locus coeruleus i nuclis del tracte solitari.

Monoamina	Família/Classe de Receptors	Subtipus	Proteïna G	Transductor de senyal
DA	D1	D ₁	Gs	AMPc
		D ₅		
	D2	D ₂	Gi/o	AMPc
		D ₃		
D ₄				
NE	α1	α _{1A}	Gq	PLC
		α _{1B}		
		α _{1D}		
	α2	α _{2A}	Gi/o	AMPc
		α _{2B}		
		α _{2C}		
	β	β ₁	Gs	AMPc
		β ₂		
		β ₃		
5-HT	5-HT1	5-HT _{1A}	Gi/o	AMPc
		5-HT _{1B}		
		5-HT _{1D}		
		5-HT _{1E}		
		5-HT _{1F}		
	5-HT2	5-HT _{2A}	Gq	PLC
		5-HT _{2B}		
		5-HT _{2C}		
	5-HT3	5-HT _{3A}	Canal iònic	
		5-HT _{3B}		
		5-HT _{3C}		
	5-HT4	5-HT ₄	Gs	AMPc
	5-HT5	5-HT _{5A}	?(+)	AMPc
		5-HT _{5B}		
5-HT6	5-HT ₆	Gs	AMPc	
5-HT7	5-HT ₇	Gs	AMPc	

Taula 4. Receptors de dopamina (Emilien et al., 1999; Jaber et al., 1996), noradrenalina (Hein and Kobilka, 1995; Philipp and Hein, 2004; Raymond et al., 1990) i serotonina (Hoyer et al., 1994; Hoyer et al., 2002), i els principals mecanismes de transducció de senyal.

6.3. Paper de la dopamina a l'escorça prefrontal

La dopamina modula una gran varietat de funcions cerebrals superiors que inclouen, entre altres, aprenentatge i memòria, percepció, recompensa, resposta a l'estrès i secreció hormonal. A més, la DA és diana molecular i cel·lular de molts fàrmacs, on destaquen els antipsicòtics, antiparkinsonians (levodopa), tractament del trastorn d'hiperactivitat i dèficit d'atenció. També s'ha vist implicada en el mecanisme d'acció de drogues d'abús, de les quals algunes actuen de forma directa sobre neurones DA (amfetamina, cocaïna) i altres modulant l'activitat del sistema de forma indirecta (opiàcis).

Una de les funcions on la DA cortical té un paper fonamental és la memòria de treball o *WM*, fonament fisiològic en el que resideixen gran part de funcions de l'escorça cerebral, i que es troba alterat en esquizofrènia. És una memòria a curt termini, que a menys que hi hagin efectes reforçants es perd. Seria com la memòria RAM d'un ordinador, que només passa a ser permanent si es grava en el disc dur. En primats s'ha vist que la *WM* depèn de l'augment de la freqüència de descàrrega de les neurones piramidals de l'EPF, que s'activen en presència de l'estímul i es mantenen actives mentre l'individu necessita recordar una determinada orientació per la correcta realització de la tasca. El bloqueig de receptors de dopamina D1 corticals indueixen errors en la realització de tasques on la *WM* és necessària (Sawaguchi and Goldman-Rakic, 1991) i l'administració d'agonistes DA D1 millora el dèficit en *WM* causada per l'administració repetida d'antagonistes (Castner et al., 2000). De fet, la *WM* requereix d'una activació òptima dels receptors D1 de DA, que segueixen una dosi resposta en forma de U invertida (Figura 17), on poca o massa activació dels receptors de DA D1 produeix una disfunció de la funció cognitiva (Vijayraghavan et al., 2007; Williams and Goldman-Rakic, 1995).

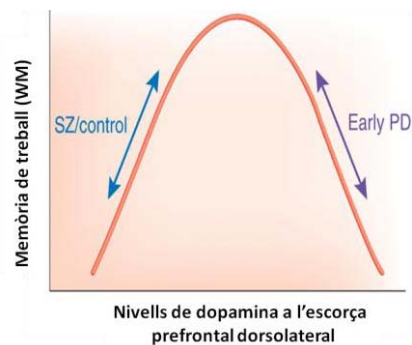


Figura 17. Esquema de la relació en forma de U invertida entre la funció de *WM* i els nivells de DA a l'escorça prefrontal dorsolateral d'humans, modificat de (Leh et al., 2010). SZ, pacients esquizofrènics; PD, pacients de parkinson.

Una de les hipòtesis de l'esquizofrènia descriu una disminució de l'activitat dopaminèrgica cortical (Weinberger, 1987; Weinberger et al., 1994; Weinberger et al., 1988), i de fet, la innervació DA a l'escorça prefrontal s'ha vist disminuïda en pacients esquizofrènics (Akil et al., 1999; Lewis and Lieberman, 2000), així com el nombre de receptors dopaminèrgics D1 (Okubo et al., 1997) que podrien contribuir al dèficit de WM d'aquests pacients. També s'han descrit una hipodopaminèrgia en malalts depressius, que explicaria l'augment dels receptors de dopamina D2 a nivell estriatal i la hipersensibilitat a psicoestimulants (Dunlop and Nemeroff, 2007; Papakostas, 2006; Tremblay et al., 2005).

Per tant, sembla evident que un augment de DA, en particular en l'escorça prefrontal, podria millorar les funcions cognitives d'aquestes malalties psiquiàtriques. Tot i així, basant-nos en la relació en forma de U invertida de la funció de WM en resposta a l'activació del receptor D1 de DA, un augment massa elevat dels nivells de DA podria resultar també en un empitjorament els símptomes negatius i cognitius de l'esquizofrènia i depressió.

Per contra, el problema d'augmentar els nivells de DA de forma general a l'encèfal és l'afectació directa de les altres vies dopaminèrgiques (Figura 18). Concretament, els agonistes dopaminèrgics augmenten l'activitat motora i els moviments estereotipats degut a l'activació de receptors D1 i D2 de DA del circuit motor dels ganglis basals. Així, l'activació d'ambdós receptors (via directa i

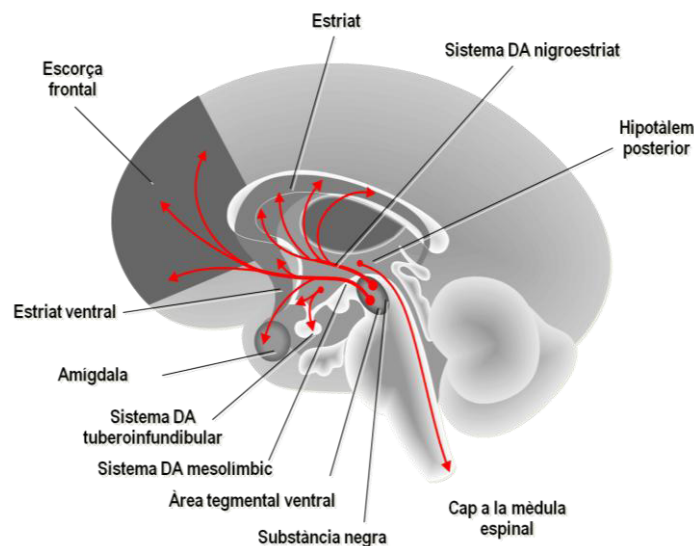


Figura 18. Esquema dels principals sistemes dopaminèrgics en el SNC.

indirecta) es tradueix en un mateix efecte, la desinhibició de la substància negra reticulada, i per tant, un augment de l'activitat de les neurones tàlamocorticals. La via tuberohipofisal (que s'origina als nuclis arcuat i periventricular i innerva el lòbul mig de la hipòfisis i l'eminència mitja) participa en la secreció hormonal, sobretot de prolactina, que es produeix i s'allibera per DA, i és un dels símptomes secundaris produïts pels antipsicòtics clàssics. Finalment, la hiperdopaminèrgia en la via mesolímbica s'atribueix a la simptomatologia psicòtica de l'esquizofrènia, però per contra, la relació de la via mesolímbica amb la motivació i recompensa fa que un augment excessiu de DA en aquesta via pugui desembocar en problemes d'addició i tolerància, i la seva inactivació en falta de plaer.

II. *Objectius*

1. **Hipòtesi i objectiu general**

La hipòtesi de treball de la present Tesi Doctoral planteja que un augment selectiu de l'activitat del sistema dopaminèrgic cortical podria ser beneficiós en el tractament antidepressiu i de la simptomatologia negativa i cognitiva en malalts esquizofrènics.

En aquest marc, l'**objectiu general** de la Tesi ha estat desenvolupar estratègies farmacològiques per a augmentar de forma selectiva la funció dopaminèrgica a l'escorça prefrontal, utilitzant estratègies farmacològiques que actuïn sobre els sistemes serotoninèrgics i noradrenèrgics.

1.1. **Objectius concrets**

1. Estudiar el paper dels receptors 5-HT_{2A} i 5-HT_{1A} en l'augment de dopamina en l'escorça prefrontal medial produït per antipsicòtics atípics.
2. Estudiar la regulació farmacològica diferencial de les vies dopaminèrgiques mesolímbica i mesocortical.
3. Estudiar el paper del sistema noradrenèrgic en la regulació dels nivells de dopamina mesocortical.
4. Proposar noves estratègies farmacològiques en depressió i esquizofrènia basades en l'augment de dopamina cortical.

III. *Materials i Mètodes*

1. **Materials**

1.1. **Animals**

En tots els treballs s'han utilitzat rates albines mascle de la soca Wistar i subministrades per Iffa Credo (Lyon, França), de pes entre 250 i 320 grams. En el primer treball també s'han utilitzat ratolins mascle de la soca C57BL/6, subministrats per Iffa Credo (Lyón, França), i ratolins mascle genoanul·lats (knockout, KO) per als receptors de serotonina 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}, dels quals el nostre grup té colònies estables a l'estabulari de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona. Tots els ratolins KO presenten el mateix fons genètic que els seus respectius controls C57BL/6 i tenen entre 10-15 setmanes d'edat en el moment dels experiments. Els ratolins KO del receptor 5-HT_{1A} es van generar a la Universitat de Princeton (EUA) pel grup del Dr. Miklos Toth (Parks et al., 1998), mentre que el KO del receptor 5-HT_{2A} va ser generat a la Universitat de Columbia (New York, EUA) pel grup de Jay Gingrich (Fiorica-Howells et al., 2002; Weisstaub et al., 2006).

Els animals han estat estabulats en una habitació amb temperatura controlada (22 ± 2 °C), amb cicle de 12 hores de llum/fosc (les llums s'obren a les 7 del matí), i amb l'accés lliure a menjar i aigua. La cura i tractament dels animals es realitza segons la legislació europea de "Protecció dels Animals Utilitzats per a Experiments i Altres Propòsits Científics", d'acord amb les normes de la Unió Europea (O.J. of E.C. L358/1 18/12/1986).

1.2. **Fàrmacs i compostos**

Tots els fàrmacs i compostos utilitzats es detallen en la Taula 5.

Els reactius analítics, incloent compostos necessaris per la preparació del líquid cefaloraquidi artificial (LCRa), fases mòbils per als anàlisis de mostres utilitzant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC), així com el bicarbonat per ajustar el pH de les solucions, s'han obtingut de Merck (Alemanya).

La composició de les fases mòbils per a la detecció de monoamines per HPLC es detalla en l'apartat III.2.1.6. El LCRa utilitzat en els experiments de microdiàlisi té la composició següent en nM: NaCl, 125; KCl, 2.5; CaCl₂, 1.26 and MgCl₂, 1.18 (pH final 6.5); i en el 2n i 3r treball s'ha utilitzat el doble de CaCl₂ (2.52 mM) per facilitar l'alliberació, i per tant detecció posterior, de la dopamina.

Compost/ Fàrmac	Farmacologia	Treball
Clozapina ^{1,2}	Antipsicòtics atípics	1
Olanzapina ³		1
Risperidona ¹		1
EEDQ ¹	Agent alquilant que inactiva els receptors acoblats a proteïnes G	1
DOI ¹	Agonista 5-HT _{2A/2C}	1
[³ H]mesulergina ⁴	Antagonista 5-HT _{2A/2C}	1
Mianserina		1
Ritanserina ¹		1
SB-242084 ¹	Antagonista 5-HT _{2C}	1
Spiperona ¹	Antagonista 5-HT _{2A}	1
[³ H]8-OH-DPAT ⁴	Agonista 5-HT _{1A}	1
BAY x 3792 ⁵		1
WAY-100635 ¹	Antagonista 5-HT _{1A}	1
5-HT oxalat ¹	Indolamina	1,2,3
Dopamina clorhidrat ¹	Catecolamina	1,2,3
Noradrenalina bitartrat ¹	Catecolamina	2,3
Citalopram bromohidrat	Inhibidor selectiu SERT (Antidepressiu)	1,3
Fluoxetina clorhidrat ²		2
Reboxetina mesilat ²	Inhibidor selectiu NET (Antidepressiu)	2,3
Desipramina clorhidrat ¹	Inhibidor selectiu NET	2
GBR12909 clorhidrat ¹	Inhibidor selectiu DAT	2
Nomifensine maleat ¹	Inhibidor DAT/NET	2
Haloperidol ¹	Antipsicòtic clàssic	2
DSP-4 ¹	Toxina NE	2
6-OHDA ¹	Toxina DA/NE	2
RX821002 clorhidrat ¹	Antagonista selectiu α ₂	2
Mirtazapina ²	Antagonista α ₂ (Antidepressiu)	3
Formalina ¹	Fixador	1,2,3
Fast Green ¹	Colorant	1,2,3
Neutral Red ¹	Colorant	1,2,3

Taula 5. Fàrmacs i compostos utilitzats, la seva diana farmacològica, i treball en el que s'ha utilitzat. Els proveïdors dels fàrmacs o compostos són: ¹Sigma/RBI (Espanya), ²Tocris (UK), ³Eli Lilly (EUA), ⁴Amersham (GE Healthcare) (Espanya) i ⁵Bayer, Lundbeck A/S (Denmark).

2. Mètodes

2.1. Microdiàlisi intracerebral *in vivo*

La microdiàlisi intracerebral *in vivo* permet l'obtenció de mostres representatives del líquid cefaloraquídi al voltant de la sonda. Així doncs, l'anàlisi d'aquestes mostres ens pot mostrar canvis en els nivells de neurotransmissors produïts per tractaments específics, com poden ser l'aplicació de compostos o fàrmacs, estimulació elèctrica, lesions i fins i tot comportaments.

Els experiments de microdiàlisi intracerebral requereixen de la construcció de la sonda de microdiàlisi, la posterior implantació estereotàxica d'aquesta sonda en la rata o ratolí, l'experiment propi de microdiàlisi en l'animal on es recullen les mostres de dialitzat cerebral, l'anàlisi del contingut d'aquestes mostres, i la posterior comprovació histològica de la correcta implantació de la sonda.

2.1.1. Construcció de sondes de microdiàlisi

En el present treball s'han utilitzat sondes de microdiàlisi concèntriques en forma de Y (Adell and Artigas, 1998) (Figura 19). El cos de les sondes de microdiàlisi està format per dos tubs d'acer inoxidable curts de 27 G (0.41 mm

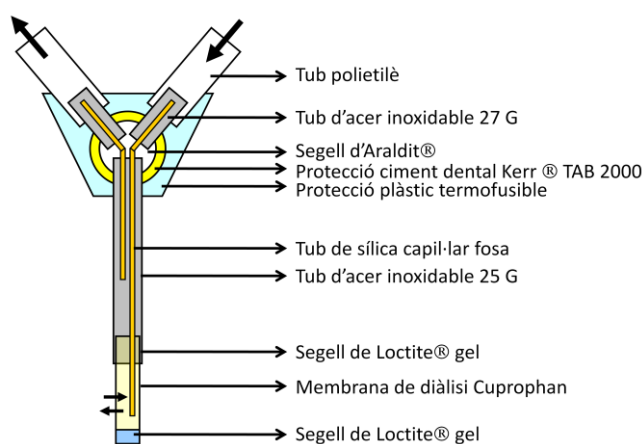


Figura 19. Esquema d'una sonda de microdiàlisi.

diàmetre extern (DE), 0.20 mm diàmetre intern (DI), 7 mm de longitud) i un de més llarg de 25 G (0.51 mm DE, 0.30 mm DI, 20 mm de longitud en rata i 15 mm en ratolí) (A-M Systems, Carlsborg, WA, EUA). En el seu interior s'hi fa passar dos tubs de sílica capil·lar fosa (0.11 mm DE, 0.04 mm

DI) (Composite Metal Service LTd, The Chase, Hallow, Regne Unit). La unió dels tres tubs d'acer es segella amb Araldit[®] (Ciba-Geigy) i es protegeix amb ciment dental Kerr[®] TAB 2000. Els tubs d'acer inoxidable de 27 G es connecten a tubs de polietilè (0.61 mm DE, 0.28 mm DI) (Smiths Medical International Ltd., Kent, Renge Unit) per facilitar la connexió de la sonda amb la bomba de perfusió, i es recobreix aquesta unió amb un plàstic termofusible. A l'altre extrem, el tub d'acer de 25 G es connecta amb la membrana de diàlisi Cuprophan (Gambro, Lund, Suècia), l'extrem de la qual juntament amb la zona d'unió al tub d'acer es segellen amb Loctite[®] gel. La membrana consisteix en una fibra buida de cel·lulosa regenerada (0.25 mm DE, 0.22 mm DI) amb una mida de porus que permet el pas de molècules d'un pes molecular inferior a 5000 daltons.

Així doncs, el líquid de perfusió entra per un dels tubs de polietilè i passa pel tub llarg de sílica capil·lar fosa que arriba fins a la zona d'intercanvi, on hi ha la membrana de diàlisi. El dialitzat que s'intercanvia per la membrana entra pel tub de sílica capil·lar fosa més curta i surt per l'altre tub de polietilè que porta fins a un vial, on es recollirà la mostra per al seu posterior processament.

2.1.2. Implantació de les sondes de diàlisi

La implantació intracerebral de sondes de microdiàlisi s'ha dut a terme mitjançant tècniques d'estereotàxia (Figura 20), seguint un protocol que es resumeix a continuació:

1. La rata o ratolí s'anestesia amb pentobarbital sòdic (60 i 40 mg/kg respectivament).
2. L'animal es col·loca en un estereotàxic (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA), i sobre una manta elèctrica que li manté la temperatura a 37 °C.
3. Amb un bisturí es fa una incisió longitudinal deixant el crani al descobert.
4. Es pren la mesura de bregma i es

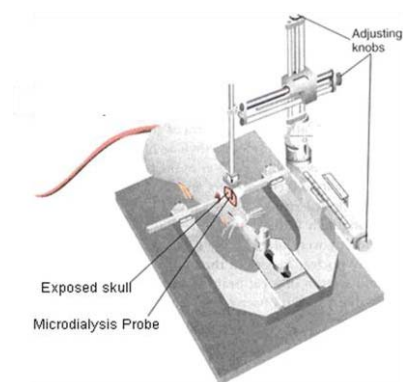


Figura 20. Esquema d'una rata col·locada en un estereotàxic.

calculen les coordenades de l'àrea (o àrees) d'interès (Taula 6).

5. El crani de l'animal es perfora amb una broca, sense trencar la duramàter, a la coordenada anteroposterior (AP) i lateral (L) d'interès on es col·locarà la sonda.
6. Utilitzant la mateixa broca es perforen 3 forats més en el crani de la rata -o 2 en el cas del ratolí-, intentant rodejar el lloc d'implantació de la sonda i a ser possible en ossos del crani diferents, on es col·loquen uns cargols (Microbiotech/se AB, Estocolm, Suècia).
7. S'introdueix la sonda de diàlisi al teixit cerebral, previ trencament de la duramàter amb una agulla fins a la coordenada dorsoventral (DV) d'interès.
8. S'afegeix una base de ciment dental Kerr[®] TAB 2000, que s'utilitza per fixar la sonda als cargols prèviament fixats al crani, donant rigidesa i protecció a l'estructura.
9. Un cop acabada l'operació, els animals es mantenen de forma individual amb accés lliure a aigua i menjar.

Per la implantació de cànules d'infusió es procedeix de forma semblant fins al pas 5. Llavors s'introdueix la cànula fins a la coordenada DV calculada i es realitza la infusió local del compost o fàrmac mitjançant una bomba d'infusió a un flux d'1 µl/min. Finalment es deixa reposar uns minuts i es treu lentament la cànula i es sutura la pell de sobre el crani.

En el cas de l'implantació d'elèctrodes, el procediment és similar al d'implantació de sondes. L'única diferència consisteix en afegir una primera capa de pegament (Super Glue-3 gel) i un tub de polietilè (1.67 mm DI) (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD) al voltant de l'elèctrode abans d'afegir el ciment dental (pas 8), per fixar i protegir l'elèctrode.

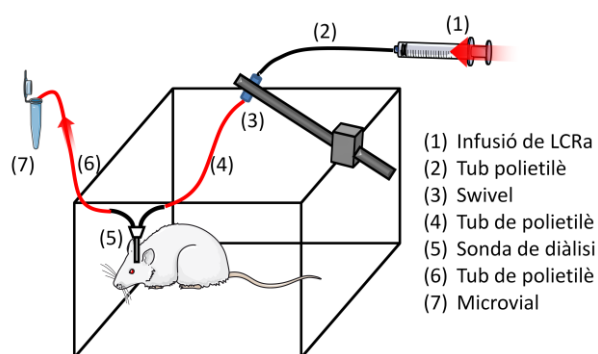
Les coordenades estereotàxiques on es col·loquen les sondes de diàlisi, cànules i elèctrodes es calculen a partir d'atles d'anatomia del cervell de rata (Paxinos and Watson, 1998) i ratolí (Franklin and Paxinos, 1997), respectivament. Les utilitzades en la present Tesi es resumeixen a la Taula 6.

Regió	Membrana (mm)	Experiment	AP	L	DV	Treball
EPFm ^{*a}	2.0	Simple sonda	+2.2	-0.2	-3.4	1
EPFm	4.0	Simple sonda	+3.2	-0.8	-6.0	1,2,3
NAc	1.5	Simple sonda	+1.6	-1.1	-8.0	2,3
EPFm	4.0	Doble sonda	+3.2	-0.8	-6.0	2
NAc	1.5		+1.6	-3.9 (20°)	-7.5	
LC ^{ab}	Elèctrode d'estimulació		-2.0 (15°)	-1.2	-7.2	2
ATV	Cànula d'infusió		-5.2	-2.2 (10°)	-7.8	2
ATV	Cànula d'infusió		-5.8	-1.9 (10°)	-7.7	
EPFm	4.0	Doble sonda	+3.2	-1.5(10°)	-5.7	2
EPFm	4.0		+3.2	+1.5(10°)	-5.7	
NAc	1.5	Doble sonda	+1.6	-3.9 (20°)	-7.5	2
NAc	1.5		+1.6	+3.9 (20°)	-7.5	
EPFm	4.0	Doble sonda	+3.2	-0.8	-6.0	3
NAc	1.5		+1.6	-1.1	-8.0	

Taula 6. Resum de les coordenades estereotàxiques en mm de diferents àrees cerebrals d'interès en rata i *ratolí . S'inclou la llargada de la membrana de diàlisi, el tipus d'experiment en el que s'ha implantat (simple o doble sonda) i el treball en que s'han utilitzat. Totes les coordenades són des de bregma i duramàter excepte les ^ades d'ós i ^brespecte lambda.

2.1.3. Obtenció de mostres de dialitzat cerebral

Els experiments de microdiàlisi es realitzen 24 h després de la implantació de la sonda, temps necessari per a la recuperació de l'animal i estabilització dels nivells de neurotransmissors. Tal com es mostra en la Figura 21, la sonda de



diàlisi de l'animal (5) es connecta a una bomba de perfusió que conté una xeringa amb LCRa (1). Aquest LCRa es desplaçarà per un tub de polietilè (2) (0.61 mm DE i 0.28 mm DI) (Smiths Medical International Ltd., Kent, Regne Unit) fins arribar a un sistema de connexió

Figura 21. Esquema d'un experiment de microdiàlisi intracerebral *in vivo*.

giratòria, el *swivel* (3) (Instech Laboratories, Plymouth Meeting PA, EUA), que permet que l'animal es mogui lliurement sense que el sistema es desconnecti. Al *swivel* s'hi connecta un altre tub de polietilè (4) (0.15 mm de DI) (Microbiotech/se AB, Estocolm, Suècia) que es fixa al tub d'entrada de la sonda (5). El tub de sortida de la sonda es connecta a un tub de polietilè idèntic a l'anterior (6) que desemboca a un microvial de 250 µL (7) (Molecular BioProducts, San Diego, EUA). En el cas de voler mesurar DA i NE s'afegeix 5 µl d'HClO₄ 10 mM en el microvial, per evitar la seva degradació. Totes les connexions entre els tubs, *swivel* i sonda es fan amb tubs adaptadors (Microbiotech/se AB, Estocolm, Suècia).

Un cop tot el sistema està connectat a un flux de 1.5 µl/min -o 3 µl/min segons les condicions de l'experiment-, es deixa 30 min d'estabilització, a partir dels quals es comencen a recollir les mostres cada 20 -o 10- min, respectivament, recollint un volum final de 30 µl de mostra. Normalment es recullen 6 fraccions, de les quals 4 s'utilitzen per a calcular els valors basals. A partir de llavors s'inicia la fase de tractament, en la qual s'administra el fàrmac de forma sistèmica (i.p. o s.c.) o bé de forma local (diàlisi reversa), diluït en el LCRa que es perfon.

2.1.4. Obtenció de mostres de teixit cerebral

En els experiments que involucren lesions (descrites en els apartats III.2.2.3 i III.2.2.4), els animals es van sacrificar al final dels experiments de microdiàlisi i el teixit cerebral es va processar per mesurar neuroquímicament l'abast de la lesió. Per a tal fi, s'extreu el cervell de la rata i es col·loca dins d'una matriu metàl·lica de cervell de rata en gel. Ràpidament es fan talls coronals d'1 mm amb un bisturí i s'extreuen l'EPF (en les lesions amb DSP-4) i el NAc mitjançant un *punch* (en les lesions amb 6-OHDA). Les mostres de teixit es pesen i congelen en tubs Eppendorf de 1.5 ml a -80°C.

Les mostres de teixit s'han de processar abans d'analitzar el seu contingut de neurotransmissors per HPLC (apartat III.2.1.6.). S'utilitza un tampó d'homogeneïtzació amb composició: 5.0 mM metabisulfit de sodi, 8.3 mM cisteïna, i 0.3 mM EDTA en una solució 0.4 mM d'àcid perclòric. Llavors s'afegeix al tub Eppendorf que conté el teixit aproximadament uns 100 µl de tampó d'homogeneïtzació per cada 10 mg de teixit, es disgrega el teixit utilitzant un

sonicador, i es centrifuga a 12000g durant 20 min a 4°C. El sobrenedant resultant es recull i es filtra (0.45 µm diàmetre de porus) (Millipore, Madrid, Espanya) per a la posterior detecció de neurotransmissors amb HPLC.

2.1.5. Comprovació de la localització de les sondes de microdiàlisi

Al final de l'experiment de microdiàlisi s'anestesia l'animal amb pentobarbital sòdic (60 i 40 mg/kg i.p. per rata i ratolí, respectivament). Tot seguit es fa passar una solució de *Fast Green* (compost que s'uneix a proteïnes i que té coloració verdosa) a través de la sonda de microdiàlisi, per tal de tenyir l'àrea cerebral on es troba la membrana de diàlisi. Després d'uns minuts es procedeix a la perfusió intracardiaca de l'animal amb una solució salina al 0.9 % seguida d'una solució de formalina al 10 % i, immediatament s'extreu el cervell i es congela a -80°C. Posteriorment es fan seccions de 40 µM amb un criòstat (HM500-Om Microm, Alemanya) i es tenyeixen amb un protocol estàndard amb *Neutral Red*. La verificació de la col·locació de la sonda es fa amb un microscopi òptic.

Aquest procediment no es aplicable en animals els quals es vol extreure i analitzar el teixit cerebral, ja que la perfusió impedeix el posterior anàlisi dels neurotransmissors per HPLC. En aquests casos es va realitzar una inspecció visual de la localització de la sonda.

2.1.6. Anàlisi de mostres per HPLC

Les concentracions de monoamines i els seus respectius metabòlits s'han analitzat mitjançant HPLC. En les mostres de diàlisi s'ha mesurat principalment dopamina, però també serotonina i noradrenalina. En canvi en les mostres de teixit s'han analitzat les tres amines conjuntament. Les condicions de detecció es detallen en la Taula 7 i la quantificació dels compostos es va dur a terme a través d'un mètode estàndard (Nelson Turbochrom Navigator, Perkin-Elmer, San Jose, CA, EUA).

Les fases mòbils utilitzades per mesurar les amines en mostres de dialitzat contenen en un volum final de 1 litre d'aigua MilliQ:

DA: 0.15 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 M EDTA, 0.9 M d'àcid 1-octanosulfonic (PIC B8), pH ajustat amb H_3PO_4 fins a 2.8 i s'afegeixen 100 mL de MeOH.

5-HT: 0.15 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.2 M EDTA, 1.7 M PIC B8, pH ajustat amb H_3PO_4 fins a 2.8 i s'afegeixen 250 mL de MeOH.

NE: 0.15 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 M EDTA, 2 M d'àcid 1-octanosulfonic (PIC B8), pH ajustat amb H_3PO_4 fins a 2.65 i s'afegeixen 80 mL de MeOH.

Mentre que per mesurar conjuntament les monoamines presents en teixit conté en un volum final de 1 litre d'aigua MilliQ:

NE, DA, 5-HT: 0.1 M KH_2PO_4 , 0.1 M EDTA, 2 M PIC B8, pH ajustat amb H_3PO_4 fins a 2.65 i s'afegeixen 100 mL de MeOH.

Monoamines	Columna	Potencial	Flux i presi3 de la bomba	Temps de retenci3
DA (diàlisi)	Ultrasphere 3 μm ODS (75x4.6 mm)	+0.7 V	0.8 ml/min 1100-1300 psi	3.5-4 min DA 3-3.5 min DOPAC
5-HT (diàlisi)		+0.6 V		1-3 min DOPAC 3-4 min 5-HIA 4-5 min 5-HT
NE (diàlisi)		+0.7 V		2.5-3.5 min NE 4.5-5.5 min DOPAC
NE, DA, 5-HT (teixit)	Mediterranea Sea 18 3 μm (100x4.6 mm)	+0.7 V	0.8 ml/min 1300-1400 psi	3-4 min NE 6-7 min DOPAC 8.5-9.5 min DA 10.5-11.5 min HIAA 15-16 min HVA 22-23 min 5-HT

Taula 7. Resum de les condicions d'anàlisi de les mostres de monoamines en dialitzat i en teixit. En tots els casos s'ha utilitzat un detector electroquímec Decade II de Antech o bé Waters 2465.

2.2. **Inactivació química de receptors, estimulació elèctrica i lesions**

La tècnica de microdiàlisi intracerebral *in vivo* es va combinar en determinades ocasions amb altres procediments, que inclouen: a) inactivació química dels receptors acoblats a proteïna G (GPCRs), b) lesions de nuclis cerebrals concrets, c) lesions generals sistèmiques de les neurones noradrenèrgiques i d) estimulació elèctrica de nuclis concrets. Tots aquests procediments es detallen a continuació.

2.2.1. ***Inactivació dels receptors acoblats a proteïna G***

El compost N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ) és un agent alquilant que s'uneix irreversiblement als GPCRs i els deixa funcionalment inactius (Amargos-Bosch et al., 2004; Gozlan et al., 1994). Simultàniament es pot protegir selectivament un receptor específic mitjançant l'administració per diàlisi reversa d'un antagonista d'aquest receptor en qüestió. D'aquesta manera s'aconsegueix que només quedin actius els GPCRs que tenen el lloc d'unió ocupat per l'antagonista. En el nostre cas s'ha utilitzat WAY-100635 per protegir el receptor 5-HT_{1A} i ritanserina pel receptor 5-HT_{2A/2C}, respectivament.

Així doncs, 3 o 4 hores després de la implantació d'una sonda de microdiàlisi (apartat III.2.1.2) es perfora a través de la sonda de diàlisi l'antagonista del receptor que volem estudiar a una concentració de 300 µM durant 3 h. Una hora després de l'inici de la perfusió s'administra l'agent EEDQ (dissolt en etanol/aigua 1:1) de forma i.p. a una dosi de 6 mg/kg. L'endemà es realitzen els experiments de microdiàlisi intracerebral *in vivo* (apartat III.2.1.3) o bé d'autoradiografia de receptors (apartat III.2.3), segons correspongui.

2.2.2. ***Estimulació elèctrica***

En els experiments d'estimulació elèctrica es van utilitzar elèctrodes d'estimulació bipolar, que consisteixen en dos cables d'acer recoberts amb un

aïllant (California Fine Wire Company, Grover Beach, CA, EUA). Per l'extrem corresponent a l'àrea d'estimulació es va treure l'aïllant amb un bisturí i es van separar les puntes uns 150 µm, mentre que per l'altre es van cremar aproximadament 1 cm permetent així la separació de les puntes. L'elèctrode es va implantar simultàniament amb les sondes de microdiàlisi tal com es descriu en l'apartat III.2.1.2.

Els experiments de microdiàlisi es van dur a terme en rata anestesiada (apartat III.2.1.3). Es va utilitzar hidrat de cloral com a anestèsic amb una dosi inicial de 400 mg/kg i.p. i addicionalment una dosi continua de 50-70 mg/kg.h i.p, i la temperatura de l'animal es va mantenir a 37°C amb una manta elèctrica. L'estimulació elèctrica es va realitzar mitjançant la connexió dels pols exteriors de l'elèctrode d'estimulació implantat a una unitat d'aïllament de l'estímul Grass SIU 5 connectada a un estimulador elèctric Grass S-48 (Grass Medical Instruments).

2.2.3. Lesió del sistema noradrenèrgic

Les lesions del sistema noradrenèrgic es realitzen mitjançant una administració sistèmica i.p. de clorhidrat de N-(2-cloretil)-N-etil-2-bromobenzilamina (DSP-4) a 40 mg/kg. El DSP-4 és una toxina que entra a través dels transportadors de monoamines en els terminals noradrenèrgics, però també serotoninèrgics i dopaminèrgics, i en destrueix les terminals. Per aquesta raó una hora abans de l'administració de DSP-4 es protegeixen les terminals de serotonina i dopamina amb inhibidors selectius de la recaptació (Fluoxetina 10 mg/kg i.p. i GBR 12909 s.c, respectivament) per tal d'evitar la seva lesió (Dailly et al., 2006; Fritschy and Grzanna, 1989; Szot et al., 2010).

Els experiments de microdiàlisi (apartat III.2.1.3) es realitzen 5 dies després de l'administració del DSP-4. Es controla el pes i estat dels animals durant els 5 dies de lesió. En finalitzar els experiments de diàlisi s'extreuen mostres de l'escorça prefrontal tal com es detalla en l'apartat III.2.1.4. i s'analitzen mitjançant HPLC per comprovar l'eficàcia de la lesió (apartat III.2.1.6.).

2.2.4. Lesió unilateral de l'àrea tegmental ventral

Es va utilitzar la toxina 6-OHDA (clorhidrat de 6-hidroxidopamina) per lesionar de forma unilateral el sistema dopaminèrgic de l'ATV en la rata. De forma anàloga a la lesió utilitzant DSP-4, una hora abans de l'administració de la toxina 6-OHDA es van protegir els terminals serotoninèrgics i noradrenèrgics amb l'administració d'inhibidors selectius de la recaptació (Fluoxetina 10 mg/kg i.p. i desipramina 25 mg/kg s.c., respectivament). Aquesta és una lesió local, per aquesta raó es van implantar cànules d'infusió (tub d'acer de 27 G; 0.41 mm DE, 0.20 mm DI, 25 mm de longitud) (A-M Systems, Carlsborg, WA, EUA) a dos coordenades de l'ATV (per detall veure Taula 6 i apartat III.2.1.2), per on es va infondre un total de 8 µg/µl d'una solució de 6-OHDA en LCRa que conté 0.1 % d'àcid ascòrbic (4 µg/0.5 µl en cada coordenada). La infusió es realitza a un flux de 1 µl/min mitjançant una bomba d'infusió, es deixa reposar 3 minuts, i posteriorment es treu lentament la cànula i es sutura la pell de sobre el crani.

Els experiments de microdiàlisi (apartat III.2.1.3) es van dur a terme 8 dies després de l'administració de la 6-OHDA. En finalitzar els experiments de microdiàlisi, s'extreuen mostres del NAc (apartat III.2.1.4.) que s'analitzen mitjançant HPLC per comprovar l'eficàcia de la lesió (apartat III.2.1.6.).

2.3. Autoradiografia de receptors

La tècnica d'autoradiografia de receptors es va utilitzar per determinar el grau o l'abast de la protecció dels receptors 5-HT_{1A} o bé 5-HT_{2A/2C} en les rates tractades amb EEDQ. Així mateix, es va utilitzar aquesta tècnica per a comprovar l'absència dels receptors 5-HT_{1A} o 5-HT_{2A} en els ratolins KO pels receptors 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}, respectivament.

Els animals van ser sacrificats amb una sobredosi de pentobarbital i els seus cervells van ser ràpidament extrets, congelats i mantinguts a -20 °C. Posteriorment es van fer seccions dels cervells de 14 µm utilitzant un criòstat (HM500-Om Microm, Alemanya), i es van muntar sobre portaobjectes tractats amb 3-aminopropiltriètoxissilà (APTS; Sigma/RBI, Espanya), que es van mantenir a -20 °C fins la seva utilització.

Per a marcar el receptor 5-HT_{1A} es va utilitzar la [³H]8-OHDPAT (227.0 Ci/mmol) com a lligand radioactiu i 5-HT a una concentració de 10⁻⁵ M per al marcatge no específic (Mengod et al., 1996; Pazos and Palacios, 1985). El receptor 5-HT_{2A} es va marcar utilitzant la [³H]mesulergina (83.0 Ci/ mmol) com a lligand radioactiu en la presència de 10⁷ M d'un antagonista específic del receptor 5-HT_{2C} (SB242084), i la mianserina a una concentració de 10⁻⁵ M per al marcatge no específic. Mentre que el receptor 5-HT_{2C} es va marcar utilitzant també la [³H]mesulergina (83.0 Ci/ mmol) com a lligand radioactiu però aquest cop en presència de 10⁷ M d'un antagonista específic del receptor 5-HT_{2A} (spiperona), i altra vegada la mianserina a una concentració de 10⁻⁵ M per al marcatge no específic (Lopez-Gimenez et al., 2002; Pazos et al., 1985).

Les seccions es van exposar a una pel·lícula fotogràfica Biomax MR film (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA) juntament amb patrons de ³H durant 60 dies a 4 °C. La quantificació dels autoradiogrames i les fotos amb pseudo-color es van obtenir amb el sistema d'anàlisi d'imatge AIS® (Imaging research Inc, St Catherine's, Ontario, Canadà). Tots els grups experimentals es van processar per duplicat i es van exposar als films conjuntament.

2.4. **Hibridació *In Situ***

En el present treball s'han realitzat experiments de hibridació *in situ* simple.

De forma similar a la tècnica de autoradiografia, les rates van ser sacrificades per una sobredosi de pentobarbital i els seus cervells van ser ràpidament extrets, congelats i mantinguts a -20 ° C. Posteriorment es van fer seccions de 14 µm dels cervells utilitzant un criòstat (HM500-Om Microm, Alemanya), i es van montar sobre portaobjectes tractats amb APTS (Sigma/RBI, Espanya) que es van mantenir a -20°C fins la seva utilització.

S'ha utilitzat una única sonda marcada radioactivament per al gen d'expressió ràpida *c-fos*, seguint un protocol estàndard en el laboratori (Amargos-Bosch et al., 2004; Kargieman et al., 2007). L'oligonucleòtid d'ADN utilitzat com a sonda d'hibridació del *c-fos* és complementària a les bases 131-178 (GenBank, número d'accés #NM 022197). Aquesta sonda va ser sintetitzada amb una sintetitzador model 380 de Applied Biosystem DNA.

Les seccions híbrides es van exposar a una pel·lícula fotogràfica Biomax MR film (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, EUA) durant 7 dies amb pantalles d'intensificació. Es van mesurar les densitats òptiques relatives (DOR) i també es van obtenir fotos amb pseudo-color amb el sistema d'anàlisi d'imatge AIS® (Imaging research Inc, St Catherines, Ontario, Canadà). Els valors de les densitats òptiques es van calcular a partir de la mitja de 2-4 seccions de 4 rates per grup experimental.

2.5. **Activitat locomotora**

L'activitat locomotora s'ha mesurat seguint un protocol estàndard (Scorza et al., 2010) i utilitzant un camp obert (*open field*, en anglès) de 35 x 35 x 40 cm, amb les parets negres i il·luminades indirectament (50-60 lux). El fons del camp obert està recobert amb una base de plàstic opac que es neteja i canvia abans d'introduir-hi cada animal.

Els animals es traslladen a la sala d'experimentació dins de les seves caixes d'estabulació una hora abans del test. En el present treball es van administrar els fàrmacs 5 minuts abans de posar l'animal en el camp obert, on es deixa un hora. El comportament de l'animal es grava i mesura automàticament mitjançant una càmera connectada a un ordinador amb un software de vídeo-seguiment (Videotrack, View Point, Lyon, França). Els paràmetres que es mesuren són:

1. Distància horitzontal (distància moguda total en cm)
2. Nombre de vegades que s'alça sobre les potes del darrere (*rearings*, en anglès)
3. Nombre de vegades que es renta (*groomings*, en anglès)

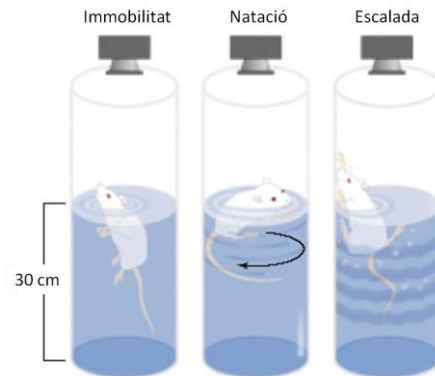
2.6. **Test de natació forçada**

El test de natació forçada (FST; *forced swimming test*, en anglès) s'utilitza per mesurar el potencial antidepressiu d'un fàrmac (Porsolt et al., 1978). En el present treball s'ha fet servir el FST de rata modificat (Cryan et al., 2002a; Cryan et al., 2005) (Figura 22).

Concretament, el FST modificat requereix de dos dies de tractament. El primer dia consta de 15 min d'habitació, on la rata s'introdueix en un cilindre de 20 cm de diàmetre x 46 cm d'altura, ple d'aigua a 25 ± 2 °C i fins a una altura de 30 cm, que no permet a l'animal recolzar-se amb la cua en el fons del cilindre. El test es realitza 24 hores després, on l'animal es posa altra vegada en el mateix cilindre ple d'aigua durant 5 min mentre es registra el seu comportament amb vídeo des de sobre.

Els vídeos s'analitzen a posteriori i es mesura el comportament majoritari de la rata en intervals de 5 segons (Detke et al., 1995). Així doncs, en un total de 5 min que dura el test, hi ha un nombre total de 60 comptatges repartits en els tres comportaments que es descriuen a continuació:

1. Escalada: moviments de les potes de davant de l'animal dirigides a pujar les parets del cilindre.
2. Natació: moviment (normalment horitzontal) que normalment inclou creuar diferents quadrants del cilindre.
3. Immobilitat: l'animal no fa cap altre moviment que el necessari per mantenir el cap fora de l'aigua.



Així, una disminució del temps d'immobilitat respecte un animal control indica que el tractament té gran potencial antidepressiu, ja que implica que l'animal lluita més enfront d'una situació d'estrès com la que representa estar en un cilindre ple d'aigua. També s'han mesurat el temps que ha passat fins el primer comptatge d'immobilitat (Castagne et al., 2009), i s'han representat els patrons de comportament temporal dels animals (Chandramohan et al., 2008).

Figura 22. Esquema dels comportaments mesurats en el test de natació forçada (Cryan et al., 2002a).

Els animals han estat manipulats per l'experimentador durant una setmana abans del test, i els tractaments farmacològics s'administren 23.5, 5 i 1 hora abans del test.

2.7. Dades i anàlisi estadístic

Tos els resultats s'expressen com a mitja \pm error estàndard de la mitja. El nivell de significació s'ha limitat a $p < 0.05$.

Els resultats de microdiàlisi s'han expressat en fmols/30 μ l de fracció i principalment s'han representat com a percentatge dels valors basals (mitjana de 4 fraccions). També s'ha representat l'àrea sota la corba de períodes de temps determinats. El contingut de neurotransmissors en teixit s'ha expressat en pmol/g teixit.

Les mesures quantitatives autoradiogràfiques dels diferents radiolligands es van representar en fmol/mg de proteïna, mentre que l'expressió de ARNm mitjançant hibridació *in situ* es va mesurar en unitats de DOR i s'han representat com a percentatge dels valors controls.

En les mesures comportamentals s'han analitzat diferents paràmetres. En l'activitat locomotora s'ha mesurat la distància recorreguda en cm, nombre de *rearings* i nombre de *groomings*, i en el test de natació forçada s'ha mesurat els nombre de comptatges d'immobilitat, natació i escalades, així com la latència a la immobilitat.

Finalment, l'anàlisi estadístic de totes aquestes mesures s'ha realitzat utilitzant ANOVA d'una o dues vies seguides per el test *post-hoc* Newman-Keuls, o s'han comparat utilitzant la *t* d'Student, segons correspongui.

IV. *Resultats*

1. **Treball 1 :**

Dopamine release induced by atypical antipsychotics in prefrontal cortex requires 5-HT_{1A} receptors but not 5-HT_{2A} receptors.

A. Bortolozzi, M. Masana, L. Díaz-Mataix, R. Cortés, M. C. Scorza, J. A. Gingrich, M. Toth, Francesc Artigas.

International Journal of Neuropsychopharmacology 13(10):1299-314 (2010)

Els fàrmacs antipsicòtics atípics (FAA) augmenten l'alliberació de dopamina (DA) a l'escorça prefrontal (EPF) probablement per l'activació directa o indirecta del receptor 5-HT_{1A} (R 5-HT_{1A}) (Díaz-Mataix et al., 2005; Rollema et al., 1997). No obstant això, la majoria dels FAA presenten una baixa afinitat *in vitro* pel R HT_{1A}. D'altra banda, els FAA mostren alta afinitat i ocupació *in vitro* i *in vivo* pel receptor 5HT_{2A} (R 5HT_{2A}). Ambdós receptors coexpressen en gran proporció a l'EPF i presenten un rol oposat en la modulació de l'activitat de les neurones piramidals (Amargos-Bosch et al., 2004). Com a conseqüència, l'acció dels FAA sobre els R 5-HT_{1A} podria ser causada pel bloqueig dels R 5-HT_{2A} en aquelles cèl·lules que els co-expressen, augmentant així la neurotransmissió mediada pels R 5-HT_{1A}. Aquí hem provat aquesta hipòtesi examinant la relació entre l'augment de DA a l'EPFm produït pels FAA i cada receptor, utilitzant dues estratègies: a) ratolins que no tenen el R 5-HT_{1A} o bé el R 5-HT_{2A} (knockout - KO) i b) un model de rates a les quals s'ha inactivat químicament els receptors acoblats a proteïna G (GPCR) amb la protecció selectiva dels R-5HT_{1A} o R-5HT_{2A/2C} a la EPFm.

L'administració local de FAA (clozapina, olanzapina, risperidona) per diàlisi reversa produeix un augment de DA depenent de dosi a EPFm de forma similar en els ratolins silvestres control i en el KO del R 5-HT_{2A}, mentre que l'augment de DA és absent en el KO del R 5-HT_{1A}. Es va voler estudiar la contribució relativa d'ambdós receptors a aquest augment de DA produït per clozapina a EPFm de rata. Per a tal fi es van silenciar *in vivo* els GPCR amb N-etoxicarbonil-2-etoxi-1,2-dihidroquinolina (EEDQ), i es va protegir selectivament el R 5-HT_{1A} o el R 5-HT_{2A/2C} d'EPF amb els seus respectius antagonistes, WAY-100635 o ritanserina. La inactivació dels GPCRs, amb una protecció del 70 % dels R 5-HT_{2A/2C}, va evitar l'augment de DA a EPFm produït per clozapina. Per contra, la clozapina va

augmentar la DA a EPFm en rates tractades amb EEDQ que tenien els R 5-HT_{1A} protegits (50 % protecció vs rates control).

Aquests resultats indiquen que (1) els R 5-HT_{1A} són necessaris per l'augment de la transmissió DA cortical induïda pels FAA, i (2) aquest efecte no requereix el bloqueig de R 5-HT_{2A}. Aquestes observacions no s'oposen al fet que el bloqueig del R 5HT_{2A} participi en l'acció terapèutica dels FAA. Les nostres conclusions es restringeixen al rol dels receptors serotoninèrgics requerits per augmentar la DA mesocortical, un efecte de l'acció dels FAA potencialment important sobre els dèficits cognitius i símptomes negatius en pacients amb esquizofrènia.

Dopamine release induced by atypical antipsychotics in prefrontal cortex requires 5-HT_{1A} receptors but not 5-HT_{2A} receptors

Analia Bortolozzi^{1,2}, Mercè Masana^{1,2}, Llorenç Díaz-Mataix¹, Roser Cortés^{1,3},
María Cecilia Scorza¹, Jay A. Gingrich⁴, Miklos Toth⁵ and Francesc Artigas^{1,2}

¹ Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, IIBB – CSIC (IDIBAPS), Barcelona, Spain

² CIBERSAM, Barcelona, Spain

³ CIBERNED, Barcelona, Spain

⁴ Department of Psychiatry, Columbia University, NY, USA

⁵ Department of Pharmacology, Weill Medical College, Cornell University, NY, USA

Abstract

Atypical antipsychotic drugs (APDs) increase dopamine (DA) release in prefrontal cortex (PFC), an effect probably mediated by the direct or indirect activation of the 5-HT_{1A} receptor (5-HT_{1A}R). Given the very low *in-vitro* affinity of most APDs for 5-HT_{1A}Rs and the large co-expression of 5-HT_{1A}Rs and 5-HT_{2A} receptors (5-HT_{2A}Rs) in the PFC, this effect might result from the imbalance of 5-HT_{1A}R and 5-HT_{2A}R activation after blockade of these receptors by APDs, for which they show high affinity. Here we tested this hypothesis by examining the dependence of the APD-induced DA release in medial PFC (mPFC) on each receptor by using *in-vivo* microdialysis in wild-type (WT) and 5-HT_{1A}R and 5-HT_{2A}R knockout (KO) mice. Local APDs (clozapine, olanzapine, risperidone) administered by reverse dialysis induced a dose-dependent increase in mPFC DA output equally in WT and 5-HT_{2A}R KO mice whereas the DA increase was absent in 5-HT_{1A}R KO mice. To examine the relative contribution of both receptors to the clozapine-induced DA release in rat mPFC, we silenced G-protein-coupled receptors (GPCRs) *in vivo* with *N*-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) while 5-HT_{1A}Rs or 5-HT_{2A/2C}Rs in the mPFC were selectively protected with the respective antagonists WAY-100635 or ritanserin. The inactivation of GPCRs while preserving ~70% of 5-HT_{2A/2C}Rs prevented the clozapine-induced DA rise in mPFC. In contrast, clozapine increased DA in mPFC of EEDQ-treated rats whose 5-HT_{1A}Rs were protected (~50% of control rats). These results indicate that (1) 5-HT_{1A}Rs are necessary for the APDs-induced elevation in cortical DA transmission, and (2) this effect does not require 5-HT_{2A}R blockade by APDs.

Received 13 July 2009; Reviewed 10 August 2009; Revised 12 January 2010; Accepted 13 January 2010

Key words: Antipsychotic drugs, dopamine, prefrontal cortex, 5-HT_{1A} receptor, 5-HT_{2A} receptor.

Introduction

Cognitive impairment, including attention disorders, deficits in working memory and executive functions, is a central feature of schizophrenia lacking adequate treatment (Braff, 1993; Elvevag & Goldberg, 2000; Green *et al.* 2000). Negative symptoms are also poorly treated with current medications (Weickert *et al.* 2000), which, by themselves, induce this type of

symptomatology (Artaloytia *et al.* 2006). In particular, atypical antipsychotic drugs (APDs) improve negative symptoms and quality of life more than classical antipsychotics (Sumiyoshi *et al.* 2006; Woodward *et al.* 2005). Moreover, some APDs (amisulpride, clozapine, olanzapine, risperidone) proved superior to first-generation drugs when considering their overall efficacy (Leucht *et al.* 2009).

The ability of some APDs to improve negative/cognitive symptoms (Bubenikova-Valesova *et al.* 2008; Grayson *et al.* 2007; Harvey *et al.* 2008) has been attributed to their capacity to increase dopamine (DA)-mediated transmission in the medial prefrontal cortex (mPFC) and hippocampus of experimental animals

Address for correspondence: F. Artigas, Ph.D., Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, IIBB-CSIC (IDIBAPS), Roselló 161, 6th floor, 08036 Barcelona, Spain.
Tel.: (+34) 93-363-8315 Fax: (+34) 93-363-8301
Email: fapncj@iibb.csic.es

2 A. Bortolozzi et al.

(Assié et al. 2005; Bortolozzi et al. 2007b; Chung et al. 2004; Díaz-Mataix et al. 2005; Elsworth et al. 2008; Ichikawa et al. 2001; Kuroki et al. 1999; Li et al. 2009; Millan, 2000; Rollema et al. 1997, 2000; Youngren et al. 1999). Indeed, an optimal DA transmission is fundamental for the execution of PFC-dependent cognitive tasks (Vijayraghavan et al. 2007; Williams & Goldman-Rakic, 1995) and, among other anatomical and neurochemical abnormalities in PFC, schizophrenia patients show a reduced dopaminergic innervation (Akil et al. 1999; Lewis & Lieberman, 2000).

APDs share a higher *in-vitro* affinity and *in-vivo* occupancy of 5-HT_{2A} receptors (5-HT_{2ARs}) vs. DA D₂ receptors (Meltzer et al. 1989; Nyberg et al. 1998; Stockmeier et al. 1993). 5-HT_{2ARs} are densely expressed in PFC, mainly in projection pyramidal neurons (Amargós-Bosch et al. 2004; López-Giménez et al. 1997; Pazos et al. 1985; Santana et al. 2004), including those projecting to the ventral tegmental area (VTA) (Vázquez-Borsetti et al. 2009). 5-HT_{2AR} stimulation in PFC enhances the activity of pyramidal neurons projecting to the VTA (Puig et al. 2003, 2005) and of VTA dopaminergic neurons (Bortolozzi et al. 2005), leading to an increased mesocortical DA release (Bortolozzi et al. 2005; Gobert & Millan, 1999). Further, the 5-HT_{2AR} antagonist M100907 reduced the firing of DA neurons and DA release in mPFC (Bortolozzi et al. 2005; Minabe et al. 2001; Pehek et al. 2001). Overall, these observations are consistent with the above anatomical finding showing the existence of (a) closed mPFC-VTA loops (Carr & Sesack, 2000) and (b) the expression of 5-HT_{2ARs} in mPFC pyramidal neurons projecting to the VTA (Vázquez-Borsetti et al. 2009). However, 5-HT_{2AR} blockade has been suggested to be necessary for APDs to enhance DA release in the mPFC (Bonaccorso et al. 2002; Ichikawa et al. 2001; Liégeois et al. 2002).

In addition to 5-HT_{2AR} blockade, APDs display variable, but often high affinity for other monoamine receptors (see <http://kidb.case.edu/pdsp.php>; Roth et al. 2003). Agonist activity at 5-HT_{1A} receptors (5-HT_{1ARs}) by APDs appears to contribute to their superior efficacy in treating non-psychotic symptoms (Bantick et al. 2001; Meltzer & Sumiyoshi, 2008; Millan, 2000; Sumiyoshi et al. 2001a,b; but see Rényi et al. 2001; Yasuno et al. 2003). Hence, although APDs show little or no *in-vitro* affinity for 5-HT_{1ARs} ($K_i = 770$ nM for clozapine, >1000 nM for olanzapine and 490 nM for risperidone; Arnt & Skarsfeldt, 1998; Bymaster et al. 1996), these agents increase cortical DA release through 5-HT_{1AR} activation (Díaz-Mataix et al. 2005; Rollema et al. 1997).

Given the large co-expression of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in PFC (Amargós-Bosch et al. 2004) and their opposite role in modulating pyramidal neuron activity (Aghajanian & Marek, 1997; Amargós-Bosch et al. 2004; Araneda & Andrade, 1991; Ashby et al. 1994; Puig et al. 2005), the apparent *in-vivo* action of APDs at 5-HT_{1ARs} might be due to blockade of 5-HT_{2ARs} in cells co-expressing both receptors, thus enhancing 5-HT_{1AR}-mediated neurotransmission. Here we examined this possibility using control mice and mice lacking 5-HT_{1A} or 5-HT_{2A} receptors. We also used an *in-vivo* rat model consisting in the inactivation of G-protein-coupled receptors (GPCRs) with the alkylating agent *N*-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ), while selectively protecting 5-HT_{1A} or 5-HT_{2A/2C} receptors in the mPFC (Amargós-Bosch et al. 2004).

Materials and methods

Animals

Male albino Wistar rats (250–320 g) were from Iffa Credo (France). Male homozygous 5-HT_{1AR} knockout (KO) mice were generated at Princeton University (Parks et al. 1998) and 5-HT_{2AR} KO mice were generated at Columbia University (Fiorica-Howells et al. 2002). Both genotypes were gradually backcrossed to the C57BL/6 background. From these initial sources, some 5-HT_{1AR} KO and 5-HT_{2AR} KO mice were transferred to develop a stable colony in our animal facilities. Wild-type (WT) mice of the same genetic background (C57BL/6) were also used. Mice were aged 10–15 wk at the time of experiments. Animals were maintained in a temperature-controlled room with a 12-h light/dark cycle (lights on 08:00 hours). Food and water were available *ad libitum*. Animal care followed the European Union regulations (O.J. of E.C. L358/1 18/12/1986) and was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the School of Medicine, University of Barcelona.

Drugs and reagents

All reagents used were of analytical grade and were obtained from Merck (Germany). 5-HT oxalate, clozapine, 1-[2,5-dimethoxy-4-iodophenyl]-2-amino-propane] (DOI), dopamine hydrochloride, EEDQ, risperidone, ritanserin, 6-chloro-5-methyl-1-[6-(2-methylpyridin-3-yloxy) pyridin-3-yl carbamoyl] indoline (SB-242084), spiperone and *N*-[2-(4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl)ethyl]-*N*-(2-pyridyl) cyclohexane carboxamide 3 HCl (WAY-100635) were from Sigma/RBI (Spain). BAY x 3792, citalopram HBr

and olanzapine were from Bayer, Lundbeck A/S (Denmark) and Eli Lilly (USA), respectively. To assess local effects in microdialysis experiments, drugs were dissolved in perfusion fluid [aCSF (artificial cerebrospinal fluid, mM): NaCl, 125; KCl, 2.5; CaCl₂, 1.26 and MgCl₂, 1.18] and administered by reverse dialysis at the stated concentrations (uncorrected for membrane recovery). Clozapine, olanzapine and risperidone were initially dissolved in a drop of acetic acid and diluted to appropriate concentrations in aCSF. All other drugs were dissolved in distilled water, saline or aCSF, as required. Concentrated solutions (1 mM; pH adjusted to 6.5–7 with NaHCO₃ when necessary) were stored at –80 °C and working solutions were prepared daily by dilution in aCSF. Control mice and rats were perfused with aCSF. Bars in the figures show the period of drug administration, corrected for the void volume of the system.

Microdialysis procedures

Microdialysis experiments in rats and mice were conducted as described previously (Amargós-Bosch *et al.* 2004; Bortolozzi *et al.* 2003). Rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg i.p.) and implanted with 4-mm concentric dialysis probes (Cuprophane) in the mPFC [coordinates in mm: AP +3.2, L –0.8, DV –6.0 (Paxinos & Watson, 2005)]. Experiments were performed in awake animals ~20 h after surgery. Probes were perfused with aCSF at 1.5 µl/min. After an initial 100 min stabilization period, four baseline samples were collected (20 min each) before local drug administration, and successive dialysate samples were collected. For mice, the surgical and microdialysis procedures were identical to those described for rats, except for the dose of anaesthesia (40 mg/kg i.p.), length of dialysis membrane (2 mm), and the brain coordinates (in mm) of the mPFC: AP +2.2, L –0.2, DV –3.4 (Franklin & Paxinos, 1997).

Monoamine concentration in dialysate samples was determined by HPLC with electrochemical detection (Hewlett Packard 1049; +0.75 for DA, +0.6 V for 5-HT) as described previously (Bortolozzi *et al.* 2003; Diaz-Mataix *et al.* 2005). Detection limits were 2–3 fmol for DA and 5-HT.

At the end of the experiments, animals were killed by an overdose of anaesthetic. Brains were quickly removed and frozen in dry ice before being sectioned (40 µm) with a cryostat (HM500-0m Microm, Germany) in coronal planes. Brain sections were stained with Neutral Red to verify the correct placement of probes.

Silencing of GPCRs in vivo with selective protection of 5-HT_{1A}Rs or 5-HT_{2A/2C}Rs in mPFC

We used a previously described strategy to selectively protect 5-HT_{1A}Rs or 5-HT_{2A/2C}Rs in mPFC from the overall inactivating effect of EEDQ on GPCRs (Amargós-Bosch *et al.* 2004). EEDQ was systemically administered to inactivate GPCRs while selectively protecting one or other receptor by the local perfusion of selective antagonists (WAY-100635 for 5-HT_{1A}Rs, ritanserin for 5-HT_{2A/2C}Rs) through the microdialysis probes. EEDQ alkylates several GPCRs and inactivates their function (Gozlan *et al.* 1994), except those whose binding pockets are occupied. Thus, the perfusion of WAY-100635 or ritanserin in mPFC confers a selective protection of 5-HT_{1A}Rs or 5-HT_{2A/2C}Rs in mPFC, respectively, during EEDQ treatment. These two experimental groups are designated as GPCR-silenced + 5-HT_{1A}R-protected and GPCR-silenced + 5-HT_{2A/2C}R-protected, respectively.

Three to four hours after implantation, microdialysis probes were perfused with WAY-100635 (300 µM) for 3 h at 1.5 µl/min (5-HT_{1A}R protection). One hour after starting the perfusion, EEDQ (dissolved in ethanol/water 1:1) was administered at 6 mg/kg i.p. The same procedure was applied to protect 5-HT_{2A/2C}Rs using the 5-HT_{2A/2C}R antagonist ritanserin (300 µM). Control rats received vehicle intraperitoneally and aCSF through the dialysis probes. On the following day, histological or microdialysis experiments were performed. For autoradiographic studies, 14-µm-thick coronal sections were cut, thaw-mounted onto 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS; Sigma/RBI, Spain) coated slides, and kept at –20 °C until required. All experiments with control and EEDQ-treated rats were run in parallel.

Receptor autoradiography

To determine the extent of regional 5-HT_{1A}R or 5-HT_{2A/2C}R protection in EEDQ-treated rats we performed receptor autoradiography for 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/2C} receptors using the ligands [³H]8-OH-DPAT (227.0 Ci/mmol) and [³H]mesulergine (83.0 Ci/mmol), respectively, from Amersham (GE Healthcare, Spain). Fresh frozen coronal sections of PFC from control and EEDQ-treated rats were used. Incubation conditions for [³H]8-OH-DPAT were as previously described (Mengod *et al.* 1996). Non-specific binding was defined as that remaining in presence of 10^{–6} M 5-HT. Incubation conditions for [³H]mesulergine were as previously described (López-Giménez *et al.* 2002; Pazos *et al.* 1985). Non-specific binding was defined as that remaining in the presence of 10^{–6} M

4 A. Bortolozzi et al.

mianserin. After incubation and washing, tissue sections were dipped in distilled, ice-cold water and dried rapidly under a cold air stream. Tissues were exposed to tritium-sensitive film (Kodak Biomax MR; Kodak, USA) together with plastic ^3H standards for 60 d at 4 °C. All tissue sections used for quantification of receptor sites were processed simultaneously under the same conditions.

5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors were examined in mice brain by receptor autoradiography as previously described (López-Giménez et al. 2002; Mengod et al. 1996; Pazos et al. 1985) using (a) [^3H]8-OH-DPAT for 5-HT_{1A}Rs, (b) [^3H]mesulergine (plus 10^{-7}M of the selective 5-HT_{2C}R antagonist SB242084) for 5-HT_{2A}Rs, and (c) [^3H]mesulergine (plus 10^{-7}M of the 5-HT_{2A}R antagonist spiperone) for 5-HT_{2C}Rs. Quantitative analysis of the autoradiograms was done with AIS computerized image analysis system (Imaging Research Inc., Canada).

Data and statistical analysis

Microdialysis results are expressed as fmol/30- μl fraction for DA and 5-HT and shown in the Figures as percentages of baseline (individual means of four pre-drug fractions). Area under the curve (AUC) of selected time periods (fractions 6–16) was also calculated. Statistical analysis was performed using one- or two-way ANOVAs for repeated measures or AUC of DA or 5-HT values followed by Newman–Keuls *post-hoc* test.

Quantitative autoradiographic measurements obtained from the different radioligands were analysed using one-way ANOVA followed by Newman–Keuls *post-hoc* test or Student's *t* test, as appropriate. Data are expressed as means \pm S.E.M. Statistical significance has been set at the 95% confidence level (two tailed).

Results

Basal values of DA and 5-HT in mPFC dialysates

Basal extracellular levels of DA and 5-HT in dialysates from mPFC of mice and rats are shown in Table 1. Non-significant differences were found between mice genotype or between control and EEDQ-pretreated rats.

5-HT_{1A}R and 5-HT_{2A}R KO mice: receptor autoradiography and neurochemical analysis

The lack of 5-HT_{1A}Rs in these KO mice was previously assessed by autoradiography, electrophysiology and microdialysis procedures (Amargós-Bosch et al. 2004). Here, we extended previous autoradiographic

Table 1. Basal DA and 5-HT dialysate values in the mPFC of mice and rats

Group	Baseline DA (fmol/20-min fraction)	Baseline 5-HT (fmol/20-min fraction)
WT mice	6.3 \pm 0.8 (<i>n</i> = 54)	17.2 \pm 1.9 (<i>n</i> = 25)
5-HT _{1A} R KO mice	6.6 \pm 0.8 (<i>n</i> = 30)	19.7 \pm 1.9 (<i>n</i> = 9)
5-HT _{2A} R KO mice	5.7 \pm 0.6 (<i>n</i> = 49)	16.5 \pm 1.4 (<i>n</i> = 24)
Control rats	8.9 \pm 1.0 (<i>n</i> = 27)	n.e.
EEDQ pretreated rats	11.2 \pm 1.6 (<i>n</i> = 17)	n.e.

n.e., Not examined.

Data are means \pm S.E.M. of the number of animals shown in parentheses.

observations. [^3H]8-OH-DPAT binding to 5-HT_{1A}Rs showed a high density in PFC, hippocampus and raphe nuclei of WT mice (Fig. 1, panels A1–A3). Homozygous 5-HT_{1A}R KO mice showed no specific binding in either region (Fig. 1, panels A4–A6).

The absence of 5-HT_{2A}Rs in these KO mice was evaluated by receptor autoradiography and by the neurochemical response to the preferential 5-HT_{2A}R agonist DOI. Autoradiographic analysis of 5-HT_{2A}Rs revealed the presence of a strong signal in the frontal cortex and claustrum of WT mice (Fig. 2, panels A1–A2). Homozygous 5-HT_{2A}R KO mice showed no specific binding in either region (Fig. 2, panels A3–A4). Quantitative assessments of 5-HT_{1A}R and 5-HT_{2C}R density are shown in Table 2. No genotype differences between the densities of 5-HT_{2C}Rs and 5-HT_{1A}Rs were found in receptor-rich areas such as the choroid plexus and PFC, respectively (Fig. 2*b, c*).

Perfusion of aCSF did not significantly alter DA and 5-HT output in the mPFC of WT and 5-HT_{2A}R KO mice (DA, *n* = 6 and 5, respectively; 5-HT, *n* = 5 for each genotype) (Fig. 3*a, b*). Local administration of DOI (100 μM for 5-HT and 300 μM for DA; see Bortolozzi et al. 2003, 2005) enhanced 5-HT and DA output in the mPFC of WT mice (Fig. 3*c, d*). DOI induced a maximal elevation of the 5-HT output to 205 \pm 19% of baseline (*n* = 10) [$F(15, 135) = 7.71$, $p < 0.001$]. Similarly, DOI elevated DA output to 192 \pm 23% of baseline (*n* = 10) [$F(15, 135) = 6.46$, $p < 0.001$]. Neither of these effects was observed when DOI was perfused in the mPFC of 5-HT_{2A}R KO mice (Fig. 3*c, d*).

Effect of atypical antipsychotics on mPFC DA output in 5-HT_{1A}R and 5-HT_{2A}R KO mice

These experiments were conducted to examine whether the increase in DA output induced by APDs

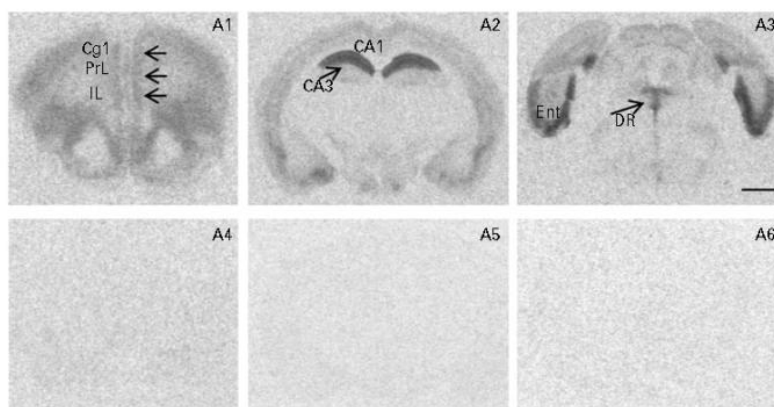


Fig. 1. Representative autoradiograms of [³H]8-OH-DPAT binding in the brains of wild-type (WT) (A1–A3, upper panels) and 5-HT_{1A}R knockout (KO) mice (A4–A6, lower panels). In WT mice, note the high density for 5-HT_{1A}Rs in (A1) prefrontal cortex [cingulated (Cg1), prelimbic (PrL), infralimbic (IL); AP: 1.78 mm], (A2) hippocampus (AP: –2.06 mm) and (A3) dorsal raphe nuclei (DR) and entorhinal cortex (Ent) (AP: –4.36 mm). Parallel sections of the corresponding null mutant mice (KO) show a lack of [³H]8-OH-DPAT binding (A4–A6). Scale bar, 1 mm.

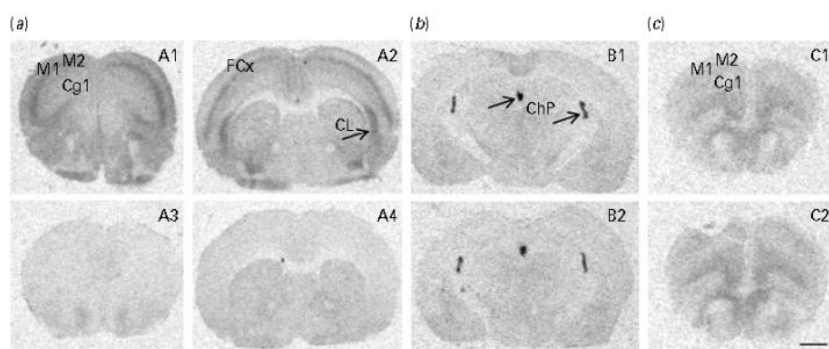


Fig. 2. Representative autoradiograms of [³H]mesulergine (a, b) and [³H]8-OH-DPAT (c) binding in the brains of wild-type (WT) (upper panels) and 5-HT_{2A}R knockout (KO) mice (lower panels). In WT mice, note the expected high density for 5-HT_{2A}Rs as visualized with [³H]mesulergine plus 10^{–7} M SB242084 in (A1) prefrontal cortex [cingulated (Cg1), Motor (M1, M2), AP: 2.10 mm] and, (A2) frontal cortex (FCx) and claustrum (CL) (AP: 0.74 mm). Parallel sections of the corresponding null mutant mice (KO) show a conspicuous lack of binding (A3–A4). No differences between genotypes were noted for 5-HT_{2C}Rs as visualized with [³H]mesulergine plus 10^{–7} M spiperone in the choroid plexus (ChP) (B1–B2) nor for 5-HT_{1A}Rs, as visualized with [³H]8-OH-DPAT in prefrontal cortex (C1–C2) in WT and 5-HT_{2A}R KO mice, respectively. Scale bar, 1 mm.

in mPFC is primarily associated with activation of 5-HT_{1A}Rs or with blockade of 5-HT_{2A}Rs. Local administration of clozapine (300 μ M), olanzapine (100 μ M) (Díaz-Mataix *et al.* 2005) and risperidone (100 μ M) by reverse dialysis increased the DA concentration similarly in the mPFC of WT and 5-HT_{2A}R KO mice. Two-way ANOVAs revealed a significant effect of time and non-significant effects of genotype and time \times genotype interaction (Fig. 4a–c). The maximal

effect induced by clozapine on mPFC DA output was $428 \pm 52\%$ of baseline in WT mice ($n=9$) and $442 \pm 54\%$ of baseline in 5-HT_{2A}R KO mice ($n=9$) [time effect: $F(15, 240) = 37.22$, $p < 0.0001$]. Olanzapine perfusion increased DA output to $363 \pm 61\%$ of basal values in mPFC of WT mice ($n=6$) and to $348 \pm 75\%$ in 5-HT_{2A}R KO mice ($n=7$) [time effect: $F(15, 165) = 10.84$, $p < 0.0001$], and the maximal elevation of mPFC DA release produced by risperidone was $283 \pm 71\%$ of

Table 2. 5-HT_{1A}R and 5-HT_{2C}R labelling in different brain regions from WT and 5-HT_{2A}R KO mice

	5-HT _{1A} R [³ H]8-OHDPAT (fmol/mg tissue)		5-HT _{2C} R [³ H]mesulergine + 10 ⁻⁷ M spiperone (fmol/mg tissue)		
	Prefrontal cortex	Frontal cortex	Frontal cortex	Clastrum	Choroid plexus
WT	34.1 ± 0.5	23.1 ± 1.1	18.4 ± 3.2	18.0 ± 4.0	127.5 ± 4.2
5-HT _{2A} R KO	32.5 ± 1.0	23.2 ± 1.7	13.6 ± 4.7	21.3 ± 4.6	128.6 ± 9.0

5-HT_{1A}R labelling by [³H]8-OHDPAT and 5-HT_{2C}R labelling by [³H]mesulergine + 10⁻⁷ M spiperone were measured in different brain regions including prefrontal cortex (AP: 2.1 mm), frontal cortex and claustrum (AP: ~0.74 mm) and lateral and medial choroid plexuses (AP: about -1.58 mm). Results, expressed as fmol/mg tissue, are the means ± s.e.m. of 4–8 observations per mouse (*n* = 4) (one or two observations for each hemisphere of two consecutive sections per animal and four animals per group). Non-significant differences were observed between both genotypes (Student's *t* test).

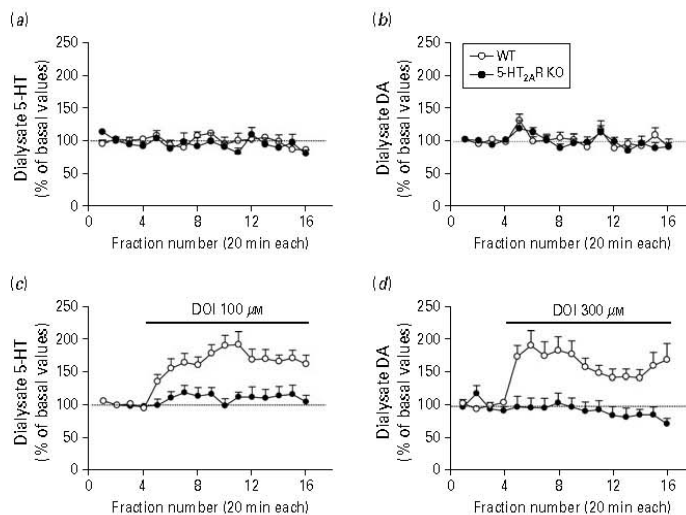


Fig. 3. Local effect of the 5-HT_{2A/2C}R agonist DOI (100–300 μM) on the output of 5-HT (c) and DA (d) in the mPFC of wild-type (WT) and 5-HT_{2A}R knockout (KO) mice. The perfusion of DOI increased 5-HT and DA levels in mPFC of WT mice (*n* = 10). Both effects were absent in 5-HT_{2A}R KO mice (*n* = 7–10). The administration of aCSF did not alter prefrontal 5-HT (a) and DA (b) in either genotype (*n* = 5–6). Data are expressed as mean ± s.e.m. See Results section for statistical analysis.

baseline in WT mice (*n* = 5) and 310 ± 68 % of baseline in 5-HT_{2A}R KO mice (*n* = 5) [time effect: *F*(15, 120) = 10.85, *p* < 0.0001].

However, clozapine (300 μM), olanzapine (100 μM) and risperidone (100 μM) were unable to increase DA output in the mPFC of 5-HT_{1A}R KO mice (*n* = 4–6) (Fig. 4a–c). Two-way ANOVAs revealed significant differences in the effects of APDs between the strains of mice: (a) clozapine [genotype effect: *F*(2, 19) = 7.83, *p* < 0.01; time effect: *F*(15, 285) = 21.88, *p* < 0.0001; time × genotype interaction: *F*(30, 285) = 3.79,

p < 0.0001], (b) olanzapine [genotype effect: *F*(2, 14) = 5.65, *p* < 0.05; time effect: *F*(15, 210) = 7.42, *p* < 0.0001; time × genotype interaction: *F*(30, 210) = 2.05, *p* < 0.001] and (c) risperidone [genotype effect: *F*(2, 13) = 8.66, *p* < 0.01; time effect: *F*(15, 195) = 10.41, *p* < 0.0001; time × genotype interaction: *F*(30, 195) = 3.73, *p* < 0.0001].

In addition, the local perfusion of clozapine and olanzapine at increasing concentrations (30–100–300 μM) significantly raised DA concentration in mPFC of both WT and 5-HT_{2A}R KO, but not in 5-HT_{1A}R KO mice in a concentration-dependent

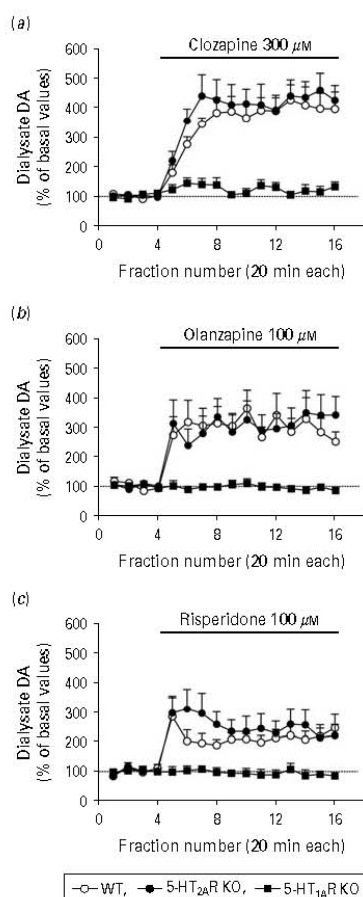


Fig. 4. The local administration of (a) clozapine (300 μM, n=9), (b) olanzapine (100 μM, n=6-7) and (c) risperidone (100 μM, n=5) increased similarly DA levels in mPFC of wild-type (WT) and 5-HT_{2A}R knockout (KO) mice. This effect was not observed when APDs were infused in the mPFC of 5-HT_{1A}R KO mice (n=4-6, a-c). Data are expressed as mean ± S.E.M. See Results section for statistical analysis.

manner (Fig. 5a, b). Two-way ANOVAs of AUC revealed significant differences in the effects of APDs on the different genotypes: (a) clozapine [concentration effect: $F(2, 40) = 8.42$, $p < 0.001$; genotype effect: $F(2, 40) = 16.02$, $p < 0.0001$] and (b) olanzapine [concentration effect: $F(2, 31) = 5.40$, $p < 0.01$; genotype effect: $F(2, 31) = 11.60$, $p < 0.001$]. Unlike DA, the concentration of 5-HT in mPFC dialysates was similarly affected by clozapine (300 μM) and olanzapine (100 μM) in the three genotypes. A marginal reduction was

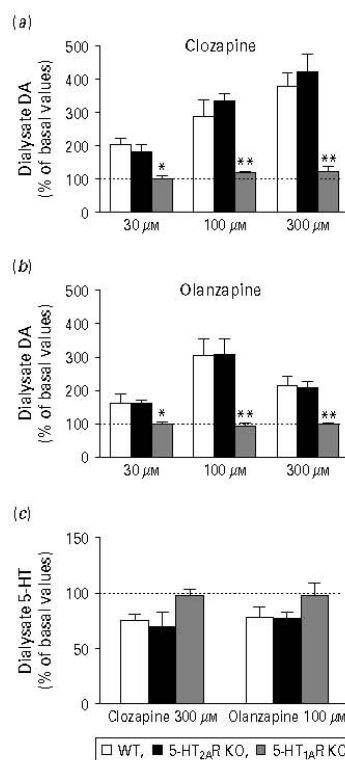


Fig. 5. Local administration of (a) clozapine and (b) olanzapine at increasing concentrations (30–100–300 μM) raised a similar DA output in mPFC of wild-type (WT) and 5-HT_{2A}R KO mice. This effect was not observed when APDs were perfused in the mPFC of 5-HT_{1A}R KO mice. (c) Local effect of clozapine (300 μM) and olanzapine (100 μM) on 5-HT output in mPFC of WT, 5-HT_{2A}R KO and 5-HT_{1A}R KO mice. Data are AUCs (fractions 6–16) expressed as percentage of baseline. n=4–9 mice for all groups, except for 300 μM olanzapine in mPFC of 5-HT_{2A}R KO mice, where n=3. See Results section for statistical analysis. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. WT and 5-HT_{2A}R KO mice.

noted in WT and 5-HT_{2A}R KO, but not in 5-HT_{1A}R KO mice ($p = 0.09$ for clozapine; $p = 0.17$ for olanzapine; one-way ANOVA of AUCs) (Fig. 5c).

Effect of clozapine on mPFC DA output after GPCR silencing with selective protection of 5-HT_{1A} or 5-HT_{2A/2C} receptors in rats

To assess the involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the clozapine-induced increase of DA output in rat PFC, we examined its effect in control

8 A. Bortolozzi et al.

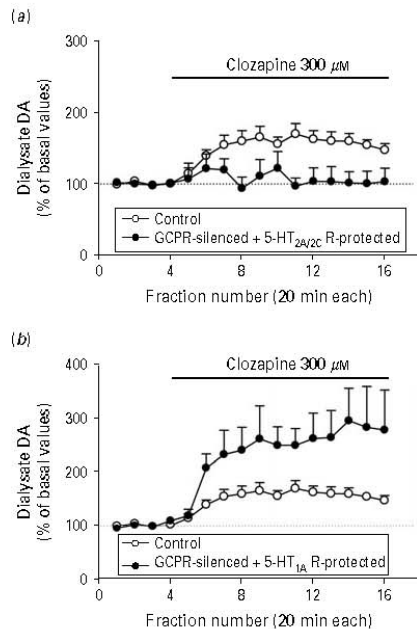


Fig. 6. (a) The perfusion of 300 μM clozapine in mPFC of control rats increased local DA output ($n=10$). This effect was absent in the mPFC of rats whose GPCRs were silenced by a prior EEDQ injection (6 mg/kg i.p.) and their prefrontal 5-HT_{2A/2C}Rs had been protected by ritanserin (300 μM) administration through the microdialysis probe ($n=5$) (see Methods section). (b) Conversely, clozapine administration (300 μM) elicited a significant DA elevation in mPFC of rats treated with EEDQ whose 5-HT_{1A}Rs were preserved by prior WAY-100635 (300 μM) administration ($n=6$). This effect was significantly greater than in control rats ($n=10$). Data are expressed as mean ± s.e.m. See Results section for statistical analysis.

rats and in rats whose GPCRs were previously inactivated by EEDQ together with a selective protection of 5-HT_{1A} or 5-HT_{2A/2C} receptors in mPFC (Amargós-Bosch et al. 2004, see Methods section).

Clozapine perfusion (300 μM) increased the DA output in control rats ($n=10$) to 170 ± 14% of baseline but to a much lower extent (a transient increase to 121 ± 24% of baseline) in rats with preserved 5-HT_{2A/2C}Rs ($n=5$) (Fig. 6a). Two-way ANOVAs revealed a significant group effect [$F(1,13)=9.41, p<0.009$], time effect [$F(15,195)=3.98, p<0.0001$] and time × group interaction [$F(15,195)=3.23, p<0.0001$].

We also tested the role of mPFC 5-HT_{1A}Rs in the clozapine-induced DA release in rats using the EEDQ

model. 5-HT_{1A}Rs were unilaterally protected in rat mPFC by local administration of WAY-100635 (300 μM) during EEDQ treatment (see Methods section). In this group of rats, clozapine (300 μM) elicited a significant DA elevation (299 ± 57% of baseline, $n=6$) which was greater than in control rats (170 ± 14% of baseline, $n=10$; see above) (Fig. 6b). Two-way ANOVAs revealed a significant effect of group [$F(1,14)=8.17, p<0.01$], time [$F(15,210)=14.08, p<0.0001$] and time × group interaction [$F(15,210)=3.51, p<0.0001$].

Previous studies have shown that clozapine reversed the increase of cortical 5-HT release induced by DOI (Bortolozzi et al. 2003). Since DOI also elevates DA release in mPFC by a 5-HT_{2A}R-dependent mechanism (Bortolozzi et al. 2005), we examined whether clozapine was able to counteract the increase in DA output induced by DOI, despite its ability to increase DA output by itself. DOI (300 μM) was locally administered in the mPFC of control rats and of EEDQ-treated rats with protected 5-HT_{2A/2C}Rs ($n=6$ and 8, respectively). DOI increased DA output in control rats and in those treated with EEDQ (with protected 5-HT_{2A/2C}Rs). Two-way ANOVAs revealed a significant effect of time [time effect: $F(9,108)=18.88, p<0.0001$; non-significant effects of the group or time × group interactions; fractions 1–10] (Fig. 7a). The co-perfusion of clozapine (300 μM) reversed the effect of DOI on DA output in the mPFC of control rats but not of those treated with EEDQ with protected 5-HT_{2A/2C}Rs [group effect: $F(1,12)=11.58, p<0.005$; time effect: $F(15,180)=8.87, p<0.0001$; time × group interaction: $F(15,180)=3.69, p<0.0001$; fractions 1–16] suggesting that this effect does not involve blockade of 5-HT_{2A}Rs.

To examine the involvement of 5-HT_{1A}Rs in the clozapine-mediated reversal of DOI action on PFC DA output, we conducted additional experiments in which we evaluated the ability of the 5-HT_{1A} agonist BAY × 3702 to antagonize the DOI-mediated DA increase. The local perfusion of 30 μM BAY × 3702 reversed the DA elevation in PFC induced by local DOI administration [group effect: $F(1,7)=31.60, p<0.0008$; time effect: $F(15,105)=7.26, p<0.0001$; time × group interactions: $F(15,105)=3.04, p<0.0001$] (Fig. 7b).

Autoradiographic examination of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/2C} receptors in the GPCR-silencing model

We performed additional autoradiographic experiments in rats not subjected to drug infusion (except for WAY-100635 or ritanserin administration during EEDQ treatment) to determine the site and extent of 5-HT_{1A}R and 5-HT_{2A/2C}R protection in the

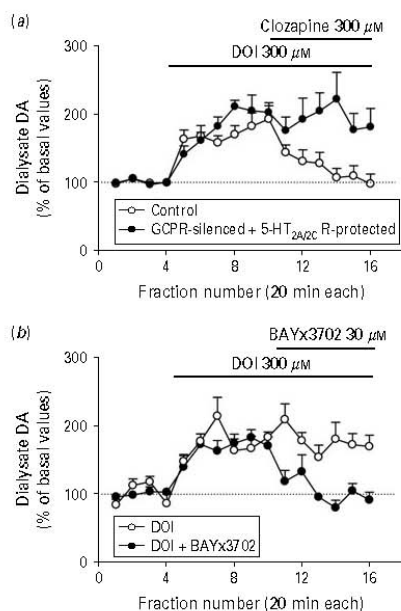


Fig. 7. (a) The perfusion of 300 μM DOI (5-HT_{2A/2C} agonist) increased DA output in the mPFC of control rats and of rats treated with EEDQ and whose mPFC 5-HT_{2A/2C}Rs were unilaterally preserved by prior ritanserin administration. The perfusion of clozapine (300 μM) reversed the effect of DOI only in control rats (*n* = 6–8) but not in those with protected 5-HT_{2A/2C}R. (b) In control rats, the local perfusion of BAY x 3702 (30 μM) antagonized the increase of DA output in mPFC induced by the local administration of DOI (300 μM) (*n* = 5). Data are expressed as mean ± s.e.m. See Results section for statistical analysis.

EEDQ-treated rats. EEDQ evoked a massive reduction of 5-HT_{1A}R and 5-HT_{2A/2C}R density (Figs. 8 and 9).

Local, unilateral ritanserin perfusion by reverse dialysis in the mPFC partially avoided 5-HT_{2A/2C}R inactivation by EEDQ. Densities of 5-HT_{2A/2C}R-binding sites in the ipsilateral (protected) mPFC at AP coordinates (in mm) 3.20–3.70 ranged from 61% to 83% (mean 71 ± 4%, *n* = 4 rats) relative to mPFC of control rats in the same hemisphere (*n* = 2). In the contralateral (unprotected) side, 5-HT_{2A/2C}R-binding sites were 31 ± 2% (*n* = 4 rats) relative to the mPFC in the same hemisphere of control rats (*n* = 2). One-way ANOVA indicated that [³H]mesulergine binding in ipsilateral mPFC of the GPCR-silenced + 5-HT_{2A/2C}R-protected group was significantly different from contralateral mPFC (*p* < 0.001) (Fig. 8*a, b*). Coronal sections from an AP coordinate distant from local ritanserin

administration (e.g. 4.20 mm), revealed a marginally significant difference between ipsilateral and contralateral sides (68 ± 3 vs. 43 ± 3% relative to PFC in the same hemispheres of control rats, respectively, *p* = 0.058).

Figure 9*a* shows autoradiograms of 5-HT_{1A}Rs in PFC at AP 3.20–3.70 mm from different groups of rats: control (*n* = 2), GPCR-silenced (*n* = 2), GPCR-silenced + 5-HT_{2A/2C}R-protected (*n* = 4) and GPCR-silenced + 5-HT_{1A}R-protected (*n* = 4). WAY-100635 perfusion partially protected 5-HT_{1A}Rs from inactivation by EEDQ. One-way ANOVA indicated that [³H]8-OH-DPAT binding in ipsilateral PFC of the GPCR-silenced + 5-HT_{1A}R-protected group was significantly different from contralateral PFC (51 ± 7 vs. 17 ± 4% relative to ipsilateral and contralateral cortices of control rats, respectively, *p* < 0.001) (Fig. 9*b*). In this case, 5-HT_{1A}R density was also significantly different between both ipsilateral and contralateral mPFC at AP ~4.20 mm of GPCR-silenced + 5-HT_{1A}R-protected rats (data not shown).

Discussion

The main finding of the present study is that APDs such as clozapine, olanzapine and risperidone do not require interaction with 5-HT_{2A}Rs to elevate DA release in rodent mPFC. This observation is relevant to understanding the neurobiological basis of the superior therapeutic action of these APDs in schizophrenia (Leucht *et al.* 2009) and may help to develop new drugs overcoming the limitations of existing treatments.

Methodological considerations

Two experimental models have been used in the present study: (a) mice lacking 5-HT_{1A} or 5-HT_{2A} receptors, and (b) rats, whose GPCRs were inactivated by EEDQ using selective protection of 5-HT_{1A} or 5-HT_{2A/2C} receptors.

The lack of 5-HT_{1A}Rs in KO mice (Parks *et al.* 1998) was assessed by receptor autoradiography, electrophysiology and microdialysis (Amargós-Bosch *et al.* 2004; present study). Here we extend these observations to 5-HT_{2A}R KO mice (Fiorica-Howells *et al.* 2002). A preliminary account of these data has been presented previously (Bortolozzi *et al.* 2007*a*). We show the absence of compensatory changes of 5-HT_{1A}R and 5-HT_{2C}R proteins in mice lacking 5-HT_{2A}Rs, similarly to Popa *et al.* (2005) who reported an unaltered 5-HT_{2C}R mRNA expression in 5-HT_{2A}R KO mice. Consistent with the autoradiographic data, the preferential

10 A. Bortolozzi et al.

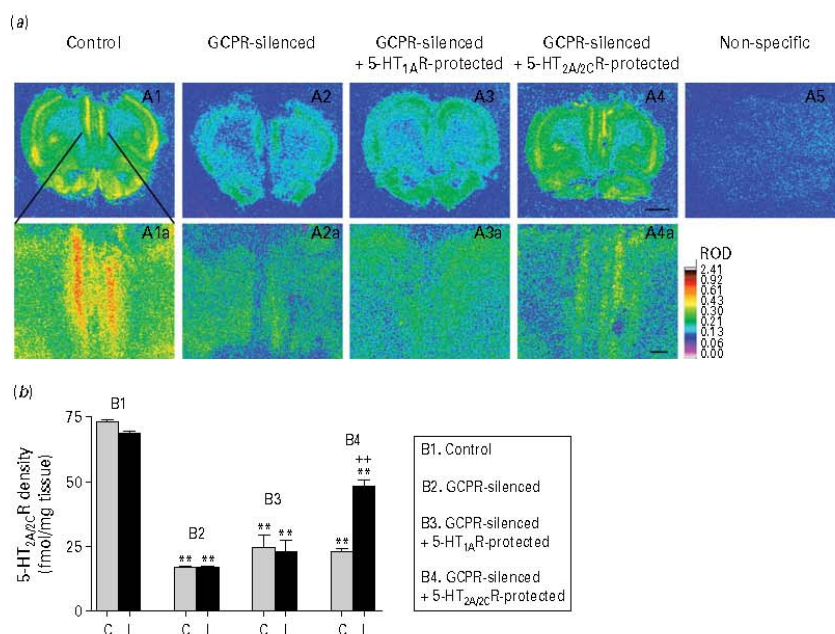


Fig. 8. (a) Representative autoradiograms showing the density of 5-HT_{2A/2C}R labeled with [³H]mesulergine in coronal sections of PFC (AP in mm: 3.70–3.20) from different pretreatment groups: (A1) controls (rats received the EEDQ vehicle i.p. and aCSF through the dialysis probe), (A2) GPCR-silenced rats (injected with 6 mg/kg i.p. EEDQ and perfused with aCSF through the dialysis probe), (A3) GPCR-silenced + 5-HT_{1A}R-protected rats (treated with 6 mg/kg i.p. EEDQ while 300 μM WAY-100635 was perfused through the dialysis probe), and (A4) GPCR-silenced + 5-HT_{2A/2C}R-protected rats (treated with 6 mg/kg i.p. EEDQ while 300 μM ritanserin was perfused through the dialysis probe). A5 shows non-specific binding. Panels A1a–A4a are photomicrographs showing enlargements of the marked area in panels A1–A4. Note the higher 5-HT_{2A/2C}R binding in ipsilateral (protected) mPFC with respect to the contralateral (unprotected) side of panel A4 and the very low occupancy for 5-HT_{2A/2C}R in both hemispheres of panels A2 and A3. Scale bars, 2 mm (A1–A4) and 500 μm (A1a–A4a). (b) Densitometric quantification of 5-HT_{2A/2C}R binding in mPFC including cingulate, prelimbic and infralimbic cortices of the different group of rats (B1–B4). Bars represent mean 5-HT_{2A/2C}R fmol/mg tissue ± S.E.M. of 4–8 observations (two or four observations at left and right hemispheres of two consecutive sections per animal and two to four animals per group). ** *p* < 0.001 significantly different from corresponding contralateral (C) and ipsilateral (I) mPFC of control rats, * + *p* < 0.001 significantly different from contralateral mPFC of GPCR-silenced + 5-HT_{2A/2C}R-protected rats, using one-way ANOVA followed by Newman-Keuls *post-hoc* test.

5-HT_{2A}R agonist DOI did not increase 5-HT and DA release in the mPFC of 5-HT_{2A}R KO mice, an effect requiring the activation of post-synaptic 5-HT_{2A}R on pyramidal cells projecting to the midbrain monoaminergic nuclei (Bortolozzi et al. 2005; Martín-Ruiz et al. 2001; Vázquez-Borsetti et al. 2009).

To examine the role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/2C} receptors in rat PFC, we used a previously described model (Amargós-Bosch et al. 2004), consisting in the selective protection of one or other receptor from the inactivating action of EEDQ (Battaglia et al. 1987; Gozlan et al. 1994; Keck & Lakoski, 2000) through the local administration of antagonists (WAY-100635

or ritanserin, respectively) to occupy 5-HT_{1A} or 5-HT_{2A/2C} receptors in mPFC during EEDQ treatment. This model is far from the specificity of KO mice yet it allows for a preliminary examination of the involvement of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors on the effects of APDs in the rat brain.

The present autoradiographic data indicate that (1) EEDQ produces a massive loss of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/2C} receptors *in vivo*, and (2) the local protection of 5-HT_{1A} or 5-HT_{2A/2C} receptors by the respective antagonists was relatively successful, as shown by differences in receptor density between (a) ipsilateral (protected) and contralateral (unprotected) mPFCs,

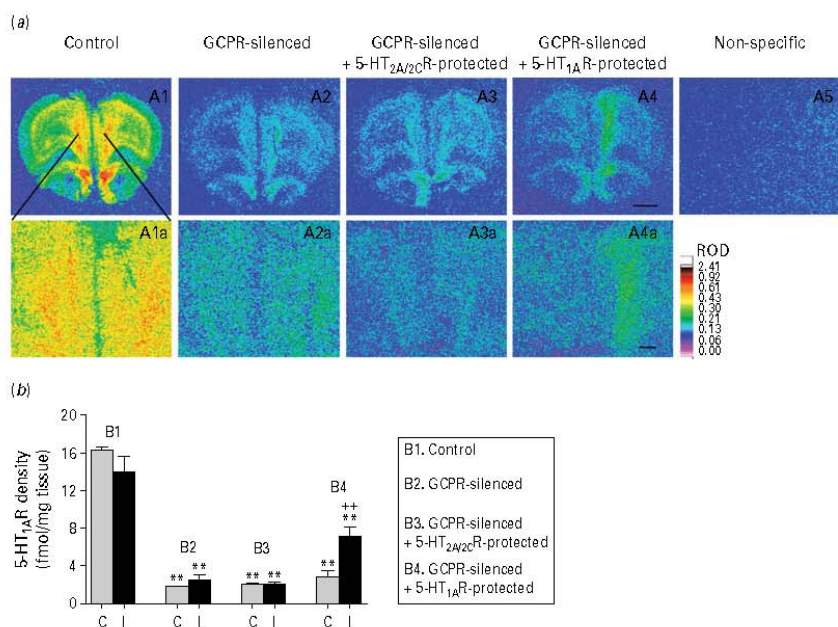


Fig. 9. (a) Representative autoradiograms showing the density of 5-HT_{1A}Rs labelled with [³H]8-OH-DPAT in coronal sections of PFC (AP in mm: 3.70–3.20) from different pretreatment groups: (A1) controls (rats received the EEDQ vehicle i.p. and aCSF through the dialysis probe), (A2) GPCR-silenced rats (injected with 6 mg/kg i.p. EEDQ and perfused with aCSF through the dialysis probe), (A3) GPCR-silenced + 5-HT_{2A/2C}R-protected rats (injected with 6 mg/kg i.p. EEDQ while 300 μM ritanserin was perfused through the dialysis probe), and (A4) GPCR-silenced + 5-HT_{1A}R-protected rats (injected with 6 mg/kg i.p. EEDQ while 300 μM WAY-100635 was perfused through the dialysis probe). A5 shows non-specific binding. Panels A1a–A4a are photomicrographs showing enlargements of the marked area in panels A1–A4. Note the higher 5-HT_{1A}R binding in ipsilateral (protected) mPFC with respect to the contralateral (unprotected) side of A4 and the very low occupancy for 5-HT_{1A}Rs in both hemispheres of panels A2 and A3. Scale bars, 2 mm (A1–A4) and 500 μm (A1a–A4a). (b) Densitometric quantification of 5-HT_{1A}R binding in mPFC including cingulate, prelimbic and infralimbic cortices of the different group of rats (B1–B4). Bars represent mean 5-HT_{1A}R fmol/mg tissue ± s.e.m. of 4–8 observations (two or four observations at left and right hemispheres of two consecutive sections per animal and two to four animals per group). ** *p* < 0.001 significantly different from corresponding contralateral (C) and ipsilateral (I) mPFC of control rats, ++ *p* < 0.001 significantly different from contralateral mPFC of GPCR-silenced + 5-HT_{1A}R-protected rats, using one-way ANOVA followed by Newman-Keuls *post-hoc* test.

and (b) the ipsilateral side in EEDQ-treated and control rats. The fact that receptor densities in protected sides were lower than in control rats may be partly due to the damage caused by the dialysis probe, which forced us to use coronal sections relatively distant from the administration site, and thus, with lower antagonist occupancy than sites close to the microdialysis probes receiving a higher antagonist concentration.

5-HT_{1A}Rs have a great sensitivity to EEDQ *in vitro* (Gozlan *et al.* 1994). The present *in-vivo* data are consistent with this view, since EEDQ reduced 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A/2C} receptor densities to 15% and 30% of controls, respectively. Similar differences have been noted for DA D₁ and D₂ receptors (see Cox &

Waszczak, 1993; Hemsley & Crocker, 2001 and references therein). Interestingly, despite measured receptor densities in protected sides being lower than 100% of controls, DOI increased DA release to the same extent in the mPFC of control rats and of those receiving EEDQ + ritanserin, indicating that local 5-HT_{2A/2C}Rs remained entirely functional using this experimental paradigm. Similar results have been reported for 5-HT_{1A}R agonists (Amargós-Bosch *et al.* 2004).

Role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the APD-induced DA release

Despite the diverse pharmacological profiles of APDs (Arnt & Skarsfeldt, 1998), they share the ability

to increase DA release in rodent mPFC through 5-HT_{1A}R activation (Bortolozzi et al. 2007b; Díaz-Mataix et al. 2005; Ichikawa et al. 2001; Li et al. 2009; Rollema et al. 1997, 2000). This effect was attributed to simultaneous blockade of 5-HT_{2A} and D₂ receptors (Ichikawa et al. 2001) yet it seems to depend exclusively on the activation of 5-HT_{1A}Rs in mPFC (Bortolozzi et al. 2007b; Díaz-Mataix et al. 2005). In the present study, we further confirm these previous observations in 5-HT_{1A}R KO mice and show that 5-HT_{2A}R blockade is not a requirement. Further, we extend these observations to rat mPFC, where clozapine increased local DA release in presence of ~50% of mPFC 5-HT_{1A}Rs but not in rats whose 5-HT_{1A}Rs were inactivated to 15% of controls by EEDQ treatment. The greater DA increase induced by clozapine in rats whose GPCRs were silenced by EEDQ – yet with preserved 5-HT_{1A}Rs – suggests an additional regulatory role of other receptors in the clozapine-evoked DA release (e.g. DA D₂, α_2 -adrenoceptors) once the DA increase has been induced by 5-HT_{1A}R stimulation. It has been suggested that WAY-100635 may also bind to DA D₄ receptors in addition to 5-HT_{1A}Rs (Chemel et al. 2006; Martel et al. 2007) and therefore, some protection for D₄ receptors may exist in the EEDQ + WAY-100635 model. Thus, it cannot be excluded that D₄ receptors play a role in the clozapine-induced cortical DA release using this model in rat mPFC despite its effects being totally absent in 5-HT_{1A}R KO mice (Díaz-Mataix et al. 2005; present study).

The apparent bell-shaped dose–effect relationship of olanzapine on DA release (Fig. 5b) suggests the involvement of other prefrontal monoaminergic receptors (e.g. α_1 -adrenoceptors; Amargós-Bosch et al. 2003) for which olanzapine shows nm affinity (Arnt & Skarsfeldt, 1998).

The similar *in-vivo* DA increases in PFC produced by several APDs (Díaz-Mataix et al. 2005; Ichikawa et al. 2001), does not bear a relationship with their *in-vitro* affinities for 5-HT_{1A}Rs, e.g. high for ziprasidone, low for clozapine and risperidone (yet clozapine occupies 5-HT_{1A}Rs *in vivo*; Chou et al. 2003) or negligible for olanzapine (Arnt & Skarsfeldt, 1998; Bymaster et al. 1996; Newman-Tancredi et al. 1998). The exact way by which APDs lacking *in-vitro* affinity interact *in vivo* with 5-HT_{1A}R-mediated neurotransmission is unclear. The DA output induced by APDs and 5-HT_{1A} agonists was cancelled by co-perfusion with the GABA_A antagonist bicuculline, suggesting the involvement of 5-HT_{1A}Rs in GABA interneurons (Díaz-Mataix et al. 2005). Given the inhibitory nature of 5-HT_{1A}Rs, a preferential action of APDs on 5-HT_{1A}Rs located on GABA interneurons would eventually result in an

increased excitatory cortical output to the VTA to enhance DA neuron activity (Gessa et al. 2000), an effect qualitatively similar to that of selective 5-HT_{1A} agonists (Díaz-Mataix et al. 2005, 2006).

The increase in mPFC DA release produced by APDs might theoretically result from an interaction between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in neurons co-expressing these receptors (Amargós-Bosch et al. 2004). Thus, 5-HT_{2A}R blockade by APDs might alter the physiological balance between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors, resulting in an increase of 5-HT_{1A}R-mediated neurotransmission. However, the present data do not support this possibility, since the APDs clozapine, olanzapine and risperidone increased a similar DA release in the mPFC of mice lacking 5-HT_{2A}Rs (with no alteration of 5-HT_{1A}R density) and in WT controls. These results in mice were confirmed by rat data showing that clozapine was ineffective in enhancing DA output in the mPFC of rats whose 5-HT_{1A}Rs were inactivated (~15% of controls), yet whose 5-HT_{2A/2C}Rs were protected (~70% of controls).

Interestingly, and despite its ability to stimulate DA release when given alone, clozapine counteracted the increase in PFC DA output induced by DOI, suggesting a different effect in PFC in basal or stimulated conditions. This pattern is similar to that observed in some electrophysiological studies, where clozapine displays a state-dependent action, reducing neuronal hyperactivity (e.g. Homayoun & Moghaddam, 2007; Kargieman et al. 2007; Schwieler & Erhardt, 2003). Thus, clozapine would activate the mesocortical DA system from basal conditions but would dampen cortical hyperactivity.

Clozapine could not reverse the effect of DOI in GPCR-silenced + 5-HT_{2A/2C}R-protected rats. In this group, 5-HT_{2A}Rs were entirely functional, as indicated by the local effect of DOI on DA output, comparable to that in controls. The inability of clozapine to counteract DOI's effect in these rats suggests the involvement of other receptors, different from 5-HT_{2A}Rs, to reverse the action of DOI in control rats. Although we could not perform a systematic study, the comparable effect of clozapine and the selective 5-HT_{1A}R agonist BAY x 3702 suggests the involvement of 5-HT_{1A}Rs.

Overall, these findings indicate that the stimulation of mesocortical DA release by APDs does not require the presence of 5-HT_{2A}Rs and suggest that these drugs activate 5-HT_{1A}Rs to enhance cortical DA neurotransmission. Alternatively, it is conceivable that other receptor–receptor interactions might explain this marked discrepancy between *in-vitro* and *in-vivo* actions of APDs at 5-HT_{1A}Rs.

Functional consequences

The present data, obtained in mice and rats using two different experimental models (permanent 5-HT receptor KO mice and GPCR inactivation with selective protection of 5-HT receptors) indicate that blockade of 5-HT_{2A}Rs by APDs is not a necessary step to elevate DA release and that this effect is mediated by indirect activation of 5-HT_{1A}Rs in PFC. The molecular/cellular basis of the present *in-vivo* results is not known.

These observations do not preclude at all that 5-HT_{2A}R blockade by APDs participates in their therapeutic action. Our conclusions are restricted to the role of 5-HT receptors required to enhance mesocortical DA, an effect potentially important for the actions of APDs on negative symptoms and cognitive deficits of schizophrenia patients. Given the lack of adequate treatment of these problems, further detailed studies are required to examine the ability of APDs – and in particular, of clozapine – to stimulate cortical 5-HT_{1A}R-mediated neurotransmission despite their low or negligible *in-vitro* affinity.

Acknowledgements

This work was supported by grants SAF 2007-62378 and SENY Fundació. A.B. is recipient of a Ramón y Cajal contract from MICINN-IDIBAPS. M.M. is a recipient of a predoctoral fellowship from CSIC (I3P program). We thank the pharmaceutical companies for drug supply. We also thank Leticia Campa for her skilful maintenance of HPLC equipment and dialysate analyses. We acknowledge the skilful technical assistance of Mrs Verónica Paz. We thank Dr M. Hamon and Dr L. Lanfumey (Paris, France) for their help with 5-HT_{2A}R KO mice.

Statement of Interest

None.

References

Aghajanian GK, Marek GJ (1997). Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells. *Neuropharmacology* 36, 589–599.

Akil M, Pierri JN, Whitehead RE, Edgar CL, et al. (1999). Lamina-specific alterations in the dopamine innervation of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects. *American Journal of Psychiatry* 156, 1580–1589.

Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Adell A, Artigas F (2003). Stimulation of α_1 -adrenoceptors in the rat medial prefrontal cortex increases the local *in vivo* 5-hydroxytryptamine release. *Reversal by antipsychotics drugs*. *Journal of Neurochemistry* 87, 831–842.

Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, et al. (2004). Co-expression and *in vivo* interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cerebral Cortex* 14, 281–299.

Araneda R, Andrade R (1991). 5-Hydroxytryptamine-2 and 5-hydroxytryptamine1A 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.

Artaloytia JF, Arango C, Lahti A, Sanz J, et al. (2006). Negative signs and symptoms secondary to antipsychotics: a double-blind, randomized trial of a single dose of placebo, haloperidol, and risperidone in healthy volunteers. *American Journal of Psychiatry* 163, 488–493.

Ashby CR, Edwards E, Wang RY (1994). Electrophysiological evidence for a functional interaction between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat medial prefrontal cortex: an iontophoretic study. *Synapse* 17, 173–181.

Assié MB, Ravailhe V, Faucillon V, Newman-Tancredi A (2005). Contrasting contribution of 5-hydroxytryptamine1A 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.

Bantick RA, Deakin JF, Grasby PM (2001). The 5-HT_{1A} receptor in schizophrenia: a promising target for novel atypical neuroleptics? *Journal of Psychopharmacology* 15, 37–46.

Battaglia G, Norman AB, Creese I (1987). Differential serotonin2 receptor recovery in mature and senescent rat brain after irreversible receptor modification: effect of chronic reserpine treatment. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 243, 69–75.

Bonaccorso S, Meltzer HY, Li Z, Dai J, et al. (2002). SR46349-B, a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist, potentiates haloperidol-induced dopamine release in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology* 27, 430–441.

Bortolozzi A, Amargós-Bosch M, Adell A, Díaz-Mataix L, et al. (2003). *In vivo* modulation of 5-hydroxytryptamine release in mouse prefrontal cortex by local 5-HT_{2A} receptors: effect of antipsychotic drugs. *European Journal of Neuroscience* 18, 1235–1246.

Bortolozzi A, Díaz-Mataix L, Cortés R, Scorza C, et al. (2007a). Clozapine increases dopamine output in medial prefrontal cortex by a 5-HT_{2A} receptor-independent mechanism. *Society for Neuroscience*, Abstract 499.12.

Bortolozzi A, Díaz-Mataix L, Scorza MC, Celada P, et al. (2005). The activation of 5-HT_{2A} receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. *Journal of Neurochemistry* 95, 1597–1607.

Bortolozzi A, Díaz-Mataix L, Toth M, Celada P, et al. (2007b). *In vivo* actions of aripiprazole on serotonergic and dopaminergic systems in rodent brain. *Psychopharmacology (Berlin)* 191, 745–758.

- Braff DL** (1993). Information processing and attention dysfunctions in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* **19**, 233–259.
- Bubenikova-Valesova V, Stuchlik A, Svoboda J, Bures J, et al.** (2008). Risperidone and ritanserin but not haloperidol block effect of dizocilpine on the active allothetic place avoidance task. *Proceedings of National Academic of Sciences USA* **105**, 1061–1066.
- Bymaster FP, Calligaro DO, Falcone JF, Marsh RD, et al.** (1996). Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacology* **14**, 87–96.
- Carr DB, Sesack SR** (2000). Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *Journal of Neuroscience* **20**, 3864–3873.
- Chemel BR, Roth BL, Armbruster B, Watts VJ, et al.** (2006). WAY-100635 is a potent dopamine D4 receptor agonist. *Psychopharmacology (Berlin)* **188**, 244–251.
- Chou YH, Halldin C, Farde L** (2003). Occupancy of 5-HT_{1A} receptors by clozapine in the primate brain: a PET study. *Psychopharmacology (Berlin)* **166**, 234–240.
- Chung YC, Li Z, Dai J, Meltzer HY, et al.** (2004). Clozapine increases both acetylcholine and dopamine release in rat ventral hippocampus: role of 5-HT_{1A} receptor agonism. *Brain Research* **1023**, 54–63.
- Cox RF, Waszczak BL** (1993). Inhibition of substantia nigra dopamine cell firing by R(-)-N-n-propylnorapomorphine: electrophysiological and autoradiographic studies after regional inactivation of dopamine receptors by microinjection of N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline. *Brain Research* **613**, 32–42.
- Díaz-Mataix L, Artigas F, Celada P** (2006). Activation of pyramidal cells in rat medial prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area by a 5-HT_{1A} receptor agonist. *European of Neuropsychopharmacology* **16**, 288–296.
- Díaz-Mataix L, Scorza MC, Bortolozzi A, Toth M, et al.** (2005). Involvement of 5-HT_{1A} receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action. *Journal of Neuroscience* **25**, 10831–10843.
- Elsworth JD, Jentsch JD, Morrow BA, Redmond Jr. DE, et al.** (2008). Clozapine normalizes prefrontal cortex dopamine transmission in monkeys subchronically exposed to phencyclidine. *Neuropsychopharmacology* **33**, 491–496.
- Elvevag B, Goldberg TE** (2000). Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Critical Reviews in Neurobiology* **14**, 1–21.
- Fiorica-Howells E, Hen R, Gingrich J, Li Z, et al.** (2002). 5-HT_{2A} receptors: location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT_{2A} knockout mice. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology* **282**, G877–993.
- Franklin KBJ, Paxinos G** (1997). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego, USA: Academic Press.
- Gessa GL, Devoto P, Diana M, Flore G, et al.** (2000). Dissociation of haloperidol, clozapine, and olanzapine effects on electrical activity of mesocortical dopamine neurons and dopamine release in the prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* **22**, 642–649.
- Gobert A, Millan MJ** (1999). Serotonin (5-HT)_{2A} receptor activation enhances dialysate levels of dopamine and noradrenaline, but not 5-HT, in the frontal cortex of freely-moving rats. *Neuropharmacology* **38**, 315–317.
- Gozlan H, Laporte AM, Thibault S, Schechter LE, et al.** (1994). Differential effects of N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-12-dihydroquinoline (EEDQ) on various 5-HT receptor binding sites in the rat brain. *Neuropharmacology* **33**, 423–431.
- Grayson B, Idris NE, Neill JC** (2007). Atypical antipsychotics attenuate a sub-chronic PCP-induced cognitive deficit in the novel object recognition task in the rat. *Behavioural Brain Research* **184**, 31–38.
- Green MF, Kern RS, Braff DL, Mintz J** (2000). Neurocognitive deficits and functional outcome in schizophrenia: are we measuring the ‘right stuff’? *Schizophrenia Bulletin* **26**, 119–136.
- Harvey PD, Sacchetti E, Galluzzo A, Romeo F, et al.** (2008). A randomized double-blind comparison of ziprasidone vs. clozapine for cognition in patients with schizophrenia selected for resistance or intolerance to previous treatment. *Schizophrenia Research* **105**, 138–143.
- Hemsley KM, Crocker AD** (2001). Changes in muscle tone are regulated by D1 and D2 dopamine receptors in the ventral striatum and D1 receptors in the substantia nigra. *Neuropsychopharmacology* **25**, 514–526.
- Homayoun H, Moghaddam B** (2007). Fine-tuning of awake prefrontal cortex neurons by clozapine: comparison with haloperidol and N-desmethylclozapine. *Biological Psychiatry* **61**, 679–687.
- Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, O’Laughlin IA, et al.** (2001). 5-HT_{2A} and D2 receptor blockade increases cortical DA release via of 5-HT_{1A} receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. *Journal of Neurochemistry* **76**, 1521–1531.
- Kargieman L, Santana N, Mengod G, Celada P, et al.** (2007). Antipsychotic drugs reverse the disruption in prefrontal cortex function produced by NMDA receptor blockade with phencyclidine. *Proceeding of National Academic of Science USA* **104**, 14843–14848.
- Keck BJ, Lakoski JM** (2000). Regional heterogeneity of serotonin(1A) receptor inactivation and turnover in the aging female rat brain following EEDQ. *Neuropharmacology* **39**, 1237–1246.
- Kuroki T, Meltzer HY, Ichikawa J** (1999). Effects of antipsychotic drugs on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **288**, 774–781.
- Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, et al.** (2009). Second-generation versus first generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet* **373**, 31–41.

- Lewis DA, Lieberman JA (2000). Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28, 325–334.
- Li Z, Prus AJ, Dai J, Meltzer HY (2009). Differential effects of M1 and 5-HT_{1A} receptors on atypical antipsychotics drug-induced dopamine efflux in the medial prefrontal cortex. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 330, 948–955.
- Liégeois JF, Ichikawa J, Meltzer HY (2002). 5-HT_{2A} receptor antagonism potentiates haloperidol-induced dopamine release in rat medial prefrontal cortex and inhibits that in the nucleus accumbens in a dose-dependent manner. *Brain Research* 947, 157–165.
- López-Giménez JF, Mengod G, Palacios JM, Vilaró MT (1997). Selective visualization of rat brain 5-HT_{2A} receptors by autoradiography with [³H]MDL 100,907. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 356, 446–454.
- López-Giménez JF, Tecott LH, Palacios JM, Mengod G, et al. (2002). Serotonin 5-HT_{2C} receptor knockout mice: autoradiographic analysis of multiple serotonin receptors. *Journal of Neuroscience Research* 67, 69–85.
- Martel JC, Leduc N, Ormière AM, Faucillon V, et al. (2007). WAY-100635 has high selectivity for serotonin 5-HT_{1A} versus dopamine D(4) receptors. *European Journal of Pharmacology* 574, 15–19.
- Martín-Ruiz R, Puig MV, Celada P, Shapiro DA, et al. (2001). Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate dependent mechanism. *Journal of Neuroscience* 21, 9856–9866.
- Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC (1989). Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D1, D2 and serotonin 2 pKi values. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 251, 238–246.
- Meltzer HY, Sumiyoshi T (2008). Does stimulation of 5-HT_{1A} receptors improve cognition in schizophrenia. *Behavioral Brain Research* 195, 98–102.
- Mengod G, Vilaró MT, Raurich A, López-Giménez JF, et al. (1996). 5-HT receptors in mammalian brain: receptor autoradiography and in situ hybridization studies of new ligands and newly identified receptors. *Histochemical Journal* 28, 747–758.
- Millan MJ (2000). Improving the treatment of schizophrenia: focus on serotonin 5-HT_{1A} receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295, 853–861.
- Minabe Y, Hashimoto K, Watanabe KI, Ashby Jr. CR (2001). Acute and repeated administration of the selective 5-HT_{2A} receptor antagonist M100907 significantly alters the activity of midbrain dopamine neurons: an in vivo electrophysiological study. *Synapse* 40, 102–112.
- Newman-Tancredi A, Gavaudan S, Conte C, Chaput C, et al. (1998). Agonist and antagonist actions of antipsychotic agents at 5-HT_{1A} receptors: a [³⁵S]GTPγS binding study. *European Journal of Pharmacology* 355, 245–256.
- Nyberg S, Dencker SJ, Malm U, Dahl ML, et al. (1998). D2 and 5-HT₂ receptor occupancy in high-dose neuroleptic-treated patients. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 1, 95–101.
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, et al. (1998). Increased anxiety of mice lacking the 5-HT_{1A} receptor. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 95, 10734–10739.
- Pazos A, Cortés R, Palacios JM (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Research* 346, 231–249.
- Paxinos G, Watson C (2005). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 5th edn. Sydney, Australia: Academic Press.
- Pehek EA, McFarlane HG, Maguschak K, Price B, et al. (2001). M100,907, a selective 5-HT_{2A} antagonist, attenuates dopamine release in the rat medial prefrontal cortex. *Brain Research* 888, 51–59.
- Popa D, Léna C, Fabre V, Prenat C, et al. (2005). Contribution of 5-HT₂ receptor subtypes to sleep-wakefulness and respiratory control, and functional adaptations in knock-out mice lacking 5-HT_{2A} receptors. *Journal of Neuroscience* 25, 11231–11238.
- Puig MV, Artigas F, Celada P (2005). Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA. *Cerebral Cortex* 15, 1–14.
- 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_{2A} receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cerebral Cortex* 13, 870–882.
- Rényi L, Evenden JL, Fowler CJ, Jeming E, et al. (2001). The pharmacological profile of (R)-3,4-dihydro-N-isopropyl-3-(N-isopropyl-N-propylamino)-2H-1-benzopyran arboxamide, a selective 5-hydroxytryptamine(1A) receptor agonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299, 883–893.
- Rollema H, Lu Y, Schmidt AW, Sprouse JS, et al. (2000). 5-HT_{1A} receptor activation contributes to ziprasidone-induced dopamine release in the rat prefrontal cortex. *Biological Psychiatry* 48, 229–237.
- Rollema H, Lu Y, Schmidt AW, Zorn SH (1997). Clozapine increases dopamine release in prefrontal cortex by 5-HT_{1A} receptor activation. *European Journal of Pharmacology* 338, R3–R5.
- Roth BL, Sheffler D, Potkin SG (2003). Atypical antipsychotic drug actions: unitary or multiple mechanisms for 'atypicality'? *Clinical Neuroscience Research* 3, 108–117.
- Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, et al. (2004). Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cerebral Cortex* 14, 1100–1109.
- Schwieler L, Erhardt S (2003). Inhibitory action of clozapine on rat ventral tegmental area dopamine neurons following increased levels of endogenous kynurenic acid. *Neuropsychopharmacology* 28, 1770–1777.
- Stockmeier CA, DiCarlo JJ, Zhang Y, Thompson P, et al. (1993). Characterization of typical and atypical antipsychotic drugs based on in vivo occupancy of

- serotonin₂ and dopamine₂ receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **266**, 1374–1384.
- Sumiyoshi C, Sumiyoshi T, Roy A, Jayathilake K, et al.** (2006). Atypical antipsychotic drugs and organization of long-term semantic memory: multidimensional scaling and cluster analyses of category fluency performance in schizophrenia. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **9**, 677–683.
- Sumiyoshi T, Matsui M, Nohara S, Yamashita I, et al.** (2001a). Enhancement of cognitive performance in schizophrenia by addition of tandospirone to neuroleptic treatment. *American Journal of Psychiatry* **158**, 1722–1725.
- Sumiyoshi T, Matsui M, Yamashita I, Nohara S, et al.** (2001b). The effect of tandospirone, a serotonin_{1A} agonist, on memory function in schizophrenia. *Biological Psychiatry* **49**, 861–868.
- Yasuno F, Suhara T, Nakayama T, Ichimiya T, et al.** (2003). Inhibitory effect of hippocampal 5-HT_{1A} receptors on human explicit memory. *American Journal of Psychiatry* **160**, 334–340.
- Youngren KD, Inglis FM, Pivrotto PJ, Jedema HP, et al.** (1999). Clozapine preferentially increases dopamine release in the rhesus monkey prefrontal cortex compared with the caudate nucleus. *Neuropsychopharmacology* **20**, 403–412.
- Vázquez-Borsetti P, Cortés R, Artigas F** (2009). Pyramidal neurons in rat prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area and dorsal raphe nucleus express 5-HT_{2A} receptors. *Cerebral Cortex* **19**, 1678–1686.
- Vijayraghavan S, Wang M, Birnbaum SG, Williams GV, et al.** (2007). Inverted-U dopamine D1 receptor actions on prefrontal neurons engaged in working memory. *Nature Neuroscience* **10**, 376–384.
- Weickert TW, Goldberg TE, Gold JM, Bigelow LB, et al.** (2000). Cognitive impairments in patients with schizophrenia displaying preserved and compromised intellect. *Archives of General Psychiatry* **57**, 907–913.
- Williams GV, Goldman-Rakic PS** (1995). Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* **376**, 572–575.
- Woodward ND, Purdon SE, Meltzer HY, Zai DH** (2005). A meta-analysis of neuropsychological change to clozapine, olanzapine, quetiapine, and risperidone in schizophrenia. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **8**, 457–472.

2. **Treball 2:**

Selective enhancement of mesocortical dopaminergic transmission by noradrenergic drugs: Therapeutic opportunities in schizophrenia.

M. Masana, A. Bortolozzi, F. Artigas.

International Journal of Neuropsychopharmacology 14(1): 53-68 (2011)

La capacitat dels fàrmacs antipsicòtics atípics vs els clàssics d'augmentar la funció dopaminèrgica (DA) mesocortical sembla ser la responsable de la millor eficàcia d'aquests en el tractament dels dèficits cognitius i els símptomes negatius en esquizofrènia. Donat que la transmissió noradrenèrgica (NE) contribueix a l'alliberament de DA cortical, hem estudiat com fàrmacs que actuen sobre dianes NE poden modular l'alliberament de DA a l'escorça prefrontal medial (EPFm) i el nucli accumbens (NAc) utilitzant microdialisis *in vivo*, amb l'objectiu d'augmentar selectivament la DA mesocortical.

L'administració local de GBR 12909 (inhibidor selectiu del transportador de DA, DAT), va augmentar l'alliberació de DA en major proporció en el NAc que en l'EPFm, mentre que la reboxetina (inhibidor selectiu del transportador de NE, NET) mostra un perfil regional oposat. Els nivells de DA van augmentar de forma comparable en ambdues regions després de l'administració local de nomifensina (inhibidor del DAT i el NET), però aquest efecte és menor en l'EPFm de rates amb el sistema NE lesionat amb DSP-4, i en el NAc de rates amb l'àrea tegmental ventral lesionada amb 6-OHDA. A més, l'estimulació elèctrica del *locus coeruleus* va augmentar preferentment els nivells de DA a l'EPFm. De forma consistent, l'administració de reboxetina conjuntament amb RX 821002 (un antagonista del receptor α_2 adrenèrgic) va augmentar dramàticament l'alliberació de DA a EPFm, però no en el NAc. Aquest efecte també es produeix quan la reboxetina més l'RX 821002 són coadministrats amb haloperidol o clozapina.

Així doncs, la contribució preferent del sistema NE a la DA prefrontal permet un augment selectiu de la transmissió DA mitjançant el bloqueig simultani del NET i dels receptors α_2 adrenèrgics, evitant així la retroalimentació negativa produïda pels autoreceptors sobre l'activitat NE. Els nostres resultats ressalten la

importància del NET i dels receptors α_2 adrenèrgics com a dianes terapèutiques per tractar els símptomes cognitius i negatius en esquizofrènia i altres malalties psiquiàtriques relacionades.

Selective enhancement of mesocortical dopaminergic transmission by noradrenergic drugs: therapeutic opportunities in schizophrenia

Mercè Masana^{1,2}, Analía Bortolozzi^{1,2} and Francesc Artigas^{1,2}

¹ Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, IIBB – CSIC (IDIBAPS), Spain

² CIBERSAM, Barcelona, Spain

Abstract

The superior efficacy of atypical *vs.* classical antipsychotic drugs to treat negative symptoms and cognitive deficits in schizophrenia appears related to their ability to enhance mesocortical dopamine (DA) function. Given that noradrenergic (NE) transmission contributes to cortical DA output, we assessed the ability of NE-targeting drugs to modulate DA release in medial prefrontal cortex (mPFC) and nucleus accumbens (NAc), with the aim of selectively increasing mesocortical DA. Extracellular DA was measured using brain microdialysis in rat mPFC and NAc after local/systemic drug administration, electrical stimulation and selective brain lesions. Local GBR12909 [a selective DA transporter (DAT) inhibitor] administration increased DA output more in NAc than in mPFC whereas reboxetine [a selective NE transporter (NET) inhibitor] had an opposite regional profile. DA levels increased comparably in both regions of control rats after local nomifensine (DAT+NET inhibitor) infusion, but this effect was much lower in PFC of NE-lesioned rats (DSP-4) and in NAc of 6-OHDA-lesioned rats. Electrical stimulation of the locus coeruleus preferentially enhanced DA output in mPFC. Consistently, the administration of reboxetine+RX821002 (an α_2 -adrenoceptor antagonist) dramatically enhanced DA output in mPFC (but not NAc). This effect also occurred when reboxetine+RX821002 were co-administered with haloperidol or clozapine. The preferential contribution of the NE system to PFC DA allows selective enhancement of DA transmission by simultaneously blocking NET and α_2 -adrenoceptors, thus preventing the autoreceptor-mediated negative feedback on NE activity. Our results highlight the importance of NET and α_2 -adrenoceptors as targets for treating negative/cognitive symptoms in schizophrenia and related psychiatric disorders.

Received 19 April 2010; Reviewed 1 June 2010; Revised 1 July 2010; Accepted 6 July 2010;

First published online 12 August 2010

Key words: Antipsychotics, dopamine, noradrenaline, nucleus accumbens, prefrontal cortex.

Introduction

Mesocortical and mesolimbic dopamine (DA) systems play a crucial role in many psychiatric disorders including schizophrenia (Carlsson, 1978). A general enhancement of brain dopaminergic neurotransmission in schizophrenia was suggested by pharmacological evidence (Creese *et al.* 1976; Seeman & Lee, 1975). However, current views indicate a hyperactivity of

subcortical DA transmission together with a hypoactive mesocortical system (Abi-Dargham *et al.* 2000; Akil *et al.* 1999; Laruelle *et al.* 1996; Lewis & Lieberman, 2000; Weinberger *et al.* 1988).

The overall efficacy of classical (DA D₂ receptor antagonists) and atypical antipsychotics (APDs, preferential 5-HT_{2A/2C} *vs.* DA D₂ receptor antagonists) to treat positive symptoms is similar (Lieberman *et al.* 2005). In contrast, some APDs, and particularly clozapine, are superior to classical APDs for the treatment of negative symptoms and cognitive impairment (Kane *et al.* 1988; Keefe *et al.* 2006; Leucht *et al.* 2009; Meltzer & McGurk, 1999). This clinical feature has been related to the ability of atypical (but not classical)

Address for correspondence: Professor F. Artigas, Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, IIBB-CSIC (IDIBAPS), C/Roselló, 161, 6th floor, 08036 Barcelona, Spain.
Tel.: +3493-3638315 Fax: +3493-363 8301
Email: fapncj@iibb.csic.es

ARTICLE

THEMATIC SECTION
New Developments in
Schizophrenia Research



APDs to increase DA release in the mesocortical pathway (Diaz-Mataix *et al.* 2005; Ichikawa *et al.* 2001; Kuroki *et al.* 1999; Rollema *et al.* 1997; Westerink *et al.* 2001). Indeed, an optimal prefrontal DA function is crucial for working memory and executive functions (Castner *et al.* 2000; Floresco & Magyar, 2006; Goldman-Rakic *et al.* 2000; Robbins & Arnsten, 2009; Vijayraghavan *et al.* 2007; Williams & Goldman-Rakic, 1995).

A key step determining the intensity and duration of synaptic DA signalling is the reuptake of the released transmitter into nerve terminals through high-affinity plasma membrane transporters. Previous studies indicate a lower density of DA transporter (DAT) in PFC compared to striatum (Letchworth *et al.* 2000; Marshall *et al.* 1990; Sesack *et al.* 1998). Conversely, the PFC contains a higher density of noradrenaline (NE) transporter (NET) (Miner *et al.* 2003; Schroeter *et al.* 2000) compared to NAc. In fact, NE axons may contribute to the removal of DA from the extracellular brain space, since NET shows a similar affinity for NE and DA (Raiteri *et al.* 1977). NET inhibitors seem to preferentially increase the extracellular DA concentration in the medial prefrontal cortex (mPFC) compared to caudate or nucleus accumbens (NAc) (Carboni *et al.* 1990, 2006; Mazei *et al.* 2002; Pozzi *et al.* 1994). Furthermore, NE axons from locus coeruleus (LC) neurons may contribute to regulate extracellular DA concentration in PFC by either taking up or co-releasing DA (Devoto *et al.* 2001, 2005; Devoto & Flore, 2006; Kawahara *et al.* 2001). However, a systematic comparison of these factors in the mesocortical and mesolimbic pathways is lacking.

Here we evaluated simultaneously the contribution of noradrenergic transmission to DA reuptake and release in both mesocortical and mesolimbic pathways. As a result, we report on a marked and selective enhancement of mesocortical DA transmission by combining the NET inhibitor reboxetine and the α_2 -adrenoceptor antagonist RX821002.

Materials and methods

Animals

Male Wistar rats (250–320 g, Iffa-Credo, France) were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on 07:00 hours), room temperature 22 ± 2 °C, with food and water available *ad libitum*. Animal care followed European Union regulations (O. J. of E. C. L358/1 18/12/1986) and was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the School of Medicine, University of Barcelona.

Drugs and reagents

Desipramine hydrochloride, GBR12909 dihydrochloride, haloperidol, nomifensine maleate, *N*-(2-chloroethyl)-*N*-ethyl-2-bromobenzylamine hydrochloride (DSP-4), 6-hydroxydopamine hydrochloride (6-OHDA) and RXS21002 hydrochloride were purchased from Sigma (Spain). Clozapine, fluoxetine hydrochloride and reboxetine mesylate were obtained from Tocris (UK). Drugs were dissolved in artificial cerebrospinal fluid [aCSF (mm): NaCl, 125; KCl, 2.5; CaCl₂, 2.52; MgCl₂, 1.18] and distilled water for local and systemic administration (pH adjusted to 6–7), respectively. Clozapine was dissolved in few drops of glacial acetic acid and diluted with saline. DSP-4, 6-OHDA and GBR12909 solutions were prepared prior to use. 6-OHDA was dissolved in water containing 0.1% ascorbic acid. All reagents used were of analytical grade and obtained from Merck (Germany).

Microdialysis procedures

Microdialysis experiments were conducted as previously described (Bortolozzi *et al.* 2005; Diaz-Mataix *et al.* 2005). Briefly, concentric dialysis probes were implanted under pentobarbital anaesthesia (60 mg/kg *i.p.*) at the following brain coordinates (in mm): mPFC, AP +3.2, L –0.8, DV –6.0, 4-mm membrane length; or NAc, AP +1.6, L –1.1, DV –8.0, 1.5-mm membrane length (Paxinos & Watson, 1998). The probe in NAc samples included core and shell subdivisions (Fig. 1b). Groups of rats were implanted with two probes ipsilaterally in mPFC (as above) and NAc (AP +1.6, L –3.9, DV –7.5, with a lateral 20° angle). Experiments were performed in freely moving rats ~20 h after surgery except those involving the electrical stimulation of LC (see below). Probes were perfused with aCSF pumped at 1.5 μ l/min. After an initial 30-min stabilization period, four baseline samples were collected (20 min/fraction) before local or systemic drug administration. Control groups were perfused with aCSF or injected with vehicle.

To examine the effects of electrical stimulation of LC on DA release, a stimulating electrode was implanted in LC at AP –2.0 (from lambda; nose down 15° from horizontal plane), L –1.2, DV –7.2 (Mateo *et al.* 1998). The bipolar stimulating electrode consisted of two stainless-steel enamel-coated wires (California Fine Wire, USA) with a diameter of 150 μ m and *in-vitro* impedances of 10–30 k Ω . Additionally, two dialysis probes were implanted in mPFC and NAc (as above). On the following day, rats were anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg *i.p.*) followed by supplementary doses of 50–70 mg/kg.h *i.p.*). Ten-min

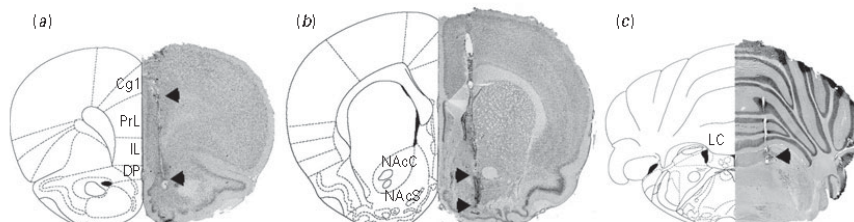


Fig. 1. Representative histological sections cut in the coronal plane at 40 μm showing the tract of a dialysis probe located within (a) mPFC, (b) NAc and (c) stimulating electrode in locus coeruleus (LC) of the rat. Black arrows indicate the length of microdialysis probes (4 and 1.5 mm for mPFC and NAc, respectively) and the tip of the electrode in LC. Adapted from Paxinos & Watson (1998). Cg1, cingulate area 1; PrL, prelimbic cortex; IL, infralimbic cortex; DP, dorsal peduncular cortex; NAcC, nucleus accumbens core; NAcS, nucleus accumbens shell.

dialysate fractions were collected (flow rate 3.0 $\mu\text{l}/\text{min}$) and body temperature was maintained at 37 $^{\circ}\text{C}$ with a heating pad. LC was phasically stimulated for 20 min after four basal fractions: 0.1-ms pulses delivered at 20 Hz for 250 ms every 1 s (average frequency 5 Hz) at 0.7 mA for 20 min using a Grass stimulation unit S-48 (Devoto *et al.* 2005; Florin-Lechner *et al.* 1996).

Brain dialysate fractions were collected on microvials containing 5 μl of 10 mM HClO_4 and rapidly injected into the HPLC equipment as described previously (Diaz-Mataix *et al.* 2005). DA was detected amperometrically (+0.7 V) (Hewlett-Packard 1049, USA) with a limit of detection of 2–3 fmol/sample. At the end of the experiments, animals were killed by an anaesthetic overdose. Brains were quickly removed and frozen on dry ice before sectioning (40 μm) with a cryostat (HM500-Om Microm, Germany). Coronal brain sections were stained with Neutral Red to verify the correct placement of probes and electrodes (Fig. 1).

Brain lesions

To examine the relative contribution of noradrenergic and dopaminergic systems to the release of DA in mPFC and NAc, we performed specific lesions: (a) treatment with the NE neurotoxin DSP-4, and (b) lesion of ventral tegmental area (VTA) DA system with 6-OHDA. To lesion NE neurons, DSP-4 (40 mg/kg i.p.) was administered 60 min after the injection of fluoxetine (10 mg/kg i.p.) and GBR12909 (20 mg/kg s.c.), to protect serotonin (5-HT) and DA neurons, respectively (Bortolozzi & Artigas, 2003; Dailly *et al.* 2006; Fritschy & Grzanna, 1989). Microdialysis experiments were performed 5 d after DSP-4 administration in awake rats implanted with a single probe in mPFC or NAc.

For 6-OHDA lesions, rats were pre-treated 60 min before with fluoxetine (10 mg/kg i.p.) and desipramine

(25 mg/kg s.c.) to protect 5-HT and NE neurons, respectively (Robinson & Whishaw, 1988; Tseng *et al.* 2005). Rats were unilaterally injected with 6-OHDA (total dose 8 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$) in two locations within the VTA [AP -5.2, L -2.2 (10°), DV-7.8; AP-5.8, L -1.9 (10°), DV-7.7]. The injection rate was 1 $\mu\text{l}/\text{min}$, followed by a 3-min pause before slowly withdrawing the infusion cannula. Microdialysis experiments were performed 8 d later in rats implanted with two microdialysis probes, one in mPFC (or NAc) ipsilateral to the lesioned VTA and the other one in the contralateral mPFC (or NAc), used as a control [mPFC: AP +3.2, L \pm 1.5 (10°), DV -5.7; NAc: AP +1.6, L \pm 3.9 (20°), DV -7.5].

The efficacy of DSP-4 and 6-OHDA to lesion NE and DA systems, respectively, was assessed by analysis of NE and DA in brain tissue by HPLC-ED (Adell *et al.* 1989; Bortolozzi & Artigas, 2003). The effect of lesions was examined in brain areas containing a substantial innervation of NE (PFC, for DSP-4 lesion) and DA (NAc, for 6-OHDA lesion). At the end of the microdialysis experiments, rats were killed and their brains were quickly removed and placed over a cold plate. In these animals, probe location was assessed by visual inspection with a low power magnification microscope. Brains were sectioned at 1-mm-wide coronal sections and PFC (for DSP-4 lesion) and NAc (for 6-OHDA lesion) were carefully dissected out. Only rats with more than 90% depletions in NE (DSP-4) or DA (6-OHDA) were included.

Statistical analysis

Microdialysis results are expressed as fmol/30- μl fraction and shown as percentages of baseline. Area under the curve (AUC) of selected time-periods was also used. Statistical analysis was performed using one- or two-way ANOVA of AUC or

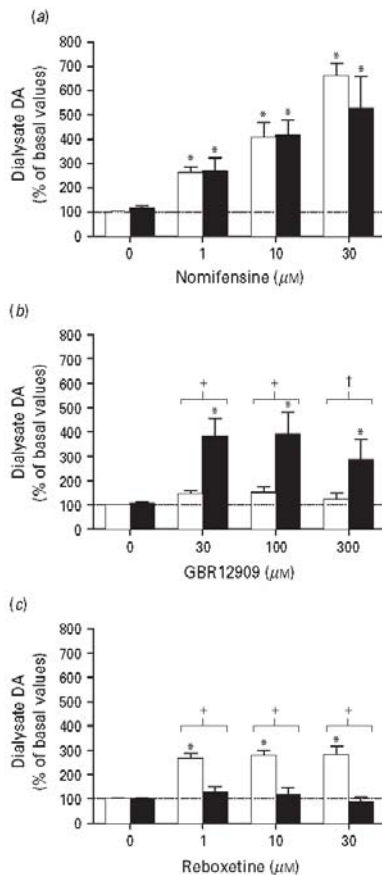


Fig. 2. Local effect of catecholamine transporter inhibitors on DA release in mPFC (□) and NAc (■) of freely moving rats. The application of artificial CSF did not alter DA levels in any area. (a) Nomifensine (DAT+NET inhibitor), perfused at 1, 10 and 30 μM (12 fractions each), showed a marked dose effect without regional differences at any concentration. (b) GBR12909 (a selective DAT inhibitor) was perfused at increasing concentrations (30, 100 and 300 μM , five fractions each) and produced a significant increase of DA levels in NAc, but not in mPFC. (c) Reboxetine (a selective NET inhibitor) was perfused at increasing concentrations (1, 10 and 30 μM , four fractions each) and increased DA output in mPFC, but not in NAc. Bars show the AUC calculated by averaging DA percentage of baseline values in fractions 6–16 for nomifensine, and three DA values for each concentration for GBR12909 and reboxetine. Data are expressed as mean \pm s.e.m., $n=4-7$ rats/group, except for 1 μM nomifensine in NAc ($n=3$). * $p < 0.05$ vs. respective control (0 μM), † $p < 0.01$ for mPFC vs. NAc and † $p = 0.05$. See text for detailed statistical analysis.

DA values (repeated measures) followed by Newman-Keuls *post-hoc* test. Basal DA dialysate levels and tissue monoamine contents were compared using Student's *t* test. Data are expressed as means \pm s.e.m. The significance level was set at $p < 0.05$.

Results

Local effect of DAT and NET inhibitors on DA output in mPFC and NAc

Perfusion of aCSF did not significantly alter DA output in mPFC and NAc of awake rats. The mean baseline concentrations of DA dialysate samples from mPFC and NAc (single probe experiments) were 19 ± 1 fmol/fraction ($n=33$) and 19 ± 3 fmol/fraction ($n=27$), respectively.

Local infusion of the DAT+NET inhibitor nomifensine (1, 10 and 30 μM) increased extracellular DA in both areas in a concentration-dependent manner (Fig. 2a). The maximal DA increase (AUC_{6-16}) was $660 \pm 52\%$ in mPFC and $527 \pm 130\%$ in NAc at 30 μM ($n=5$ each). Two-way ANOVA of AUCs revealed a significant effect of concentration ($F_{3,32}=27.13$, $p < 0.00001$) and non-significant effects of region and concentration \times region interaction. *Post-hoc* test (Newman-Keuls) revealed significant differences among all tested concentrations.

Unlike nomifensine, significant regional differences were found for the selective DAT (GBR12909) and NET (reboxetine) inhibitors after local administration. Local GBR12909 infusion markedly increased DA output in NAc and evoked a minor increase in mPFC (Fig. 2b). Mean DA elevations at 30, 100 and 300 μM , expressed as percentage of baseline, were respectively: (a) mPFC ($n=6$): 146 ± 11 , 150 ± 24 and 122 ± 28 and (b) NAc ($n=4$): 382 ± 75 , 390 ± 91 and 287 ± 80 . Two-way ANOVA of AUCs showed a significant effect of the drug concentration ($F_{3,32}=6.39$, $p < 0.01$), region ($F_{1,32}=27.92$, $p < 0.00001$) and concentration \times region interaction ($F_{3,32}=3.19$, $p < 0.05$). *Post-hoc* test (Newman-Keuls) revealed significant differences between NAc and mPFC at concentrations of 30 and 100 μM and a marginal difference ($p=0.052$) at 300 μM .

Local reboxetine application elevated extracellular DA in mPFC but not in NAc (Fig. 2c). Reboxetine effects at 1, 10 and 30 μM , expressed as percentage of baseline, were respectively: (a) mPFC ($n=6$): 267 ± 19 , 278 ± 21 , and 282 ± 33 and (b) NAc ($n=4$): 129 ± 21 , 117 ± 28 and 90 ± 19 . Two-way ANOVA showed a significant effect of concentration ($F_{3,32}=8.50$, $p < 0.001$), region ($F_{1,32}=60.07$, $p < 0.0001$) and concentration \times

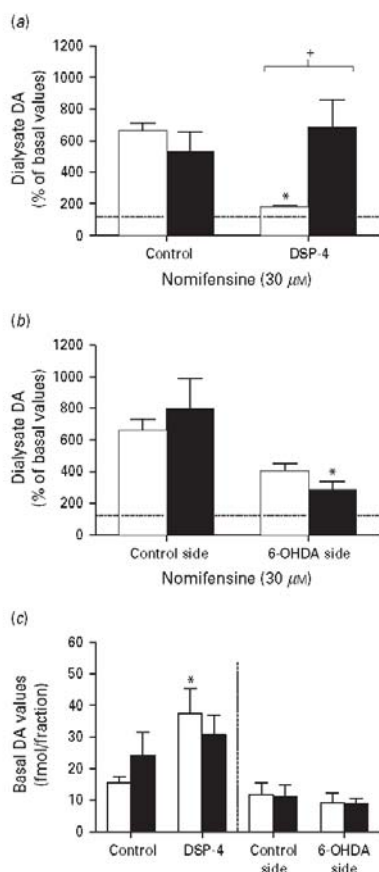


Fig. 3. Local effect of nomifensine 30 μM in mPFC (□) and NAc (■) of rats underlying specific lesions. (a) Noradrenergic lesion with DSP-4 (40 mg/kg i.p., 5 d before experiments) changed DA response to nomifensine in mPFC but not NAc, compared to control groups. (b) VTA was unilaterally lesioned with 6-OHDA (8 μg/1 μl, 8 d before experiments) and the contralateral mPFC and NAc were used as control. 6-OHDA lesion produced a significant change to nomifensine in NAc-lesioned (6-OHDA ipsilateral side) compared to control side. Bars show AUC values, averaged DA values in fractions 6–16, expressed as percentage of baseline. (c) Basal DA values (fmol/fraction) in the mPFC and NAc of control and lesioned rats (DSP-4 and 6-OHDA). Data are expressed as mean ± s.e.m., n = 5–6 per group. * $p < 0.05$ vs. respective control groups and + $p < 0.01$ for mPFC vs. NAc. See text for statistical analysis.

region interaction ($F_{3,32} = 7.19$, $p < 0.001$). *Post-hoc* test (Newman-Keuls) revealed significant differences between NAc and mPFC at all concentrations.

Effects of selective brain lesions on the modulation of DA output in mPFC and NAc induced by nomifensine

We further explored the effect of nomifensine in the mPFC and NAc of rats underlying specific lesions with (a) the NE neurotoxin DSP-4 and (b) unilateral lesion of VTA DA system with 6-OHDA, respectively.

Rats pretreated with DSP-4 showed a 90% depletion of tissue NE level (85 ± 8 vs. 894 ± 92 pmol/g of wet tissue in PFC, $p < 0.00001$) without a significant change in tissue DA in this area. DSP-4-lesioned rats had higher basal values (fmol/fraction) of dialysate DA in mPFC (37 ± 8 , $n = 6$) and NAc (31 ± 6 , $n = 6$), compared to their respective controls in mPFC (15 ± 2 , $n = 5$) and NAc (24 ± 7 , $n = 5$), yet only the DA increase in mPFC reached statistical significance ($p < 0.05$) (Fig. 3c).

Local infusion of nomifensine (30 μM) by reverse dialysis increased mPFC DA output in control rats to $660 \pm 52\%$ of baseline, but to a much lower extent ($180 \pm 11\%$ of baseline) in mPFC of DSP-4-pretreated rats (Fig. 3a). However, DSP-4 pretreatment did not alter the ability of nomifensine to increase extracellular DA in NAc (DA increase of $528 \pm 130\%$ and $682 \pm 176\%$ in control and DSP-4-pretreated rats, respectively). Two-way ANOVA revealed a significant effect of lesion × region interaction ($F_{1,18} = 7.48$, $p < 0.05$). *Post-hoc t* test revealed that the effect of nomifensine in mPFC of DSP-4-lesioned rats was significantly different to the other groups.

The unilateral dopaminergic VTA lesion by 6-OHDA was assessed in the same rats comparing lesion side (ipsilateral to 6-OHDA application) with control side (contralateral to 6-OHDA application). Tissue DA and NE levels were significantly decreased to 93% and 71%, respectively in NAc (492 ± 174 vs. 7226 ± 2272 pmol/g of DA in wet tissue and 298 ± 53 vs. 1019 ± 1173 pmol/g of NE in wet tissue, $p < 0.01$). Basal DA values (fmol/fraction) in the control and lesioned sides were: (a) control mPFC: 12 ± 4 , (b) lesioned mPFC: 9 ± 3 , (c) control NAc: 11 ± 4 and, (d) lesioned NAc: 9 ± 2 ($n = 5-6$). Non-significant differences of DA output were found between control and lesioned sides.

Simultaneous local nomifensine (30 μM) infusion by reverse dialysis in both control and lesioned mPFC increased DA output to $660 \pm 72\%$ (control mPFC) and $405 \pm 47\%$ (lesioned mPFC) of baseline (Fig. 3b). On the other hand, nomifensine (30 μM) perfusion enhanced DA output to $798 \pm 194\%$ of baseline in control NAc and to $284 \pm 69\%$ in lesioned NAc. Two-way ANOVA revealed a significant effect of lesion ($F_{1,18} = 11.03$, $p < 0.01$) and non-significant effects of region and lesion × region interaction. *Post-hoc* Newman-Keuls

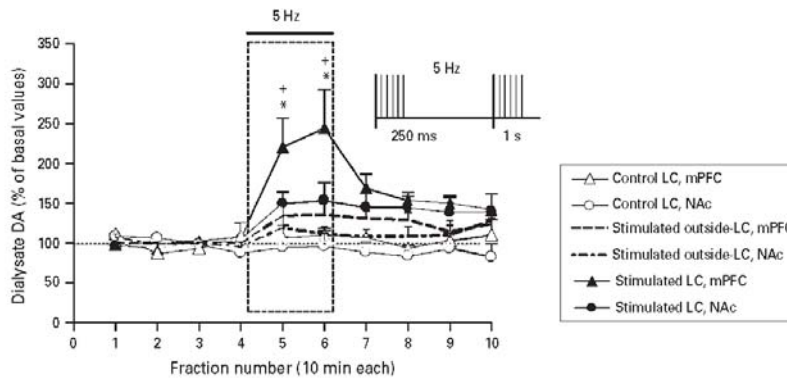


Fig. 4. Effect of electrical stimulation of LC on DA levels in mPFC and NAc of the same anaesthetized rats. LC stimulation increased DA release in mPFC to a larger extent than in NAc. Data are expressed as mean \pm s.e.m., $n=3$ for control; $n=5$ for stimulated. Inset: LC was stimulated after four basal fractions in phasic mode with 0.1-ms pulses delivered at 20 Hz for 250 ms every 1 s (average frequency of 5 Hz) and 0.7 mA for 20 min. See text for statistical analysis. * $p < 0.05$ vs. control (non-stimulated) and + $p < 0.05$ for mPFC vs. NAc. Dotted lines show the effect on extracellular DA of rats with stimulating electrodes implanted outside the LC.

test indicated that only DA values in lesioned NAc were statistically different from control NAc.

Electrical stimulation of LC differentially increases DA output in mPFC and NAc

We then assessed the effect of electrical stimulation of LC on DA output in mPFC and NAc of the same rats. Mean DA basal values (fmol/10-min fraction) were 15 ± 3 ($n=18$) and 17 ± 3 ($n=17$) in mPFC and NAc, respectively.

Burst LC stimulation ($n=5$) significantly elevated extracellular DA in mPFC and NAc compared to animals with misplaced electrodes, including pericoeruleus area ($n=9-10$) and sham control rats ($n=3$, no current was passed through the LC electrode) (Fig. 4). The DA output in mPFC showed a sharp rise during the stimulation period which declined rapidly. Maximal DA increase was $244 \pm 44\%$ of baseline. Two-way ANOVA revealed significant effects of the treatment ($F_{2,15} = 6.17$, $p < 0.05$), time ($F_{9,135} = 8.94$, $p < 0.0001$) and treatment \times time interaction ($F_{18,135} = 3.78$, $p < 0.0001$). Burst LC stimulation induced a modest and slow increase of DA release in NAc ($153 \pm 20\%$ of baseline). Two-way ANOVA indicated a significant effect of time ($F_{9,126} = 2.13$, $p < 0.05$) and treatment \times time interaction ($F_{18,126} = 1.89$, $p < 0.05$) and non-significant effects of stimulation and time. *Post-hoc* Newman-Keuls test indicated that DA output in mPFC during LC stimulation was significantly greater than in control rats.

Finally, two-way ANOVA of DA output of the stimulated groups revealed significant effects of time ($F_{9,72} = 11.67$, $p < 0.00001$) and time \times region interaction ($F_{9,72} = 2.39$, $p < 0.05$). *Post-hoc* Newman-Keuls test indicated that the DA output in the mPFC during LC stimulation was significantly greater than in NAc.

Selective enhancement of cortical DA output by noradrenergic drugs in APD pre-treated rats

Overall, the above results suggest that (1) the extracellular DA concentration is distinctly regulated in mPFC and NAc, and (2) NE terminals markedly contribute to the control of mPFC DA (but not of NAc DA) either by co-releasing DA and/or taking up DA via NET.

We next studied the feasibility of selectively increasing mesocortical DA transmission through NE-acting drugs. We conducted two sets of experiments in rats implanted with two microdialysis probes (mPFC and NAc). Baseline DA concentrations in mPFC and NAc (double-probe experiments) were 9 ± 1 fmol/fraction ($n=69$) and 9 ± 2 fmol/fraction ($n=62$), respectively.

In the first set of experiments, the selective NET inhibitor reboxetine ($30 \mu\text{M}$) was locally applied by reverse dialysis in mPFC and NAc followed by the systemic administration of the selective α_2 -adrenoceptor antagonist RX821002 (1 mg/kg s.c.) 2 h later, to dis-inhibit the autoreceptor-mediated negative feedback on NE neuron activity. Figure 5 shows the increase in

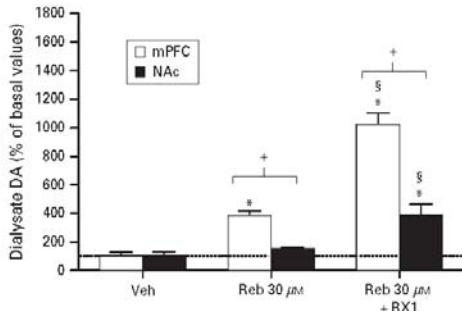


Fig. 5. Effect of the combination treatment with NE-targeting drugs [local reboxetine (Reb), 30 μ M and RX821002 (RX), 1 mg/kg s.c.] on DA release in mPFC and NAc. Reboxetine was locally applied by reverse dialysis at 30 μ M for the whole experiment (fractions 4–16) and RX was systemically administered 2 h after the beginning of reboxetine perfusion. Bars are AUC of four DA values for Reb and for Reb + RX. See text for statistical analysis. * $p < 0.01$ vs. control, § $p < 0.01$ vs. 30 μ M Reb and + $p < 0.01$ for mPFC vs. NAc.

extracellular DA (AUCs) obtained in mPFC and NAc during local reboxetine application plus its combination with RX821002. Two-way ANOVA revealed a significant effect of treatment ($F_{2,18} = 79.18$, $p < 0.0001$) and region ($F_{1,18} = 50.40$, $p < 0.0001$) as well as a significant treatment \times region interaction ($F_{2,18} = 20.74$, $p < 0.0001$).

In the second set of experiments, both drugs were given systemically (reboxetine, 3 mg/kg i.p.; RX821002, 1 mg/kg s.c.). The effect of the reboxetine + RX821002 combination was examined alone and in rats pretreated with APD drugs: haloperidol (classical, 0.1 mg/kg s.c.) and clozapine (APD, 3 mg/kg s.c.). The whole set of data are shown in Fig. 6 and were analysed using two-way ANOVA with treatment and time as main factors (main effects are shown in Table 1). The AUC data of relevant fractions (12–16) for each combination treatment were also calculated and analysed by two-way ANOVA with treatment and region as main factors (Fig. 7).

Vehicle + reboxetine + RX821002

Vehicle injections did not alter DA output in mPFC or NAc. The administration of either reboxetine or RX821002 alone moderately enhanced DA output, yet their combined administration dramatically increased DA levels in mPFC ($869 \pm 139\%$ of baseline, $n = 5$) but not in NAc ($188 \pm 33\%$, $n = 4$) (Fig. 6a,b; see Table 1 for detailed statistical analysis). *Post-hoc* *t* tests

(Newman–Keuls) revealed a significant difference of the reboxetine + RX821002 treatment vs. the rest of experimental groups in mPFC. No significant differences were found for DA values in NAc.

Two-way ANOVA of AUC data (Fig. 7a) revealed a significant effect of treatment ($F_{3,30} = 20.6$, $p < 0.00001$), region ($F_{1,30} = 21.0$, $p < 0.0001$) and region \times treatment interaction ($F_{3,30} = 14.9$, $p < 0.00001$).

Clozapine + reboxetine + RX821002

The systemic administration of clozapine elevated DA output to $241 \pm 27\%$ of baseline in mPFC ($n = 4$, data are AUC₆₋₁₆). In NAc, systemic clozapine administration did not significantly alter DA output ($99 \pm 13\%$, $n = 4$).

The combination of clozapine + reboxetine + RX821002 markedly increased DA output to $781 \pm 123\%$ of baseline in mPFC ($n = 6$). This effect was significantly greater than that of clozapine alone and that of clozapine + reboxetine (Newman–Keuls test post-ANOVA) (Fig. 6b, Table 1). In NAc, the administration of reboxetine + RX821002 increased the effect of clozapine to $335 \pm 127\%$ of baseline ($n = 5$) (Fig. 6d, Table 1). No significant differences between treatments were found in NAc.

When comparing AUC data within regions (Fig. 6b), two-way ANOVA revealed a significant effect of treatment ($F_{3,30} = 11.9$, $p < 0.0001$), region ($F_{1,30} = 10.5$, $p < 0.005$) and a marginal significance of region \times treatment interaction ($F_{3,30} = 2.5$, $p = 0.078$).

Haloperidol + reboxetine + RX821002

The systemic administration of haloperidol, given alone, did not alter the DA output in mPFC ($116 \pm 12\%$, $n = 9$, AUC₆₋₁₆), while in NAc it significantly increased DA levels to $162 \pm 20\%$ of baseline ($n = 7$).

The combination of haloperidol + reboxetine + RX821002 induced a large elevation of DA levels in mPFC to $1375 \pm 275\%$ of baseline ($n = 6$). This effect was significantly greater than that of haloperidol alone or that of the combined administration of reboxetine + RX821002 (*post-hoc* Newman–Keuls; Fig. 6e, Table 1). In NAc, the co-administration of haloperidol + reboxetine + RX821002 increased DA levels to $238 \pm 43\%$ of baseline ($n = 5$) (Fig. 6f, Table 1). No significant differences between treatments were found for DA values in this region.

Two-way ANOVA of AUC data (Fig. 7c) revealed a significant effect of treatment ($F_{3,30} = 18.2$, $p < 0.00001$), region ($F_{1,30} = 19.5$, $p < 0.0001$) and region \times treatment interaction ($F_{3,30} = 14.2$, $p < 0.00001$).

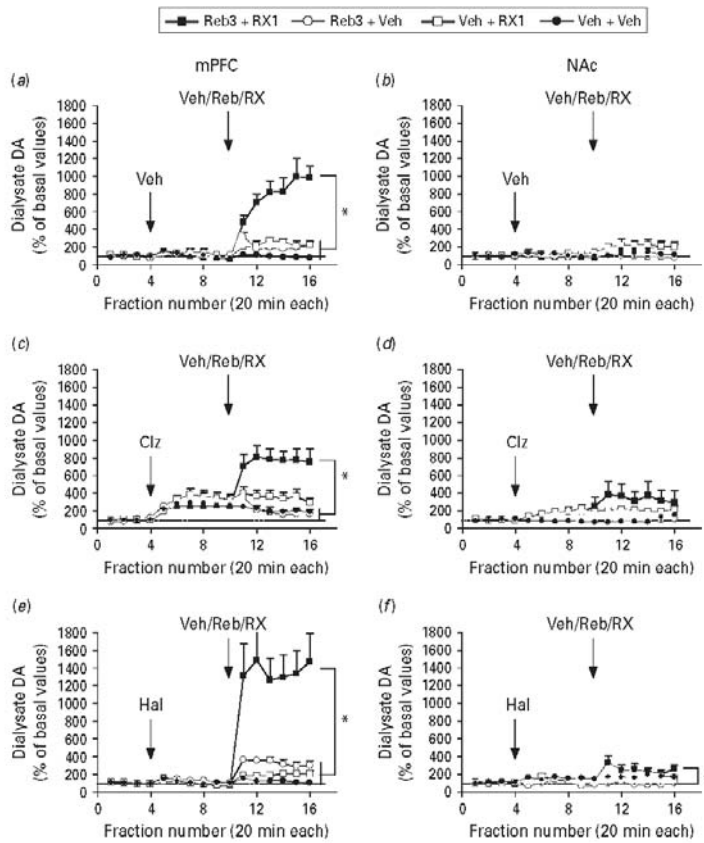


Fig. 6. Effect of the combination treatment with NE-targeting drugs [reboxetine (Reb), 3 mg/kg i.p.; and RX821002 (RX), 1 mg/kg s.c.] on DA release in rats pretreated with (a, b) vehicle (Veh), (c, d) clozapine (Clz 3 mg/kg s.c.) and (e, f) haloperidol (Hal 0.1 mg/kg s.c.). Control groups received vehicle injections ($n=4-6$; except for Veh/Veh + Veh, where $n=3$). Left (a, c, e) and right (b, d, f) panels correspond to the effects in mPFC and NAc, respectively. Data are expressed as mean \pm s.e.m. Statistical analyses shown in Table 2.

Discussion

The results of the present study confirm and extend previous observations on a differential regulation of DA release in mPFC and NAc. We systematically compared the effect of agents modulating extracellular DA in both pathways. The data support a significant contribution of noradrenergic neurotransmission to DA release in mPFC compared to NAc. The different mechanisms involved in the control of the active (extracellular) DA fraction in both areas offer new therapeutic opportunities to treat non-psychotic symptoms in schizophrenia, associated with a reduced

cortical dopaminergic function. Hence, we demonstrate that noradrenergic drugs dramatically and selectively enhance mesocortical DA, using a strategy previously shown to potentiate the effects of reuptake blockers on serotonergic (Artigas *et al.* 1996) and noradrenergic systems (Mateo *et al.* 1998).

Relative contribution of NE neurotransmission to DA output in mPFC and NAc

The effects of DAT and/or NET inhibitors agree with previous observations indicating that NET inhibitors increase extracellular NE and DA in PFC, but not in

Table 1. Statistical analyses of the combination treatment of NE-targeting drugs, reboxetine and RX821002, on dopamine release in vehicle, clozapine and haloperidol pre-treated rats

Treatment	mPFC			NAc		
	Effect	F	p	Effect	F	p
Vehicle						
Veh + Veh	93 ± 19 (6)			121 ± 9 (5)		
Reb + Veh	195 ± 38 (5)	$T_{3,16} = 19.0$	<0.0001	93 ± 12 (5)	$T_{3,14} = 3.1$	n.s.
Veh + RX	234 ± 42 (4)	$t_{15,240} = 33.6$	<0.00001	216 ± 61 (4)	$t_{15,210} = 6.3$	<0.00001
Reb + RX	869 ± 139* (6)	$T \times t_{45,240} = 19.0$	<0.00001	188 ± 33 (5)	$T \times t_{45,210} = 2.3$	<0.0001
Clozapine						
Veh + Veh	197 ± 30 (4)			110 ± 15 (4)		
Reb + Veh	180 ± 46 (4)	$T_{3,15} = 5.0$	<0.05	108 ± 21 (4)	$T_{3,15} = 2.2$	n.s.
Veh + RX	348 ± 67 (5)	$t_{15,225} = 24.2$	<0.00001	203 ± 23 (6)	$t_{15,225} = 4.3$	<0.00001
Reb + RX	781 ± 123+ (4)	$T \times t_{45,225} = 10.3$	<0.00001	335 ± 127 (4)	$T \times t_{45,225} = 2.2$	<0.001
Haloperidol						
Veh + Veh	120 ± 16 (6)			174 ± 23 (5)		
Reb + Veh	323 ± 40 (5)	$T_{3,22} = 18.8$	<0.0001	95 ± 7 (3)	$T_{3,17} = 2.7$	n.s.
Veh + RX	197 ± 18 (6)	$t_{15,330} = 29.2$	<0.00001	167 ± 22 (6)	$t_{15,225} = 5.9$	<0.00001
Reb + RX	1375 ± 275* (9)	$T \times t_{45,330} = 16.0$	<0.00001	238 ± 43 (7)	$T \times t_{45,225} = 1.7$	<0.01

Reb, Reboxetine; RX, RX821002; Veh, vehicle; n.s., not significant.

Data (effect) are given as percentage of baseline in each experimental group (AUC_{12-16}). Number of animals in each group is given in parentheses.

* Significantly different to all other treatments.

+ Significantly different to all treatments except for Veh + RX.

Data have been analysed using two-way ANOVA with treatment (T) and time (t) as main factors.

NAC or dorsal striatum (Bymaster *et al.* 2002; Carboni *et al.* 1990, 2006; Di Chiara *et al.* 1992; Mazei *et al.* 2002; Pozzi *et al.* 1994; Tanda *et al.* 1994). The local application of nomifensine, with similar affinity for DAT and NET (PDSP database: <http://pdsp.med.unc.edu/pdsp.php>; Bymaster *et al.* 2002), increased comparably dialysate DA in mPFC and NAc. However, GBR12909 preferentially increased DA in NAc, suggesting a poor contribution of DAT-containing fibres to extracellular DA in mPFC, a view consistent with the low density of DAT in PFC (Sesack *et al.* 1998) compared to NAc or dorsal striatum (Letchworth *et al.* 2000; Marshall *et al.* 1990). In contrast, mPFC contains a higher density of NET (Miner *et al.* 2003; Schroeter *et al.* 2000) than the NAc. Hence, the NAc core contains scarce NE fibres (Seguela *et al.* 1990) and those in NAc shell mainly arise from the nucleus tractus solitarius (Berridge *et al.* 1997; Delfs *et al.* 1998). This, together with the similar affinity of NE and DA for NET (Gu *et al.* 1994; Raiteri *et al.* 1977) may account for the effect of reboxetine, which increased DA output only in mPFC. Despite NE axons being infrequently apposed to DA axons in PFC

(Miner *et al.* 2003), newly released DA may diffuse trans-synaptically to reach NET sites, as observed for DA itself (Sesack *et al.* 1998) (see Fig. 8a).

Furthermore, DSP-4 (Fig. 3a) almost abolished the effect of nomifensine on DA output in mPFC, but not in NAc, further supporting a preferential contribution of NE fibres to mPFC DA release. We used standard lesion procedures to extensively damage DA and NE neurons/fibres. Thus, similarly to previous studies (Bortolozzi & Artigas, 2003; Fritschy & Grzanna, 1989; Robinson & Whishaw, 1988; Tseng *et al.* 2005) DSP-4 and 6-OHDA depleted tissue NE and DA concentrations by $\geq 90\%$, respectively. The clear-cut mPFC-NAc difference of DSP-4 on nomifensine's effect may reflect the aforementioned differences on NE axon densities innervating both brain structures and also their ability to release DA. Moreover, a preferential LC sensitivity to the DSP-4 lesion cannot be discounted (Dailly *et al.* 2006; Grzanna *et al.* 1989; Jonsson *et al.* 1981). A limitation of the present study is the lack of immunohistochemical or autoradiographic analysis of lesions, which, as in other studies (Grzanna *et al.* 1989;

62 M. Masana et al.

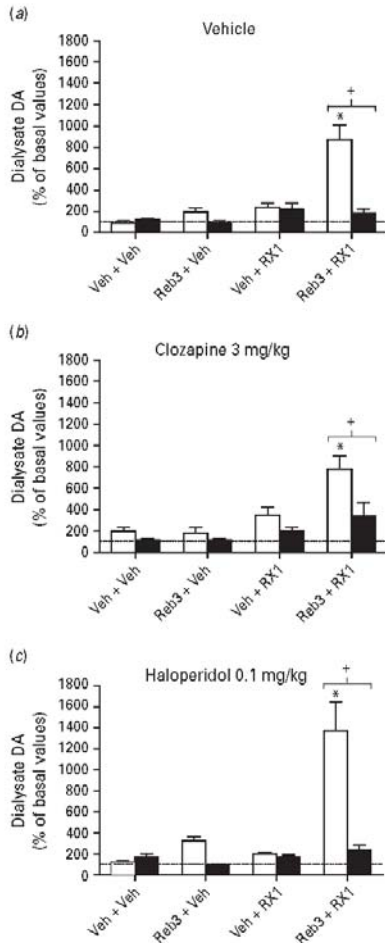


Fig. 7. Bars show the average effect of the combination treatment of reboxetine (Reb, 3 mg/kg i.p.) plus RX821002 (RX, 1 mg/kg s.c.) on DA release in mPFC (□) and NAc (■) of rats pre-treated with (a) vehicle, (b) clozapine (3 mg/kg s.c.) or (c) haloperidol (0.1 mg/kg s.c.), respectively. Data are AUC of fractions 12–16 (Fig. 5), expressed as percentage of baseline; $n = 4-6$, except for Veh/Veh + Veh, where $n = 3$. See text for statistical analysis. * $p < 0.001$ vs. control treatments and + $p < 0.01$ for mPFC vs. NAc.

Vos et al. 1999; Szot et al. 2010) would have permitted a detailed assessment of lesion effects on NE and DA axons.

Conversely, local nomifensine increased DA output less in NAc than in mPFC of the unilaterally

6-OHDA-lesioned rats (Fig. 3b), compared to the contralateral (unlesioned) side, respectively, suggesting that most DA output in NAc arises from VTA DA fibres. Even with the prior protection of NE fibres by desipramine prior to 6-OHDA application, a marked reduction of tissue NE was found in the ipsilateral NAc (71% for NE vs. 93% for DA), possibly due to toxin diffusion to the neighbouring median forebrain bundle. Previous studies have shown the inability of desipramine to fully protect NE axons from 6-OHDA lesions (Harden et al. 1998; King & Finlay, 1995).

Although DSP-4 and 6-OHDA markedly affected the nomifensine-induced rise in extracellular DA, baseline levels were almost unaltered, with the exception in mPFC of DSP-4 pretreated rats. This is consistent with previous literature indicating compensatory changes to maintain extracellular monoamine concentrations despite marked differences in tissue concentrations (Abercrombie & Zigmond, 1989; Robinson et al. 1994; Romero et al. 1998; Zigmond et al. 1990; see however Devoto et al. 2008).

The enhancement of DA output in mPFC (244% of baseline) after electrical stimulation of LC agrees with previous observations on a potential co-release of DA from LC NE fibres in PFC (Devoto et al. 2001, 2005; Devoto & Flore, 2006). Since rats in the present study were implanted with two probes (in mPFC and NAc), we were able to compare the effect of LC stimulation on DA output in mPFC and NAc of the same animals. LC stimulation also moderately increased (153% of baseline) the DA output in NAc although with a blunted time-course, an effect that may arise from α_1 -adrenergic stimulation of VTA DA neurons following LC stimulation (Grenhoff & Svensson, 1993). Further, α_1 -adrenoceptor blockade abolishes the behavioural effect produced by the stimulation of VTA DA neurons (Auclair et al. 2002, 2004; Darracq et al. 1998). Although an α_1 -adrenergic stimulation of mesocortical DA neurons cannot be excluded, the larger DA increase in mPFC, its temporal association with LC stimulation and the lack of effect when the stimulating electrodes were placed outside the LC supports a noradrenergic origin of the DA release in mPFC.

Thus, the present results suggest that the extracellular DA concentration in NAc mainly arise from VTA DA fibres whereas that in mPFC has a dual contribution, from the VTA and from LC NE fibres. Since DA is an intermediate metabolite in the synthesis of NE in noradrenergic neurons, the co-release of DA and NE may reflect a deficient activity of dopamine- β -hydroxylase in cortical noradrenergic axons, a possibility that deserves further investigation. This region-specific noradrenergic contribution to DA

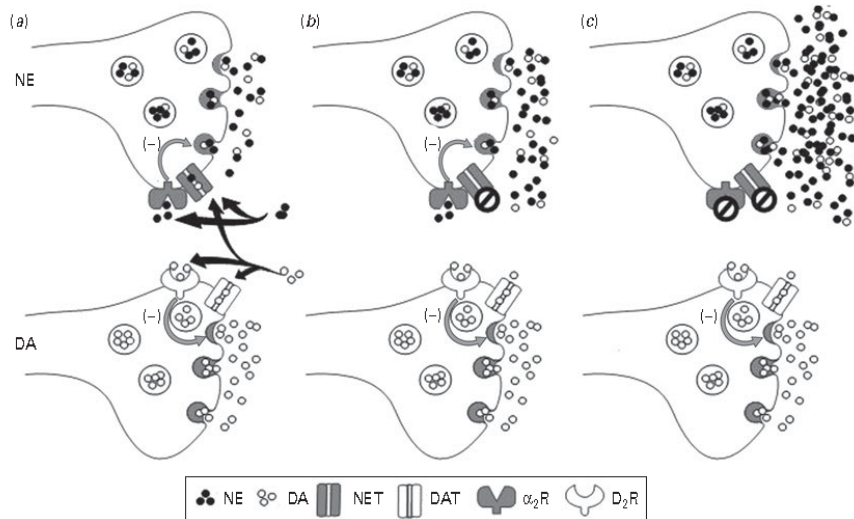


Fig. 8. Schematic representation of the contribution of NET inhibition (reboxetine) and α_2 -adrenoreceptor antagonism (RX821002) in NE terminals on the control of extracellular DA levels in mPFC. (a) In a physiological situation, DA can be co-released with NE by noradrenergic terminals and/or taken up by NET, given the similar affinity of the membrane transporters for both monoamines. (b) The moderate increase in extracellular DA levels in mPFC evoked by reboxetine probably results from two opposing factors, (i) an elevation resulting from NET blockade itself, and (ii) a reduction resulting from the activation of α_2 -adrenoreceptors. Activation of somatodendritic α_2 -adrenoreceptors in the LC (not shown in the figure) also contributes to attenuate catecholamine release through a reduction of the firing rate of noradrenergic neurons after systemic reboxetine administration. (c) The co-treatment with RX821002 removes the α_2 -adrenoreceptor-mediated negative feedback on noradrenergic release of catecholamines, and markedly potentiates the increase in extracellular DA evoked by reboxetine.

release allows the selective modulation of mesocortical DA function.

Selective enhancement of DA release in mPFC: association with APD treatments

Many studies implicate prefrontal catecholamine function in cognition (Arnsten & Li, 2005; Goldman-Rakic *et al.* 2000; Robbins & Roberts, 2007; Sara, 2009). The present and previous observations show striking similarities between the factors governing DA and NE release in mPFC. Current views indicate a hypoactive mesocortical DA pathway in schizophrenia that may underlie negative and/or cognitive symptoms and APDs increase mPFC DA output (see Introduction). This has been considered a useful pharmacological feature accounting for the clinical superiority of some APDs in non-psychotic symptoms (Kane *et al.* 1988; Keefe *et al.* 2006; Leucht *et al.* 2009; Meltzer & McGurk, 1999). Actually, blockade of DA D_2 receptors is effective in treating positive symptoms, possibly related to a subcortical DA hyperactivity (Laruelle *et al.* 1996), but not negative/cognitive symptoms. Conversely,

DA D_2 receptor blockade induces negative symptoms in healthy individuals (Artaloytia *et al.* 2006).

Previous reports indicate that reuptake blockade in serotonergic and noradrenergic neurons induces a very marked increase of the respective neurotransmitter in the vicinity of cell bodies in the raphe nuclei (Adell & Artigas, 1991; Bel & Artigas, 1992) and LC (Grandoso *et al.* 2004; Mateo *et al.* 1998). The excess neurotransmitter in this area activates their respective autoreceptors (5-HT_{1A} and α_2 -adrenoreceptors), which leads to a reduced neuronal activity and terminal monoamine release. Autoreceptor blockade enables the recovery of cell firing and terminal release, thus permitting the full pharmacological effect of reuptake blockade (Artigas *et al.* 1996; Grandoso *et al.* 2004; Invernizzi & Garattini, 2004; Mateo *et al.* 1998; Romero & Artigas, 1997). Given the marked involvement of noradrenergic fibres in the uptake/co-release of DA in mPFC, we used this strategy to selectively enhance cortical DA function (Fig. 8).

α_2 -adrenergic antagonists and NE reuptake inhibitors, acting mainly on NE neurons, increase moderately

but selectively prefrontal DA output (Devoto et al. 2004; Gresch et al. 1995; Hertel et al. 1999a, b; Linner et al. 2001; Millan et al. 2000; Swanson et al. 2006; Valentini et al. 2004; Wadenberg et al. 2007). However, our results show for the first time that α_2 -adrenoceptor blockade markedly potentiates the effect of NET inhibitors on DA output in mPFC (as also observed for cortical NE output; Swanson et al. 2006) but not in NAc (Figs 5–8).

The increase in cortical DA output also occurred when reboxetine + RX-821002 were administered in combination with classical (haloperidol – lacking appreciable affinity for α_2 -adrenoceptor) and APDs (clozapine – with antagonist properties at α_2 -adrenoceptors). These drug combinations did not elevate DA output in NAc or produce even a small effect compared to the marked elevation seen in mPFC. The doses used (3 mg/kg for clozapine, 0.1 mg/kg for haloperidol) are close to their ED₅₀ values for occupation of their primary receptor targets (5-HT_{2A/2C} and D₂, respectively) (Schotte et al. 1993). Further, the dose of clozapine is in the lower range of those shown to enhance cortical DA release (Diaz-Mataix et al. 2005; Ichikawa et al. 2001; Rollema et al. 1997).

Clozapine increased DA output in mPFC, an effect mediated by cortical 5-HT_{1A} receptor activation (Bortolozzi et al. 2010; Diaz-Mataix et al. 2005) although α_2 -adrenoceptor blockade has also been suggested (Ashby & Wang, 1996; Svensson, 2003). However, since the elevation of DA output produced by reboxetine + RX821002 was much larger than that of reboxetine + clozapine, it seems reasonable to assume that clozapine antagonizes α_2 -adrenoceptors much less than RX821002.

Consistent with previous reports, haloperidol produced a moderate DA increase in NAc but not in mPFC (Kuroki et al. 1999; Li et al. 1998). However, the effect of haloperidol + reboxetine + RX821002 was more marked than that of the latter two drugs, possibly due to blockade of DA D₂ receptors by haloperidol, which would remove the D₂-mediated negative feedback on DA release following the large increase produced by reboxetine + RX821002. The lower occupancy of DA D₂ receptors produced by clozapine probably accounts for the lower enhancement of mPFC DA output when combined with reboxetine + RX821002.

Therapeutic implications

Overall, the above results indicate that (1) extracellular DA concentration is distinctly regulated in mPFC and NAc, (2) NE terminals largely contribute to the control

of DA output in mPFC (but not NAc) by co-releasing DA and taking up DA via NET, and (3) a marked and selective enhancement of DA function in mPFC is feasible through the combined administration of NET blockers and α_2 -adrenoceptor antagonists. The latter effect occurs when these drugs are administered alone or in combination with haloperidol or clozapine. This opens the way to perform clinical trials in which reboxetine or other NET blockers, used as antidepressants, can be combined with α_2 -adrenoceptor antagonists in order to test their clinical efficacy on negative symptoms and/or cognitive dysfunction in schizophrenia and other psychiatric disorders.

Acknowledgements

This work was supported by grant SAF 2007-62378 (MICIN, Spain). Support from SENY Fundació is also acknowledged. M.M. is a recipient of a predoctoral fellowship from CSIC (I3P programme). A.B. is supported by the research stabilization programme of the Health Department of Generalitat de Catalunya. We thank Leticia Campa for skilful maintenance and supervision of HPLC equipment and analysis of dialysate samples. We also thank Mrs Verónica Paz for excellent technical support.

Statement of Interest

None.

References

- Abercrombie ED, Zigmond MJ (1989). Partial injury to central noradrenergic neurons: reduction of tissue norepinephrine content is greater than reduction of extracellular norepinephrine measured by microdialysis. *Journal of Neuroscience* 9, 4062–4067.
- Abi-Dargham A, Rodenhiser J, Printz D, Zea-Ponce Y, et al. (2000). Increased baseline occupancy of d2 receptors by dopamine in schizophrenia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 8104–8109.
- Adell A, Artigas F (1991). Differential effects of domipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. An *in vivo* brain microdialysis study. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 343, 237–244.
- Adell A, Sama GS, Hutson PH, Curzon G (1989). An *in vivo* dialysis and behavioural study of the release of 5-HT by p-chloroamphetamine in reserpine-treated rats. *British Journal of Pharmacology* 97, 206–212.
- Akil M, Pierri JN, Whitehead RE, Edgar CL, et al. (1999). Lamina-specific alterations in the dopamine innervation of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects. *American Journal of Psychiatry* 156, 1580–1589.

- Amsten AF, Li BM** (2005). Neurobiology of executive functions: catecholamine influences on prefrontal cortical functions. *Biological Psychiatry* 57, 1377–1384.
- Artaloytia JE, Arango C, Lahti A, Sanz J, et al.** (2006). Negative signs and symptoms secondary to antipsychotics: a double-blind, randomized trial of a single dose of placebo, haloperidol, and risperidone in healthy volunteers. *American Journal of Psychiatry* 163, 488–493.
- Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P** (1996). Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends in Neuroscience* 19, 378–383.
- Ashby CR, Wang RY** (1996). Pharmacological actions of the atypical antipsychotic drug clozapine: a review. *Synapse* 24, 349–394.
- Auclair A, Cotecchia S, Glowinski J, Tassin JP** (2002). D-amphetamine fails to increase extracellular dopamine levels in mice lacking alpha 1b-adrenergic receptors: relationship between functional and nonfunctional dopamine release. *Journal of Neuroscience* 22, 9150–9154.
- Auclair A, Drouin C, Cotecchia S, Glowinski J, et al.** (2004). 5-HT_{2A} and alpha1b-adrenergic receptors entirely mediate dopamine release, locomotor response and behavioural sensitization to opiates and psychostimulants. *European Journal of Neuroscience* 20, 3073–3084.
- Bel N, Artigas F** (1992). Fluvoxamine preferentially increases extracellular 5-hydroxytryptamine in the raphe nuclei: an in vivo microdialysis study. *European Journal of Pharmacology* 229, 101–103.
- Berridge CW, Stratford TL, Foote SL, Kelley AE** (1997). Distribution of dopamine beta-hydroxylase-like immunoreactive fibers within the shell subregion of the nucleus accumbens. *Synapse* 27, 230–241.
- Bortolozzi A, Artigas F** (2003). Control of 5-hydroxytryptamine release in the dorsal raphe nucleus by the noradrenergic system in rat brain. Role of alpha-adrenoceptors. *Neuropsychopharmacology* 28, 421–434.
- Bortolozzi A, Diaz-Mataix L, Scorza MC, Celada P, et al.** (2005). The activation of 5-HT receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. *Journal of Neurochemistry* 95, 1597–1607.
- Bortolozzi A, Masana M, Díaz-Mataix L, Cortés R, et al.** (2010). Dopamine release induced by atypical antipsychotics in prefrontal cortex requires 5-HT_{1A} receptors but not 5-HT_{2A} receptors. *International Journal of Neuropsychopharmacology*. Published online: 17 February 2010. doi:10.1017/S146114571000009X.
- Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL, Hemrick-Luecke SK, et al.** (2002). Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology* 27, 699–711.
- Carboni E, Silvagni A, Vacca C, Di Chiara G** (2006). Cumulative effect of norepinephrine and dopamine carrier blockade on extracellular dopamine increase in the nucleus accumbens shell, bed nucleus of stria terminalis and prefrontal cortex. *Journal of Neurochemistry* 96, 473–481.
- Carboni E, Tanda GL, Frau R, Di Chiara G** (1990). Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up *in vivo* by noradrenergic terminals. *Journal of Neurochemistry* 55, 1067–1070.
- Carlsson A** (1978). Antipsychotic drugs, neurotransmitters, and schizophrenia. *American Journal of Psychiatry* 135, 165–173.
- Castner SA, Williams GV, Goldman-Rakic PS** (2000). Reversal of antipsychotic-induced working memory deficits by short-term dopamine D1 receptor stimulation. *Science* 287, 2020–2022.
- Creese I, Burt DR, Snyder SH** (1976). Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science* 192, 481–483.
- Dailly E, Chenu F, Petit-Demouliere B, Bourin M** (2006). Specificity and efficacy of noradrenaline, serotonin depletion in discrete brain areas of Swiss mice by neurotoxins. *Journal of Neuroscience Methods* 150, 111–115.
- Darracq L, Blanc G, Glowinski J, Tassin JP** (1998). Importance of the noradrenaline-dopamine coupling in the locomotor activating effects of D-amphetamine. *Journal of Neuroscience* 18, 2729–2739.
- Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones GS** (1998). Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Research* 806, 127–140.
- Devoto P, Flore G, Pani L, Gessa GL** (2001). Evidence for co-release of noradrenaline and dopamine from noradrenergic neurons in the cerebral cortex. *Molecular Psychiatry* 6, 657–664.
- Devoto P, Flore G, Pira L, Longu G, et al.** (2004). Alpha2-adrenoceptor mediated co-release of dopamine and noradrenaline from noradrenergic neurons in the cerebral cortex. *Journal of Neurochemistry* 88, 1003–1009.
- Devoto P, Flore G, Saba P, Fa M, et al.** (2005). Stimulation of the locus coeruleus elicits noradrenaline and dopamine release in the medial prefrontal and parietal cortex. *Journal of Neurochemistry* 92, 368–374.
- Devoto P, Flore G** (2006). On the origin of cortical dopamine: is it a co-transmitter in noradrenergic neurons? *Current Neuropharmacology* 4, 115–125.
- Devoto P, Flore G, Saba P, Castelli MP, et al.** (2008). 6-Hydroxydopamine lesion in the ventral tegmental area fails to reduce extracellular dopamine in the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Research* 86, 1647–1658.
- Di Chiara G, Tanda GL, Frau R, Carboni E** (1992). Heterologous monoamine reuptake: lack of transmitter specificity of neuron-specific carriers. *Neurochemistry International* 20, 231S–235S.
- Diaz-Mataix L, Scorza MC, Bortolozzi A, Toth M, et al.** (2005). Involvement of 5-HT_{1A} receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action. *Journal of Neuroscience* 25, 10831–10843.

- Floresco SB, Magyar O (2006). Mesocortical dopamine modulation of executive functions: beyond working memory. *Psychopharmacology (Berlin)* 188, 567–585.
- Floirin-Lechner SM, Druhan JP, Aston-Jones G, Valentino RJ (1996). Enhanced norepinephrine release in prefrontal cortex with burst stimulation of the locus coeruleus. *Brain Research* 742, 89–97.
- Fritschy JM, Grzanna R (1989). Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals. *Neuroscience* 30, 181–197.
- Goldman-Rakic PS, Muly III EC, Williams GV (2000). D(1) receptors in prefrontal cells and circuits. *Brain Research Reviews* 31, 295–301.
- Grandoso L, Pineda J, Ugedo L (2004). Comparative study of the effects of desipramine and reboxetine on locus coeruleus neurons in rat brain slices. *Neuropharmacology* 46, 815–823.
- Grenhoff J, Svensson TH (1993). Prazosin modulates the firing pattern of dopamine neurons in rat ventral tegmental area. *European Journal of Pharmacology* 233, 79–84.
- Gresch PJ, Sved AF, Zigmond MJ, Finlay JM (1995). Local influence of endogenous norepinephrine on extracellular dopamine in rat medial prefrontal cortex. *Journal of Neurochemistry* 65, 111–116.
- Grzanna R, Berger U, Fritschy JM, Geffard M (1989). Acute action of DSP-4 on central norepinephrine axons: biochemical and immunohistochemical evidence for differential effects. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 37, 1435–1442.
- Gu H, Wall SC, Rudnick G (1994). Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *Journal of Biological Chemistry* 269, 7124–7130.
- Harden DG, King D, Finlay JM, Grace AA (1998). Depletion of dopamine in the prefrontal cortex decreases the basal electrophysiological activity of mesolimbic dopamine neurons. *Brain Research* 794, 96–102.
- Hertel P, Fagerquist MV, Svensson TH (1999b). Enhanced cortical dopamine output and antipsychotic-like effects of raclopride by alpha2 adrenoceptor blockade. *Science* 286, 105–107.
- Hertel P, Nomikos GG, Svensson TH (1999a). Idazoxan preferentially increases dopamine output in the rat medial prefrontal cortex at the nerve terminal level. *European Journal of Pharmacology* 371, 153–158.
- Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, Fowler WL, et al. (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. *Journal of Neurochemistry* 76, 1521–1531.
- Invernizzi RW, Garattini S (2004). Role of presynaptic alpha2-adrenoceptors in antidepressant action: recent findings from microdialysis studies. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 28, 819–827.
- Jonsson G, Hallman H, Ponzio F, Ross S (1981). DSP4 (N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine) – a useful denervation tool for central and peripheral noradrenergic neurons. *European Journal of Pharmacology* 72, 173–188.
- Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H (1988). Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Archives of General Psychiatry* 45, 789–796.
- Kawahara H, Kawahara Y, Westerink BH (2001). The noradrenaline-dopamine interaction in the rat medial prefrontal cortex studied by multi-probe microdialysis. *European Journal of Pharmacology* 418, 177–186.
- Keefe RS, Young CA, Rock SL, Purdon SE, et al. (2006). One-year double-blind study of the neurocognitive efficacy of olanzapine, risperidone, and haloperidol in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 81, 1–15.
- King D, Finlay JM (1995). Effects of selective dopamine depletion in medial prefrontal cortex on basal and evoked extracellular dopamine in neostriatum. *Brain Research* 685, 117–128.
- Kuroki T, Meltzer HY, Ichikawa J (1999). Effects of antipsychotic drugs on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 288, 774–781.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, et al. (1996). Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93, 9235–9240.
- Letchworth SR, Smith HR, Porrino LJ, Bennett BA, et al. (2000). Characterization of a tropane radioligand, [(3)H]2beta-propanoyl-3beta-(4-tolyl) tropane ([3H]PPT), for dopamine transport sites in rat brain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 293, 686–696.
- Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, et al. (2009). Second-generation vs. first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet* 373, 31–41.
- Lewis DA, Lieberman JA (2000). Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28, 325–334.
- Li XM, Perry KW, Wong DT, Bymaster FP (1998). Olanzapine increases *in vivo* dopamine and norepinephrine release in rat prefrontal cortex, nucleus accumbens and striatum. *Psychopharmacology (Berlin)* 136, 153–161.
- Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, et al. (2005). Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *New England Journal of Medicine* 353, 1209–1223.
- Linner L, Endersz H, Ohman D, Bengtsson F, et al. (2001). Reboxetine modulates the firing pattern of dopamine cells in the ventral tegmental area and selectively increases dopamine availability in the prefrontal cortex. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 297, 540–546.
- Marshall JE, O'Dell SJ, Navarrete R, Rosenstein AJ (1990). Dopamine high-affinity transport site topography in rat brain: major differences between dorsal and ventral striatum. *Neuroscience* 37, 11–21.
- Mateo Y, Pineda J, Meana JJ (1998). Somatodendritic alpha2-adrenoceptors in the locus coeruleus are involved

- in the *in vivo* modulation of cortical noradrenaline release by the antidepressant desipramine. *Journal of Neurochemistry* 71, 790–798.
- Mazei MS, Pluto CP, Kirkbride B, Pehek EA** (2002). Effects of catecholamine uptake blockers in the caudate-putamen and subregions of the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Research* 936, 58–67.
- Meltzer HY, McGurk SR** (1999). The effects of clozapine, risperidone, and olanzapine on cognitive function in schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 25, 233–255.
- Millan MJ, Gobert A, Rivet JM, Adhumeau-Auclair A, et al.** (2000). Mirtazapine enhances frontocortical dopaminergic and corticolimbic adrenergic, but not serotonergic, transmission by blockade of alpha2-adrenergic and serotonin2C receptors: a comparison with citalopram. *European Journal of Neuroscience* 12, 1079–1095.
- Miner LH, Schroeter S, Blakely RD, Sesack SR** (2003). Ultrastructural localization of the norepinephrine transporter in superficial and deep layers of the rat prelimbic prefrontal cortex and its spatial relationship to probable dopamine terminals. *Journal of Comparative Neurology* 466, 478–494.
- Paxinos G, Watson C** (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney: Academic.
- Pozzi L, Invernizzi R, Cervo L, Vallebuona F, et al.** (1994). Evidence that extracellular concentrations of dopamine are regulated by noradrenergic neurons in the frontal cortex of rats. *Journal of Neurochemistry* 63, 195–200.
- Raiteri M, del Carmine R, Bertollini A, Levi G** (1977). Effect of sympathomimetic amines on the synaptosomal transport of noradrenaline, dopamine and 5-hydroxytryptamine. *European Journal of Pharmacology* 41, 133–143.
- Robbins TW, Roberts AC** (2007). Differential regulation of fronto-executive function by the monoamines and acetylcholine. *Cerebral Cortex* 17, i151–i160.
- Robbins TW, Arnsten AF** (2009). The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annual Review of Neuroscience* 32, 267–287.
- Robinson TE, Mocsary Z, Camp DM, Whishaw IQ** (1994). Time course of recovery of extracellular dopamine following partial damage to the nigrostriatal dopamine system. *Journal of Neuroscience* 14, 2687–2696.
- Robinson TE, Whishaw IQ** (1988). Normalization of extracellular dopamine in striatum following recovery from a partial unilateral 6-OHDA lesion of the substantia nigra: a microdialysis study in freely moving rats. *Brain Research* 450, 209–224.
- Rollema H, Lu Y, Schmidt AW, Zorn SH** (1997). Clozapine increases dopamine release in prefrontal cortex by 5-HT1A receptor activation. *European Journal of Pharmacology* 338, R3–R5.
- Romero L, Artigas F** (1997). Preferential potentiation of the effects of serotonin uptake inhibitors by 5-HT1A receptor antagonists in the dorsal raphe pathway: role of somatodendritic autoreceptors. *Journal of Neurochemistry* 68, 2593–2603.
- Romero L, Jernej B, Bel N, Cicin-Sain L, et al.** (1998). Basal and stimulated extracellular serotonin concentration in the brain of rats with altered serotonin uptake. *Synapse* 28, 313–321.
- Sara SJ** (2009). The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition. *Nature Reviews Neuroscience* 10, 211–223.
- Schroeter S, Apparsundaram S, Wiley RG, Miner LH, et al.** (2000). Immunolocalization of the cocaine- and antidepressant-sensitive 1-norepinephrine transporter. *Journal of Comparative Neurology* 420, 211–232.
- Seeman P, Lee T** (1975). Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science* 188, 1217–1219.
- Seguela P, Watkins KC, Geffard M, Descarries L** (1990). Noradrenaline axon terminals in adult rat neocortex: an immunocytochemical analysis in serial thin sections. *Neuroscience* 35, 249–264.
- Sesack SR, Hawrylak VA, Matus C, Guido MA, et al.** (1998). Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *Journal of Neuroscience* 18, 2697–2708.
- Schotte A, Janssen PF, Megens AA, Leysen JE** (1993). Occupancy of central neurotransmitter receptors by risperidone, clozapine and haloperidol, measured *ex vivo* by quantitative autoradiography. *Brain Research* 631, 191–202.
- Svensson TH** (2003). Alpha-adrenoceptor modulation hypothesis of antipsychotic atypicality. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27, 1145–1158.
- Swanson CJ, Perry KW, Koch-Krueger S, Katner J, et al.** (2006). Effect of the attention deficit/hyperactivity disorder drug atomoxetine on extracellular concentrations of norepinephrine and dopamine in several brain regions of the rat. *Neuropharmacology* 50, 755–760.
- Szot P, Miguez C, White SS, Franklin A, et al.** (2010). A comprehensive analysis of the effect of DSP4 on the locus coeruleus noradrenergic system in the rat. *Neuroscience* 166, 279–291.
- Tanda G, Carboni E, Frau R, Di Chiara G** (1994). Increase of extracellular dopamine in the prefrontal cortex: a trait of drugs with antidepressant potential? *Psychopharmacology (Berlin)* 115, 285–288.
- Tseng KY, Kargieman L, Gacio S, Riquelme LA, et al.** (2005). Consequences of partial and severe dopaminergic lesion on basal ganglia oscillatory activity and akinesia. *European Journal of Neuroscience* 22, 2579–2586.
- Valentini V, Frau R, Di Chiara G** (2004). Noradrenaline transporter blockers raise extracellular dopamine in medial prefrontal but not parietal and occipital cortex: differences with mianserin and clozapine. *Journal of Neurochemistry* 88, 917–927.
- Vijayraghavan S, Wang M, Birnbaum SG, Williams GV, et al.** (2007). Inverted-U dopamine D1 receptor actions on prefrontal neurons engaged in working memory. *Nature Neuroscience* 10, 376–384.

68 M. Masana et al.

- Vos PE, Steinbusch HW, Ronken E, van Ree JM (1999).** Short and long term plasticity after lesioning of the cell body or terminal field area of the dopaminergic mesocorticolimbic system in the rat. *Brain Research* **831**, 237–247.
- Wadenberg ML, Wiker C, Svensson TH (2007).** Enhanced efficacy of both typical and atypical antipsychotic drugs by adjunctive alpha2 adrenoceptor blockade: experimental evidence. *International Journal of Neuropsychopharmacology* **10**, 191–202.
- Weinberger DR, Berman KF, Chase TN (1988).** Mesocortical dopaminergic function and human cognition. *Annals of the New York Academy of Sciences* **537**, 330–338.
- Westerink BH, Kawahara Y, De Boer P, Geels C, et al. (2001).** Antipsychotic drugs classified by their effects on the release of dopamine and noradrenaline in the prefrontal cortex and striatum. *European Journal of Pharmacology* **412**, 127–138.
- Williams GV, Goldman-Rakic PS (1995).** Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature* **376**, 572–575.
- Zigmond MJ, Abercrombie ED, Berger TW, Grace AA, et al. (1990).** Compensations after lesions of central dopaminergic neurons: some clinical and basic implications. *Trends in Neuroscience* **13**, 290–296.

3. **Treball 3:**

Selective enhancement of cortical catecholamine release as a way to potentiate antidepressant treatments.

M. Masana, A. Castañé, N. Santana, A. Bortolozzi, F. Artigas.

En preparació

La utilització de combinacions de fàrmacs o fàrmacs multi-diana s'està extenent en la pràctica clínica per millorar el tractament de la depressió major, concretament en els casos de resistència al tractament. Probablement això augmenta l'eficàcia dels inhibidors selectius de la recaptació de serotonina (SSRI) degut a l'influència en altres circuits corticolímbics implicats en depressió. A part de l'acció principal sobre els sistemes serotoninèrgics (5-HT) i noradrenèrgics (NE), la transmissió dopaminèrgica està ressorgint com a nova diana per a millorar els tractaments antidepressius. Un mecanisme potencial per augmentar la transmissió DA, particularment en l'escorça prefrontal (EPF) és utilitzant combinacions de fàrmacs NE, concretament la combinació d'un inhibidor del NET amb un antagonista del receptor adrenèrgic α_2 augmenta selectivament els nivells de DA a l'EPF medial (EPFm) de la rata, però no en el nucli accumbens.

En aquesta línia, s'ha volgut caracteritzar de forma neuroquímica (microdiàlisi), comportamental (test de natació forçada, FST) i histològica (expressió de *c-Fos*), la combinació de dos fàrmacs antidepressius, reboxetina (Reb, inhibidor selectiu del NET) i la mirtazapina (Mirt, antagonista del receptor α_2 -adrenèrgic). La combinació de Reb+Mirt, produeix un augment significatiu dels nivells de DA en l'EPFm vs els tractaments individuals. Aquestes evidències neuroquímiques correlacionen amb un marcat potencial antidepressiu en el test de natació forçada. Ambdós efectes persisteixen en presència de citalopram (SSRI). Finalment l'estudi dels canvis en *c-fos* en diferents regions cerebrals ens aporta un correlacionat anatòmic de les accions del tractament combinat en situació basal o d'estrès. Entre altres canvis, el gir dentat, l'àrea tegmental ventral i el *locus coeruleus* semblen regions clau on el tractament combinat reverteix els efectes d'estrès produïts pel FST.

En resum, nosaltres proposem la combinació de Reb + Mirt com a tractament potencial per millorar els efectes dels SSRIs. Aquesta combinació de tractaments pot oferir noves perspectives per al tractament dels pacients depressius mitjançant la facilitació de la transmissió DA a EPFm.

Masana et al 2011

NE drugs combination

Noradrenergic contribution to prefrontal cortex dopamine: Potential use in antidepressant treatments

Mercè Masana, Anna Castañé, Noemí Santana, Analía Bortolozzi, Francesc Artigas

Department of Neurochemistry and Neuropharmacology,

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC-IDIBAPS)

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

Abstract

Current treatments for major depression show lack of efficacy and slow onset of action. A large percentage of patients show incomplete improvements requiring augmentation strategies and/or more aggressive treatments such as electroconvulsive therapy. Here we report on a novel augmentation strategy to selectively increase DA function in prefrontal cortex (PFC), based on previous observations suggesting that a substantial proportion of extracellular DA in PFC arises from noradrenergic terminals (Masana et al., 2011). The treatment with the norepinephrine (NE) reuptake inhibitor reboxetine (3 mg/kg, i.p.) or the non-selective α_2 -adrenoceptor antagonist mirtazapine (5 mg/kg, s.c.) evoked minor or no increments of extracellular DA concentration in medial PFC (mPFC). However, their combined administration markedly increased extracellular DA in mPFC ($264 \pm 28 \%$), but not in the nucleus accumbens (NAc). This effect persisted in rats pretreated with citalopram (3 mg/kg, i.p.). The similar changes observed for extracellular NE, together with prior evidence indicating that cortical noradrenergic axons may take up and release DA, suggest that the reboxetine + mirtazapine combination mainly acted on noradrenergic terminals to increase DA. These neurochemical observations were paralleled by a very marked antidepressant effect of the reboxetine + mirtazapine (but not either agent alone) in the forced swim test. *c-fos* mRNA expression studies suggest the involvement of various midbrain, cortical and hippocampal areas in the antidepressant-like effects evoked by reboxetine + mirtazapine combinations.

Masana et al 2011

NE drugs combination

Keywords: antidepressant drugs, *c-fos*, catecholamines, dopamine, noradrenaline, prefrontal cortex

INTRODUCTION

Major depression is a severe psychiatric syndrome with high prevalence and socio-economic impact (Andlin-Sobocki et al., 2005; Kessler et al., 2005; Murray and López, 1997). However, the high incidence of depression is not accompanied by advances in the efficacy of existing antidepressants, which typically show response and remission rates of ~50% and ~30%, making that a large percentage of patients require medication augmentation (Trivedi et al., 2006) or more aggressive strategies, such as electroconvulsive therapy (Carney and Geddes, 2003) or experimental treatments including deep brain stimulation (Mayberg et al., 2005).

The brainstem serotonergic (5-HT) and noradrenergic (NE) systems have been involved in the pathophysiology and treatment of major depression (see Nestler et al., 2002 for review). Most prescribed antidepressants, the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) and the dual serotonin and norepinephrine reuptake inhibitors (SNRI) block physiological reuptake mechanisms in respective serotonergic and noradrenergic axons and thereby, they increase extracellular 5-HT and NE concentration in forebrain to activate postsynaptic 5-HT and NE receptors involved in the clinical effects. However, this process is severely compromised by the simultaneous activation of presynaptic autoreceptors (5-HT_{1A/1B} receptors in serotonin neurons, α_2 -adrenoceptors in noradrenergic neurons) (Artigas et al., 1996; Mateo et al., 1998). Following repeated treatment, autoreceptors desensitize leading to a recovery to monoaminergic cell firing and monoamine release (Bel and Artigas, 1993; Blier and de Montigny, 1994; Mateo et al., 2001). Thus, the combined administration of monoamine reuptake inhibitors and antagonists of the corresponding autoreceptors synergistically increase the extracellular

Masana et al 2011

NE drugs combination

concentrations of 5-HT and/or NE (Artigas et al., 1996; Invernizzi and Garattini, 2004; Mateo et al., 1998). This strategy has been applied to enhance the clinical speed and efficacy of SSRI, using the non-selective 5-HT_{1A}/β-adrenoreceptor blocker pindolol (Artigas et al., 1994; Perez et al., 1997; Portella et al., 2010).

The mesolimbic and mesocortical dopaminergic systems also appear to play a key role in numerous physiological (e.g., cognition, reward) and pathological processes (schizophrenia, drug addiction, etc.). Likewise, an abnormal dopamine (DA) function is involved in depressive symptoms, in particular cognitive dysfunction and anhedonia (Golman-Rakic, 1999; Goldman-Rakic et al., 2004). Moreover, most antidepressant treatments indirectly increase dopaminergic function (D'Aquila et al., 2000; Lavergne and Jay, 2010). However, blockade of DA reuptake may not be a convenient way to increase DA function due to the profound plastic synaptic changes induced by DA transporter blockade (Jones et al., 1998) and the possibility of inducing tolerance or abuse (Kuhar et al., 1991; Sora et al., 2001; Woolverton and Johnson, 1992).

Previous work has shown that DA can be taken up and released by noradrenergic terminals in prefrontal cortex (PFC), a key area in psychiatric diseases, including major depression and schizophrenia (Devoto et al., 2001, 2005; Devoto and Flore, 2006; Kawahara et al., 2001; Masana et al., 2011). Hence, NE transporter (NET) blockade preferentially increase the extracellular DA concentration in PFC compared to nucleus accumbens (Carboni et al., 1990, 2006; Mazei et al., 2002; Pozzi et al., 1994; Masana et al., 2011). In agreement with these observations, blockade of α₂-adrenoceptors with the selective antagonist RX-821002 synergistically augmented the

Masana et al 2011

NE drugs combination

mesocortical (but not mesolimbic) extracellular DA concentration induced by the NET inhibitor reboxetine (Masana et al., 2011).

Here we evaluate the potential translational value of the above observations for the treatment of major depression using histochemical, neurochemical and behavioral approaches in rats. We examined the antidepressant properties of the combination of two marketed antidepressant drugs, reboxetine (NET inhibitor) and the non-selective α_2 -adrenoceptor antagonist mirtazapine, under the working hypothesis that this drug combination should synergistically enhance.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male Wistar rats (250–320 g, Iffa-Credo, Lyon, France) were maintained at 12h light/dark cycle, 22 ± 2 °C room temperature, and food and water *ad libitum*. Animal care followed European Union regulations (O.J. of E.C. L358/1 18/12/1986) and was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the School of Medicine, University of Barcelona.

Drugs and reagents

All HPLC reagents used were of analytical grade and obtained from Merck (Darmstadt, Germany). Reboxetine mesylate and mirtazapine were obtained from TOCRIS (Avonmouth, UK). Citalopram hydrobromide was generously donated by H. Lundbeck A/S (Copenhagen-Valby, Denmark). Drugs were dissolved in saline (pH adjusted to 6-7)

Masana et al 2011

NE drugs combination

in a final volume of 1-2 ml/kg for systemic administration. Doses used throughout all the experiments were: reboxetine 3 mg/kg, mirtazapine 5 mg/kg and citalopram 3 mg/kg (expressed as free bases).

***In vivo* microdialysis.**

Microdialysis experiments were conducted as previously described (Masana *et al*, 2010). Briefly, concentric dialysis probes were implanted under pentobarbital anesthesia (60 mg/kg, i.p.) at the following brain coordinates in mm from bregma and duramater (Paxinos and Watson, 1998): mPFC, AP +3.2, L -0.8, DV -6.0, 4 mm membrane length; and NAc, AP +1.6, L -1.1, DV -8.0, 1.5 mm membrane length. Microdialysis experiments were performed 20-24 h after surgery in freely-moving rats. Probes were connected to the perfusion pump delivering artificial cerebrospinal fluid (aCSF, in mM: NaCl, 125; KCl, 2.5; CaCl₂, 2.52 and MgCl₂, 1.18) at 1.5 µl/min. Samples were collected every 20 min -after an initial 30 min stabilization period- in microvials containing 5 µl of 10 mM HClO₄ to prevent catecholamine degradation. Four baseline samples were collected before systemic drug administration.

Monoamine concentrations in dialysate samples were determined by HPLC with electrochemical detection (Hewlett Packard 1049, Palo Alto, CA, USA, +0.7 V) as described previously (Bortolozzi and Artigas, 2003; Masana et al., 2011). Detection limits were 2–3 fmol for DA, NE and 5-HT.

At the end of the experiments, animals were killed by a pentobarbital overdose. Brains were quickly removed and frozen in dry ice before being sectioned (40 µm) with a cryostat (HM500-Om Microm, Walldorf, Germany). Coronal brain sections were

stained with neutral red to verify the correct placement of probes and electrodes. Only data from rats with probes correctly implanted in mPFC and NAc were used.

Locomotor activity

Rats were brought to the experimental room in their home cages, identified and weighted one hour prior to the behavioural test. Motor activity was measured using an Open-Field (OF) apparatus (35 x 35 x 40 cm) with black plastic walls dimly illuminated (50-60 lx). The OF was covered by an interchangeable opaque plastic base that was replaced before each animal. Locomotor activity was recorded during 1 h by a videocamera connected to a computer (Videotrack, View Point, Lyon, France) and automatically measured by the video-tracking software. Horizontal locomotor activity was defined as total distance moved in cm (Scorza et al., 2010). Additionally, the number of rearing and grooming were measured simultaneously by the experimenter. Rats were not habituated to the OF before drug administration and were used only once. Acute reboxetine (i.p.) and mirtazepine (s.c) treatment was administered 5 min prior to the test and control animals received saline injections (Figure 1A).

Forced swimming test (FST)

We used the modified rat FST (Cryan et al., 2002a; 2005) to test the antidepressant profile of the proposed combination of drugs. Rats were handled daily 1 week before test. In the pre-test session, rats were placed in a clear methacrylate cylinder (20 cm wide x 46 cm high) filled with water (23-25 °C; 30 cm depth) for 15 min. Rats were returned to their home cages after being dried off, first with paper towel following by 15 min into a cage with a heating pad. The test was conducted 24 h later in the same

Masana et al 2011

NE drugs combination

cylinder for 5 min and videotaped from above. Climbing, swimming and immobility behavior were scored every 5 s intervals (Detke et al., 1995). Climbing was defined as upward-directed movements of the forepaws along the side of the cylinder; swimming consisted of the movement (usually horizontal) throughout the swim chamber that also includes crossing into another quadrant; and immobility behavior was measured when no additional activity was observed other than that required to keep the rat's head above the water. Immobility timing was also measured during FST test and was in accordance to the immobility score (data not shown). Time spend before the first immobility score was also measured (Castagne et al., 2009) and time-course representation was also used for visual inspection of FST temporal patterns (Chandramohan et al., 2008). Drugs were injected together i.p., 23.5, 5 and 1 h before test (Figure 1B).

***In situ* hybridization**

Rats were handled 1 week before this study. For acute experiments (Figure 1A), drugs were administered i.p. 1 h prior to decapitation. For subchronic experiments (Figure 1B), rats were treated using the drug administration protocol of the forced swimming test (FST). Briefly, all rats received a pre-test session (15 min swim) 24 h before decapitation. Drugs were prepared together and injected i.p., 23.5, 5 and 1 h before test session. An additional group of treated rats and their respective controls were killed without the FST test swim.

c-fos oligonucleotide probe was complementary to bases 131–178 (GenBank accession no. NM 022197). Labeling of the probes, tissue sectioning and *in situ* hybridization

Masana et al 2011

NE drugs combination

procedures were carried out as described previously (Kargieman *et al*, 2007). Hybridized sections were exposed to Biomax MR film (Kodak) for 7 days with intensifying screens. Measures of the relative optical densities (R.O.D.) were conducted with the AIS computerized image analysis system (AIS, Imaging Research Inc.), which was also used to acquire pseudocolor images. Images were processed with Photoshop (Adobe Systems, Mountain View) by using identical values for contrast and brightness. Individual values of optical densities were calculated as the mean of 2-4 sections per rat (n=4 per treatment group).

Statistical analysis

Microdialysis results are expressed as fmol/30 μ l fraction (uncorrected for recovery) or as a percentage of basal values. Area under the curve (AUC) of selected time periods was also used. Statistical analysis was carried out using one or two-way repeated measures ANOVA of DA, NE and 5-HT values (or AUCs) followed by Newman-Keuls post-hoc test. Behavioral and histological *c-fos* mRNA data were analyzed by one-way ANOVA or Student's *t*-test, as appropriate. Data are expressed as means \pm SEM. The significance level was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Effects of acute reboxetine + mirtazapine combinations on monoamine output in rat mPFC and NAc.

The mean baseline concentrations (fmol/fraction) of monoamine dialysate samples from mPFC and NAc (double probe experiments) were respectively: a) DA: 13 ± 2 (n=34) and 8 ± 1 (n=32); b) NE: 3.5 ± 0.2 (n=9) and 1.9 ± 0.4 (n=10); and c) 5-HT: 3.5 ± 0.2 (n=7) and 1.9 ± 0.4 (n=10).

The administration of vehicle, reboxetine or mirtazapine did not significantly increase DA output in mPFC and NAc (Figure 2A, 2B). However, the combined administration of reboxetine + mirtazapine evoked a marked and significant increase of DA output in mPFC (264 ± 28 % of baseline; $F_{3,22}=9.47$, $p<0.001$) which was significantly different from the rest of experimental groups (post-hoc Newman-Keuls test) (Figure 2A). In contrast, none of the drugs altered the DA output in NAc (Figure 2B).

Co-administration with Citalopram

SSRI are used as first choice antidepressant treatments. Thus, we examined whether citalopram pre-treatment modified the effects of reboxetine + mirtazapine combinations, putatively used as an augmentation strategy.

Citalopram pre-treatment did not alter the ability of reboxetine + mirtazapine combination to increase DA output in mPFC (Figure 2C). One-way ANOVA of mPFC DA revealed a significant effect of treatment ($F_{3,19}=11.65$, $p<0.001$) with post-hoc

(Newman-Keuls) significant differences between the reboxetine + mirtazapine combined treatment (alone or in presence of citalopram) vs. vehicle controls. Neither treatment altered the DA output in NAc (Figure 2D).

Figures 2E and 2F show the change of the extracellular DA, NE and 5-HT concentrations in mPFC and NAc, respectively, produced by the acute reboxetine + mirtazapine combination. This evoked a very marked increase in NE and DA, but not 5-HT concentrations in mPFC. One-way ANOVA revealed a significant treatment effect on DA ($F_{1,13}=24.72$, $p<0.001$) and NE ($F_{1,7}=40.93$, $p<0.001$) output. In NAc, only NE output was significantly increased by the reboxetine + mirtazapine combination ($F_{1,8}=15.85$, $p<0.01$) (Figure 2F).

Effects of repeated reboxetine + mirtazapine combinations on dopamine output in rat mPFC.

Dialysate DA concentration (fmol/fraction) in mPFC was measured in the same animals after subchronic combined drug treatment (Figure 3). Single injection of reboxetine + mirtazapine (Figure 3A) produced a significant increase of DA output in mPFC from 12 ± 4 fmol/fraction (baseline) to 27 ± 8 fmol/fraction as described by ANOVA ($F_{1,26}=5.30$, $p<0.05$).

On the second day, reboxetine + mirtazapine (14 ± 1 fmol/fraction baseline) significantly increased DA output to the same extent after the second (33 ± 4 fmol/fraction) and third administration (33 ± 2 fmol/fraction). Vehicle repeated administration also produced a moderate increase in DA output in mPFC after the third administration ($9 \pm$

Masana et al 2011

NE drugs combination

2 fmol/fraction baseline, 11 ± 1 fmol/fraction second and 20 ± 4 fmol/fraction third administrations). Two-way ANOVA showed a significant effect of treatment ($F_{1,18}=36.28$, $p<0.0001$), injection ($F_{2,18}=16.89$, $p<0.0001$) and interaction ($F_{2,18}=5.06$, $p<0.05$).

Effects of repeated reboxetine + mirtazapine combinations on the forced swimming test (FST) in rats

Figure 4A shows the effects of the various antidepressant drugs used on FST variables. At the dose used, reboxetine and mirtazapine alone did not significantly reduced immobility. However, its combination markedly decreased immobility and increased climbing behavior. Likewise, citalopram administration (3 mg/kg i.p.) did not alter the immobility and –as observed in microdialysis experiments- did not change the ability of the reboxetine + mirtazapine combination to markedly decrease immobility. One-way ANOVA showed a significant effect of treatment on immobility ($F_{5,43}=4.31$, $p<0.01$) with post-hoc differences (Newman-Keuls test). Swimming was unaffected by the various drug used. However, one-way ANOVA showed a significant effect of treatment ($F_{5,43}=2.68$, $p<0.05$) on climbing, with post-hoc differences of the reboxetine + mirtazapine combination vs. citalopram (Newman-Keuls test).

We also examined the latency to immobility produced by the different treatments (Figure 4B). The reboxetine + mirtazapine combination induced a very marked increase of this variable ($F_{5,43}=5.63$, $p<0.001$). Figure 5 shows individual behavior of all rats used in FST experiments. Each rat is depicted by a horizontal line with color-coded behaviors. Neither of these effects of the reboxetine + mirtazapine combination on FST

Masana et al 2011

NE drugs combination

is due to an increase of motor activity, since the combination treatment did not alter the distance moved nor the number of rearings, yet it caused a moderate decline in grooming behavior (data not shown).

Effects of acute and repeated reboxetine + mirtazepine treatment on c-fos mRNA expression

In order to assess brain networks involved in the superior antidepressant effects of reboxetine + mirtazepine combinations, we examined drug effects on the expression of the immediate early gene *c-fos* using *in situ* hybridization. Relative optical densities (R.O.D.) were measured and results are expressed as percentages of vehicle-treated rats. In subchronic administration groups, all R.O.D. are expressed relative to vehicle pre-FST group of animals. Results and statistical analyses are resumed in Figure 6 for acute treatment and Figure 7 for subchronic treatment.

Masana et al 2011

NE drugs combination

DISCUSSION

The present observations confirm and extend previous reports indicating that noradrenergic drugs can selectively enhance DA transmission in PFC (Carboni et al., 1990; Masana et al., 2011; Mazei et al., 2002; Pozzi et al., 1994). This evoked a marked antidepressant effect in the FST, which most likely results from the synergistic interaction between the NET inhibitor reboxetine and the non-selective α_2 -adrenoceptor antagonist mirtazapine, which alone, did not reduce immobility in the FST. Interestingly, the neurochemical and behavioral effects of reboxetine + mirtazapine combinations were unaltered by citalopram pretreatment, suggesting that this drug combination could be efficiently used as an augmentation strategy in patients treated with –but not responding to– SSRI.

After more than two decades of antidepressant drugs based on single or dual targets (e.g., SSRI, SNRI), current trends in development are focused on multi-target drugs that *i*) increase the function of all monoamine systems (e.g., triple reuptake inhibitors) and/or *ii*) reduce the efficacy of negative feed-back mechanisms operating in monoaminergic neurons in order to attain greater increments of extracellular monoamine concentration. Triple reuptake inhibitors increase extracellular concentrations of 5-HT, NE and DA, without the severe side effects of MAO inhibitors. These drugs appear to be superior in terms of shorter onset of action than traditional antidepressants (Chen and Skolnick, 2007; Millan, 2009). However, the blockade of DA transporter may involve tolerance problems (Haddad, 1999). On the other hand, numerous therapeutic strategies have been put forward based on drug combinations targeting several monoaminergic elements (Artigas et al., 1994, 1996; Blier et al., 2010; Carpenter et al.,

Masana et al 2011

NE drugs combination

2002; Chen and Skolnick, 2007; Lopez-Munoz et al., 2006; Millan, 2009; Papakostas et al., 2006; Trivedi et al., 2006).

The present study shows the feasibility of selectively increasing cortical (but not mesolimbic) catecholaminergic transmission using marketed drugs. The prominent and selective increase of DA and NE output in mPFC evoked by the reboxetine + mirtazepine combination is consistent with previous data by our group using reboxetine and the selective α_2 -adrenergic antagonist RX-821002 (Masana et al., 2011), which evoked an even greater increase of DA in mPFC. However, unlike mirtazepine, RX-821002 is not available for human use, which avoids the clinical usefulness of the above findings. Previous reports indicate that α_2 -adrenoceptors negatively modulate NE release after antidepressant treatments. Hence, the combined administration of NET inhibitors and α_2 -adrenergic antagonists markedly increased extracellular NE in forebrain (Invernizzi and Garattini, 2004; Mateo et al., 1998; Ortega et al., 2010; Sacchetti et al., 1999).

A likely explanation for the observed increase of extracellular DA in mPFC is the contribution of noradrenergic axons to a substantial proportion of cortical DA release (Devoto et al., 2001; Masana et al., 2011). Hence, as proposed (Masana et al., 2011), NET blockade would increase the extracellular NE concentration, resulting in an enhanced activation of terminal (and likely somatodendritic) α_2 -adrenoceptors, which would attenuate noradrenergic cell firing and NE release. Blockade of α_2 -adrenoceptors would counteract autoreceptor-mediated negative feedback, leading an enhanced NE release. DA, stored in the same synaptic vesicles than NE, would therefore be subjected to the same processes (Masana et al., 2011).

In contrast to mPFC, the combination of reboxetine + mirtazapine only increased extracellular NE in NAc (Figure 2F). This effect may be due to the different regional NE innervation in rat brain and to the greater contribution of DA axons to extracellular DA in NAc. Hence, the *locus coeruleus* is the main NE source for noradrenergic PFC innervation whereas it has a low contribution in NAc, where the nucleus of the solitary tract is the main NE source (Berridge et al., 1997; Delfs et al., 1998; Foote et al., 1983; Seguela et al., 1990). On the other hand, the large density of DA fibers in NAc – compared to PFC- minimizes the noradrenergic contribution to extracellular DA in the NAc.

The reboxetine + mirtazapine combination also evoked a very marked decrease of immobility in the FST, which was accompanied by an increased latency to immobility. Although various neurotransmitters and receptors have been implicated in antidepressant response in the FST (Cryan et al., 2002b; Page et al., 1999, 2003; Reneric and Lucki, 1998), the parallel changes in PFC DA and FST variables induced by the reboxetine + mirtazapine combination support the view that an increased cortical DA (and very likely) NA function underlies the behavioral action of antidepressant drugs (see also Lavergne and Jay, 2010 for review).

Interestingly, the marked reduction of immobility produced by reboxetine + mirtazapine and its combination with citalopram was obtained with doses of these compounds that are ineffective when given alone, in agreement with data in the literature (Connor et al., 1999; Mague et al., 2003; Reneric et al. 2002). This further supports the above interpretation of the mechanism of action, likely resulting from a synergistic interaction between NET blockade and α_2 -adrenoceptor blockade. Several

groups have extensively examined the effects of many antidepressant classes and their combinations on swimming and climbing behaviors in the FST (Cryan et al., 2002b; Page et al., 1999, 2003;; Reneric and Lucki, 1998). The present results agree with previous studies showing that the combination of desipramine (NET inhibitor) + idazoxan (α_2 -adrenoceptor antagonist) + fluoxetine (SERT inhibitor) produced a greater reduction of the immobility time, as well an increase of swimming and climbing behaviours (Reneric et al., 2001).

We used *c-fos* expression to examine the rat brain areas involved in the above antidepressant-like effects. Overall, acute and subchronic reboxetine + mirtazapine treatments induced a similar change of *c-fos* mRNA expression throughout the brain, with an increased expression in dorsal raphe, entorhinal cortex, dentate gyrus and a decreased expression in PFC, compared to vehicle-treated animals. Interestingly, acute reboxetine + mirtazapine increased *c-fos* expression in the dorsal raphe but leave it unaltered in the ventral tegmental area and *locus coeruleus*. However, subchronic reboxetine + mirtazapine treatment increased *c-fos* expression in the latter two areas, suggesting an enhanced catecholaminergic activity. The above areas have been strongly linked with the pathophysiology and treatment of depression in humans and animal models (Krishnan and Nestler, 2008; Nestler et al., 2002). However, some regional changes in *c-Fos* expression produced by antidepressants and/or FST procedures are not consistent across the literature, probably because of the different protocols used (Beck 1995; Torres et al., 1998; Svenningsson et al., 2007).

In the present study, all subchronically treated rats received a pre-swim session. The comparison of *c-fos* data between subchronic treatments, before and after a swim-

Masana et al 2011

NE drugs combination

test session, showed that the dentate gyrus, ventral tegmental area, *locus coeruleus*, and the dorsal tegmentum are target areas for the antidepressant effects of reboxetine + mirtazapine, since the effect of the combination treatment evoked different responses depending on the number of swim session received (Stone et al., 2007).

In summary, we show that the combination of drugs targeting NET (e.g., reboxetine) and α_2 -adrenoceptors (e.g., mirtazapine) can be a useful augmentation strategy of SSRI effects, by selectively increasing PFC catecholaminergic neurotransmission. In particular, the increase of PFC DA release achieved with these drugs may contribute to improve cognitive dysfunction in depressed patients and enhance motivation.

REFERENCES

- Andlin-Sobocki P, Jonsson B, Wittchen HU, Olesen J** (2005). Cost of disorders of the brain in Europe. *Eur J Neurol*, **12 Suppl 1**: 1-27.
- Artigas F, Perez V, Alvarez E** (1994). Pindolol induces a rapid improvement of depressed patients treated with serotonin reuptake inhibitors. *Arch.Gen.Psychiatry*, **51**(3): 248-251.
- Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P** (1996). Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci.*, **19**(9): 378-383.
- Beck CH** (1995). Acute treatment with antidepressant drugs selectively increases the expression of c-fos in the rat brain. *J Psychiatry Neurosci*, **20**(1): 25-32.

- Bel N, Artigas F** (1993). Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synapse*, **15**(3): 243-245.
- Berridge CW, Stratford TL, Foote SL, Kelley AE** (1997). Distribution of dopamine beta-hydroxylase-like immunoreactive fibers within the shell subregion of the nucleus accumbens. *Synapse*, **27**(3): 230-241.
- Blier P, de Montigny C** (1994). Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci*, **15**(7): 220-226.
- Blier P, Ward HE, Tremblay P, Laberge L, et al.** (2010). Combination of antidepressant medications from treatment initiation for major depressive disorder: a double-blind randomized study. *Am.J.Psychiatry*, **167**(3): 281-288.
- Bortolozzi A, Artigas F** (2003). Control of 5-hydroxytryptamine release in the dorsal raphe nucleus by the noradrenergic system in rat brain. Role of alpha-adrenoceptors. *Neuropsychopharmacology*, **28**(3): 421-434.
- Carboni E, Tanda GL, Frau R, Di Chiara G** (1990). Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up in vivo by noradrenergic terminals. *J.Neurochem.*, **55**(3): 1067-1070.
- Carney S, Geddes J** (2003). Electroconvulsive therapy. *BMJ*, **326**(7403): 1343-1344.
- Carpenter LL, Yasmin S, Price LH** (2002). A double-blind, placebo-controlled study of antidepressant augmentation with mirtazapine. *Biol.Psychiatry*, **51**(2): 183-188.
- Castagne V, Porsolt RD, Moser P** (2009). Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *Eur.J.Pharmacol.*, **616**(1-3): 128-133.

Masana et al 2011

NE drugs combination

- Chandramohan Y, Droste SK, Arthur JS, Reul JM** (2008). The forced swimming-induced behavioural immobility response involves histone H3 phosphorylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl-D-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway. *Eur.J.Neurosci.*, **27**(10): 2701-2713.
- Chen Z, Skolnick P** (2007). Triple uptake inhibitors: therapeutic potential in depression and beyond. *Expert.Opin.Investig.Drugs*, **16**(9): 1365-1377.
- Connor TJ, Kelliher P, Harkin A, Kelly JP, et al.** (1999). Reboxetine attenuates forced swim test-induced behavioural and neurochemical alterations in the rat. *Eur.J.Pharmacol.*, **379**(2-3): 125-133.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I** (2002a). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*, **23**(5): 238-245.
- Cryan JF, Page ME, Lucki I** (2002b). Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *Eur.J.Pharmacol.*, **436**(3): 197-205.
- Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I** (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, **29**(4-5): 547-569.
- D'Aquila PS, Collu M, Gessa GL, Serra G** (2000). The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur.J.Pharmacol.*, **405**(1-3): 365-373.

- Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones GS** (1998). Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Res.*, **806**(2): 127-140.
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I** (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*, **121**(1): 66-72.
- Devoto P, Flore G, Pani L, Gessa GL** (2001). Evidence for co-release of noradrenaline and dopamine from noradrenergic neurons in the cerebral cortex. *Mol.Psychiatry*, **6**(6): 657-664.
- Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G** (1983). Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev*, **63**(3): 844-914.
- Goldman-Rakic PS** (1999). The physiological approach: functional architecture of working memory and disordered cognition in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, **46**(5): 650-661.
- Goldman-Rakic PS, Castner SA, Svensson TH, Siever LJ, et al.** (2004). Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)*, **174**(1): 3-16.
- Haddad P** (1999). Do antidepressants have any potential to cause addiction? *J Psychopharmacol*, **13**(3): 300-307.
- Invernizzi RW, Garattini S** (2004). Role of presynaptic alpha2-adrenoceptors in antidepressant action: recent findings from microdialysis studies. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry*, **28**(5): 819-827.

Masana et al 2011

NE drugs combination

- Jones SR, Gainetdinov RR, Jaber M, Giros B, et al.** (1998). Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(7): 4029-4034.
- Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, et al.** (2005). Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, **62**(6): 617-627.
- Krishnan V, Nestler EJ** (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, **455**(7215): 894-902.
- Kuhar MJ, Ritz MC, Boja JW** (1991). The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci*, **14**(7): 299-302.
- Lavergne F, Jay TM** (2010). A new strategy for antidepressant prescription. *Front Neurosci*, **4**: 192.
- Lopez-Munoz F, Rubio G, Alamo C, Garcia-Garcia P, et al.** (2006). Reboxetine addition in patients with mirtazapine-resistant depression: a case series. *Clin. Neuropharmacol.*, **29**(4): 192-196.
- Mague SD, Pliakas AM, Todtenkopf MS, Tomasiewicz HC, et al.** (2003). Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **305**(1): 323-330.
- Masana M, Bortolozzi A, Artigas F** (2011). Selective enhancement of mesocortical dopaminergic transmission by noradrenergic drugs: therapeutic opportunities in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol*, **14**(1): 53-68.
- Mateo Y, Fernandez-Pastor B, Meana JJ** (2001). Acute and chronic effects of desipramine and clorgyline on alpha(2)-adrenoceptors regulating noradrenergic

Masana et al 2011

NE drugs combination

transmission in the rat brain: a dual-probe microdialysis study. *Br J Pharmacol*, **133**(8): 1362-1370.

Mateo Y, Pineda J, Meana JJ (1998). Somatodendritic alpha2-adrenoceptors in the locus coeruleus are involved in the in vivo modulation of cortical noradrenaline release by the antidepressant desipramine. *J.Neurochem.*, **71**(2): 790-798.

Mayberg HS, Lozano AM, Voon V, McNeely HE, et al. (2005). Deep brain stimulation for treatment-resistant depression. *Neuron*, **45**(5): 651-660.

Mazei MS, Pluto CP, Kirkbride B, Pehek EA (2002). Effects of catecholamine uptake blockers in the caudate-putamen and subregions of the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Res.*, **936**(1-2): 58-67.

Millan MJ (2009). Dual- and triple-acting agents for treating core and co-morbid symptoms of major depression: novel concepts, new drugs. *Neurotherapeutics.*, **6**(1): 53-77.

Murray CJ, Lopez AD (1997). Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*, **349**(9063): 1436-1442.

Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, et al. (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, **34**(1): 13-25.

Ortega JE, Fernandez-Pastor B, Callado LF, Meana JJ (2010). In vivo potentiation of reboxetine and citalopram effect on extracellular noradrenaline in rat brain by alpha(2)-adrenoceptor antagonism. *Eur.Neuropsychopharmacol.*, **20**(11): 813-822.

Masana et al 2011

NE drugs combination

- Page ME, Brown K, Lucki I** (2003). Simultaneous analyses of the neurochemical and behavioral effects of the norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine in a rat model of antidepressant action. *Psychopharmacology (Berl)*, **165**(2): 194-201.
- Page ME, Detke MJ, Dalvi A, Kirby LG, et al.** (1999). Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*, **147**(2): 162-167.
- Papakostas GI, Worthington JJ, III, Iosifescu DV, Kinrys G, et al.** (2006). The combination of duloxetine and bupropion for treatment-resistant major depressive disorder. *Depress.Anxiety.*, **23**(3): 178-181.
- Perez V, Gilaberte I, Faries D, Alvarez E, et al.** (1997). Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of pindolol in combination with fluoxetine antidepressant treatment. *Lancet*, **349**(9065): 1594-1597.
- Portella MJ, de Diego-Adelino J, Ballesteros J, Puigdemont D, et al.** (2010). Can we really accelerate and enhance the selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant effect? a randomized clinical trial and a meta-analysis of pindolol in nonresistant depression. *J Clin Psychiatry*.
- Pozzi L, Invernizzi R, Cervo L, Vallebuona F, et al.** (1994). Evidence that extracellular concentrations of dopamine are regulated by noradrenergic neurons in the frontal cortex of rats. *J.Neurochem.*, **63**(1): 195-200.
- Renier JP, Bouvard M, Stinus L** (2001). Idazoxan and 8-OH-DPAT modify the behavioral effects induced by either NA, or 5-HT, or dual NA/5-HT reuptake inhibition in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*, **24**(4): 379-390.

- Renieric JP, Bouvard M, Stinus L** (2002). In the rat forced swimming test, NA-system mediated interactions may prevent the 5-HT properties of some subacute antidepressant treatments being expressed. *Eur Neuropsychopharmacol*, **12**(2): 159-171.
- Renieric JP, Lucki I** (1998). Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*, **136**(2): 190-197.
- Sacchetti G, Bernini M, Bianchetti A, Parini S, et al.** (1999). Studies on the acute and chronic effects of reboxetine on extracellular noradrenaline and other monoamines in the rat brain. *Br.J.Pharmacol.*, **128**(6): 1332-1338.
- Scorza MC, Castane A, Bortolozzi A, Artigas F** (2010). Clozapine does not require 5-HT1A receptors to block the locomotor hyperactivity induced by MK-801 Clz and MK-801 in KO1A mice. *Neuropharmacology*, **59**(1-2): 112-120.
- Seguela P, Watkins KC, Geffard M, Descarries L** (1990). Noradrenaline axon terminals in adult rat neocortex: an immunocytochemical analysis in serial thin sections. *Neuroscience*, **35**(2): 249-264.
- Sora I, Hall FS, Andrews AM, Itokawa M, et al.** (2001). Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**(9): 5300-5305.
- Stone EA, Lehmann ML, Lin Y, Quartermain D** (2007). Reduced evoked fos expression in activity-related brain regions in animal models of behavioral depression. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry*, **31**(6): 1196-1207.

Masana et al 2011

NE drugs combination

Svenningsson P, Tzavara ET, Qi H, Carruthers R, et al. (2007). Biochemical and behavioral evidence for antidepressant-like effects of 5-HT6 receptor stimulation. *J Neurosci*, **27**(15): 4201-4209.

Torres G, Horowitz JM, Laflamme N, Rivest S (1998). Fluoxetine induces the transcription of genes encoding c-fos, corticotropin-releasing factor and its type 1 receptor in rat brain. *Neuroscience*, **87**(2): 463-477.

Trivedi MH (2006). Major depressive disorder: remission of associated symptoms. *J Clin Psychiatry*, **67 Suppl 6**: 27-32.

Trivedi MH, Fava M, Wisniewski SR, Thase ME, et al. (2006). Medication augmentation after the failure of SSRIs for depression. *N.Engl.J.Med.*, **354**(12): 1243-1252.

Woolverton WL, Johnson KM (1992). Neurobiology of cocaine abuse. *Trends Pharmacol Sci*, **13**(5): 193-200.

FIGURES

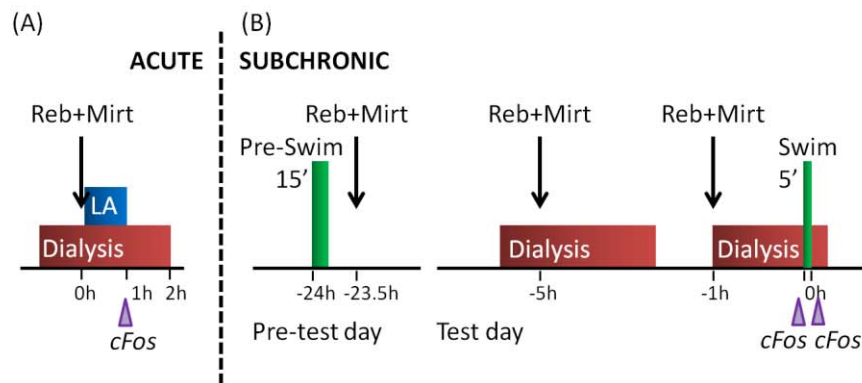


Figure 1. Diagram of the different experimental protocols used for (A) acute and (B) subchronic administration of reboxetine + mirtazapine (Reb+Mirt) or vehicle, following the FST administration protocol. Microdialysis samples (red boxes) were collected before and after acute (single) administration, and also during 2nd and 3rd administration of the subchronic treatments. Locomotor activity (LA, blue box) was measured during 1h right after acute administration treatments. FST protocol (green box) consisted of a pre-swim session of 15 min the day before the test (pre-test day), and a 5 min swim session the test day. Drugs were administered between both swim sessions 23.5, 5 and 1 h before the test (swim). For *in situ* hybridization experiments (*cFos*, purple triangle), animals were decapitated one hour after acute treatment, and 5 min before (pre-swim) and after swim session (post-swim) on the test day. All animals received the pre-swim session on the pre-test day and the three treatment administrations.

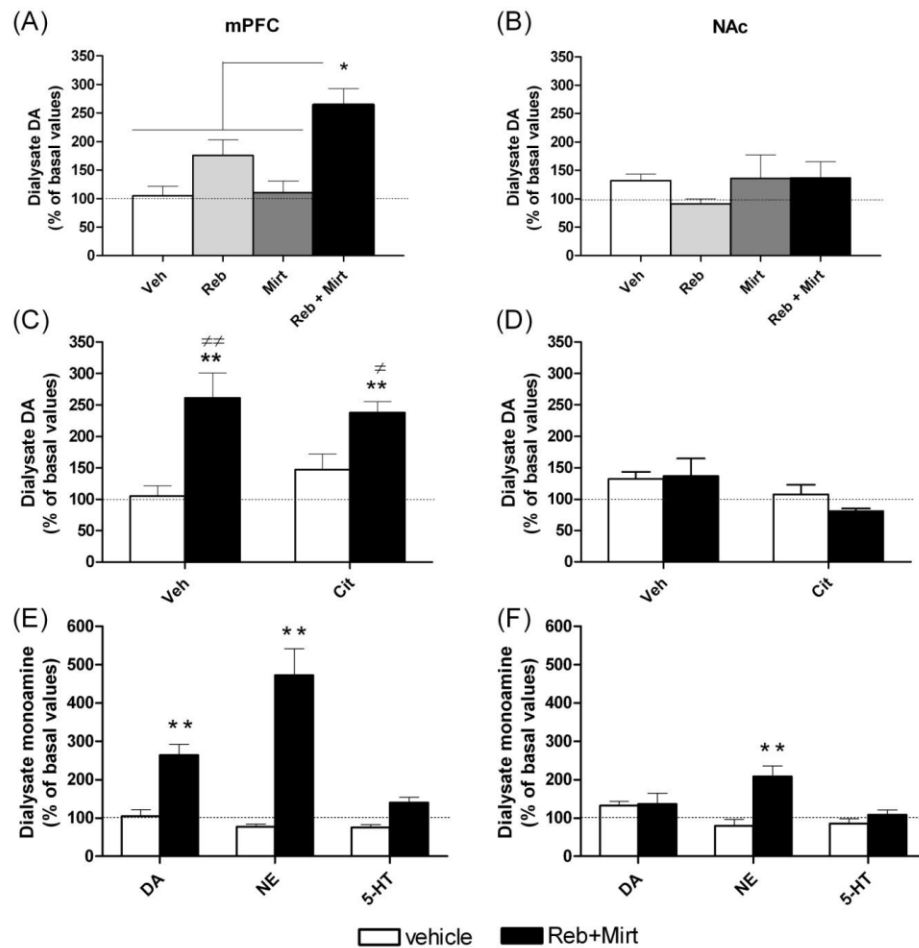


Figure 2. Microdialysis experiments following acute treatment protocol. Bars show the average effect of vehicle (white bar), reboxetine (Reb), mirtazapine (Mirt) and the combination Reb+ Mirt (black bar) in (A) mPFC and (B) in NAc. Citalopram (Cit) pretreatment did not modify the DA increase produced by vehicle or Reb+Mirt neither in (C) mPFC nor (D) NAc. NE levels, but not 5-HT, wa increased in (E) mPFC and (F)

Masana et al 2011

NE drugs combination

NAc. Data are AUC of six 20 min fractions, expressed as percentage of baseline.

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs vehicle; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs Cit.

Masana et al 2011

NE drugs combination

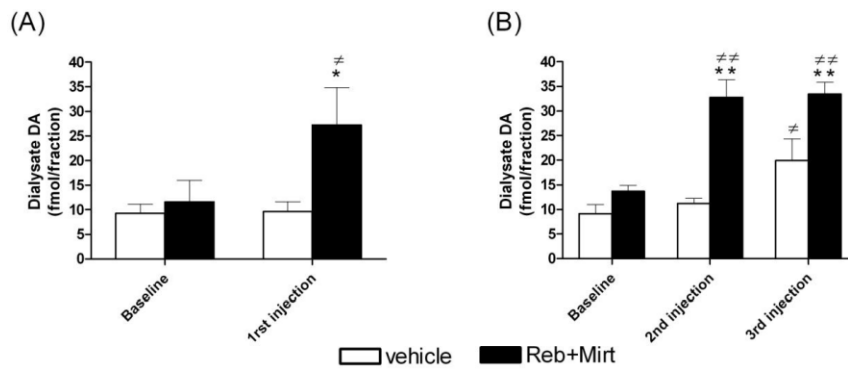


Figure 3. Microdialysis experiments following subchronic treatment. Bars show the average effect of vehicle (white bar) and the combination of reboxetine + mirtazapine (Reb+ Mirt) (black bar) in mPFC. DA output was increased by Reb+Mirt treatment after the first (A), second and third administration (B) of the combination treatment. Data are AUC of six 20-min fractions, expressed as fmol/fraction. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs vehicle; # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs the respective baseline.

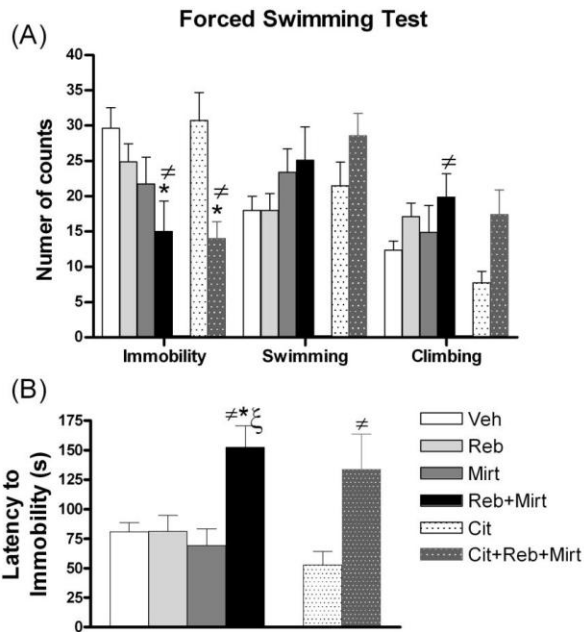


Figure 4. Forced swimming test experiments. Bar graphs showing the effect of treatments on A) immobility, swimming and climbing scores, and B) latency to the first immobility count in the FST. * $p < 0.05$ vs vehicle; # $p < 0.05$ vs citalopram; $\zeta p < 0.05$ vs Reb and Mirt.

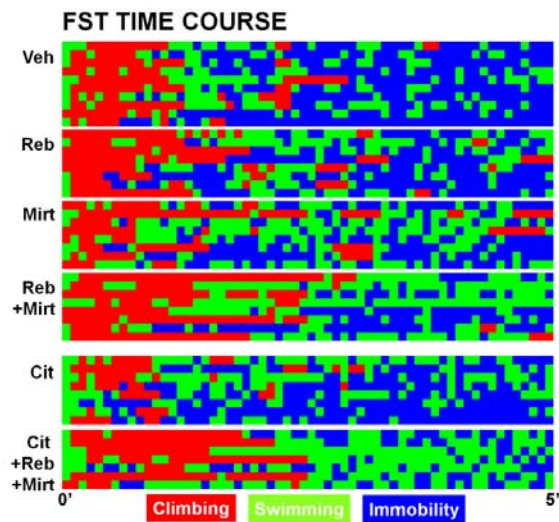


Figure 5. Raw data from forced swimming test (FST) experiments. Each horizontal trace corresponds to a rat. Time (abscissa) corresponds to the 5 min of FST. Each color-coded pixel represents 5-s of behavioral activity (red- climbing, green-swimming, blue-immobility). This representation allows to quickly visualize rat behavior in the FST. Hence, climbing predominates during the first 1-2 minutes. Rats treated with vehicle or subeffective doses of antidepressant drugs rapidly enter into a swimming/immobility behavior. In contrast, rats treated with reboxetine (Reb) + mirtazapine (Mirt) (alone or with citalopram, Cit), persist for longer times in the climbing behavior with much less immobility. These individual data correspond to the same animals than in Figure 3.

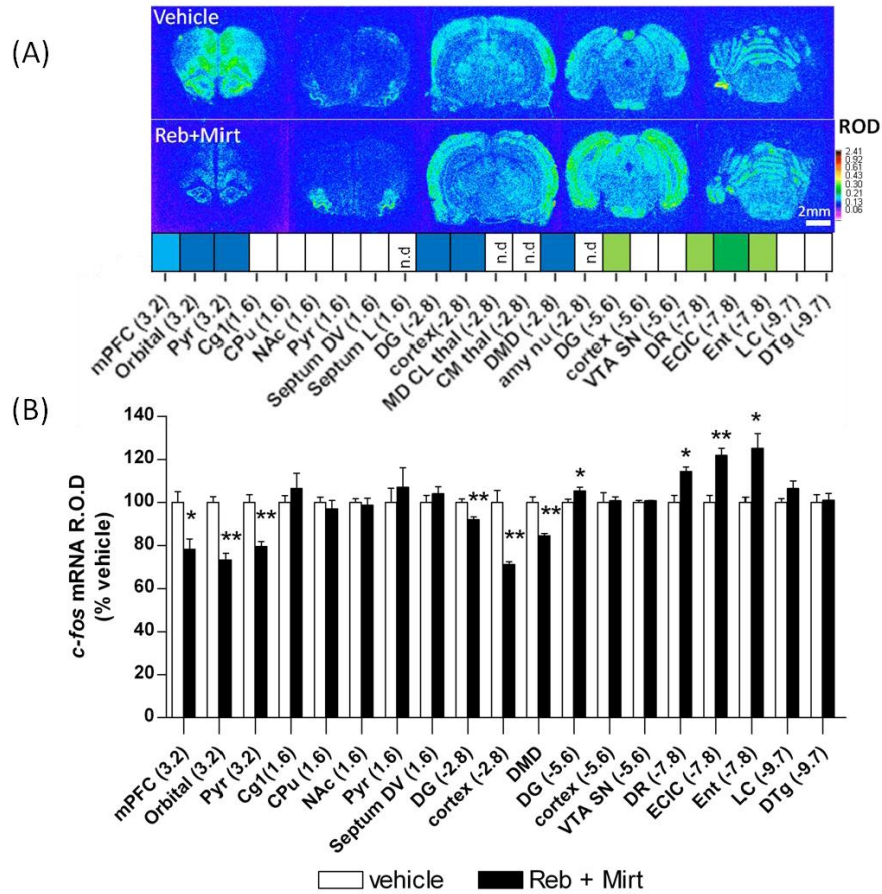


Figure 6. Representative coronal rat brain sections showing *c-fos* mRNA expression at different AP coordinates from bregma (from left to right in mm = 3.2, 1.6, -5.6, -7.8, -9.7), assessed by in situ hybridization. (A) Upper and lower panels show the brain sections of rats treated with vehicle or reboxetine + mirtazapine (Reb+Mirt). Scale bar is 2 mm. (B) Bars represent percentage of change of the *c-fos* mRNA relative optical density (R.O.D) compared to vehicle. Statistical analysis revealed significant effects of treatment in several brain regions. Blue and green frames (A) represent the significant

Masana et al 2011

NE drugs combination

percentages of decrease and increase, respectively, of *c-fos* mRNA expression compared to vehicle-treated controls. Light and dark colors correspond to * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, respectively. n.d (non determined). mPFC, medial prefrontal cortex; Orbital, orbital cortex; pyr, piriform cortex; Cg1, cingulate cortex area 1; CPu, caudate putamen; NAc, nucleus accumbens; Septum DV, lateral septum dorsal and ventral part; septum L, lateral septum intermediate part; DG, dentate gyrus; MD CL thalamus, mediodorsal and centrolateral thalamus; CM thalamus, central medial thalamus; DMD, dorsomedial hypothalamic nucleus, dorsal part; amy nu, amygdaloid nuclei; VTA SN, ventral tegmental area and substantia nigra; DR, dorsal raphe nucleus; ECIC, external cortex of the inferior colliculus; Ent, entorhinal cortex; LC, *locus coeruleus*; DTg, laterodorsal tegmental nucleus.

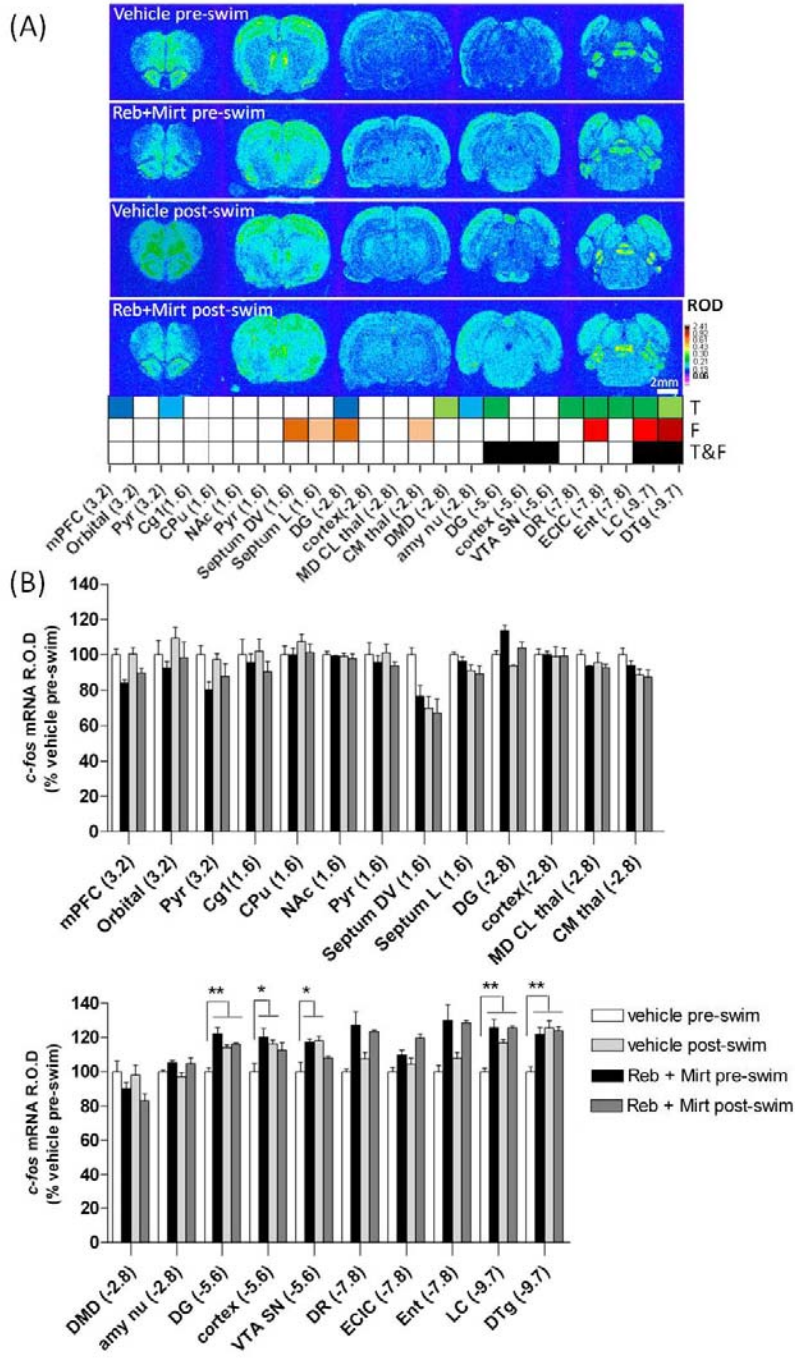


Figure 7. Representative coronal rat brain sections showing *c-fos* mRNA expression at different AP coordinates from bregma (from left to right in mm = 3.2, 1.6, -5.6, -7.8, -9.7), assessed by in situ hybridization. (A) Panels show brain sections of rats treated with vehicle or reboxetine + mirtazapine (Reb+Mirt) before (pre-swim) and after (post-swim) test swim-session. Scale bar is 2 mm. (B) Bars represent percentage of change of the *c-fos* mRNA relative optical density (R.O.D) compared to pre-swim vehicle group of rats. Two-way ANOVA revealed significant effects of treatment (T, blue and green), test swim (F, orange and red), and treatment-FST interaction (T&F, black) in several brain regions. Light color means * $p < 0.05$ and darker colors ** $p < 0.01$. Abbreviations described in Figure 6.

V. *Discussió*

1. Consideracions generals

La principal aportació d'aquesta Tesi Doctoral és la proposta de noves estratègies terapèutiques pel tractament de la depressió i la simptomatologia negativa i cognitiva en esquizofrènia. Aquestes estratègies es basen en l'augment selectiu de DA cortical, sense actuar directament sobre el sistema dopaminèrgic, i per tant, evitant els efectes secundaris que produiria un augment general de la dopamina al cervell. Tal com s'ha descrit àmpliament en la introducció del present treball, la dopamina té un paper clau en la fisiopatologia i tractament de l'esquizofrènia i la depressió. De fet, un augment de dopamina cortical sembla que seria beneficiós pel tractament d'aquestes malalties psiquiàtriques (veure apartat 1.6.3), sobretot en la millora de les funcions cognitives i la simptomatologia negativa d'aquests pacients. En aquest marc, la recerca de la present Tesi Doctoral s'ha dirigit a l'estudi del sistema dopaminèrgic mesocortical i la seva diferenciació del sistema mesolímbic. Concretament, s'han proposat diferents mecanismes pels quals podem modular i augmentar selectivament la neurotransmissió DA cortical, a partir de manipulacions farmacològiques dels sistemes serotoninèrgic i noradrenèrgic.

En primer lloc s'ha avaluat el paper dels receptors de serotonina (5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}) en el mecanisme pel qual els fàrmacs antipsicòtics atípics (FAA) augmenten els nivells de dopamina a l'escorça prefrontal medial. En segon lloc, s'ha fet un estudi sistemàtic de mecanismes de regulació dels sistemes dopaminèrgics mesocortical i mesolímbic. En especial, s'ha estudiat el paper del sistema noradrenèrgic en la regulació dels nivells de DA mesocortical i mesolímbica, a través de mecanismes d'inhibició del transportador NET o de l'autoreceptor α_2 adrenèrgic.

Els presents resultats permeten confirmar que és possible modular de forma diferencial la transmissió dopaminèrgica a EPFm sense actuar de forma directa sobre el sistema dopaminèrgic. Així doncs, podem incrementar la DA cortical amb agonistes del receptor 5-HT_{1A}, mecanisme pel qual els FAA produeixen un augment dels nivells de DA a EPFm (Treball 1). També podem modificar la DA cortical actuant sobre el sistema noradrenèrgic. En concret, en els treballs 2 i 3 es mostra com la co-administració d'un inhibidor del NET i un antagonista del receptor α_2 adrenèrgic permet augmentar els nivells de DA a EPFm sense

alterar-ne l'alliberació en el NAc. Finalment, en el treball 3 també es mostra que aquesta combinació té un gran potencial com a tractament antidepressiu.

El coneixement de mecanismes capaços d'augmentar selectivament la transmissió dopaminèrgica cortical, sense actuar directament sobre el sistema dopaminèrgic, permet abordar noves estratègies farmacològiques amb gran potencial per tractar tant la depressió com els símptomes cognitius i negatius de l'esquizofrènia.

1.1. Modulació dels nivells de dopamina cortical per antipsicòtics. Paper dels receptors 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}

Les aferències excitadores que regulen l'activitat de les neurones dopaminèrgiques de l'ATV inclouen, entre altres, a les neurones piramidals glutamatèrgiques de l'EPFm (Carr and Sesack, 2000; Thierry et al., 1983; Thierry et al., 1979; Tong et al., 1996; Tong et al., 1998). Les neurones piramidals de l'EPFm expressen de manera abundant el receptor 5-HT_{2A} (Amargos-Bosch et al., 2004; Pazos and Palacios, 1985; Santana et al., 2004), incloses les que projecten a l'ATV (Vazquez-Borsetti et al., 2009). De manera que l'activació dels receptors 5-HT_{2A} a EPFm incrementa tant l'activitat de les neurones piramidals (Puig et al., 2003) així com les neurones dopaminèrgiques de l'ATV, produint un augment de l'alliberament de DA mesocortical (Bortolozzi et al., 2005).

D'altra banda, s'ha descrit que els receptors 5-HT_{1A} es localitzen en un 50-60 % de les neurones piramidals de l'EPFm (Santana et al., 2004). L'activació d'aquest receptor a l'EPFm produeix un augment de l'activitat de les neurones piramidals que projecten al ATV (Díaz-Mataix et al., 2006)(Lladó-Pelfort, en preparació) i incrementa l'activitat de les neurones DA i l'alliberació de DA a l'EPFm (Díaz-Mataix et al., 2005).

A més, els fàrmacs antipsicòtics atípics produeixen un augment dels nivells de DA cortical (Bortolozzi et al., 2007; Díaz-Mataix et al., 2005; Ichikawa et al., 2001; Kuroki et al., 1999; Rollema et al., 1997; Westerink et al., 2001) que sembla ser la responsable de la millora dels símptomes negatius/cognitius de l'esquizofrènia (Kane et al., 1988; Keefe et al., 2006; Leucht et al., 2009; Meltzer and McGurk,

1999). Aquest augment de DA cortical produït pel FAA s'ha descrit que depèn de l'activació del receptor 5-HT_{1A} (Diaz-Mataix et al., 2005; Ichikawa et al., 2001; Kuroki et al., 1999; Rollema et al., 2000; Rollema et al., 1997), i concretament, dels receptors 5-HT_{1A} presents a l'EPFm (Diaz-Mataix et al., 2005). Tot i així, els FAA tenen alta afinitat *in vitro* i ocupació *in vivo* pels receptors 5-HT_{2A} (Meltzer et al., 1989; Nyberg et al., 1998; Stockmeier et al., 1993), però baixa o nul·la pel receptor 5-HT_{1A} (Arnt and Skarsfeldt, 1998; Bymaster et al., 1996).

Els resultats obtinguts en la present Tesi han permès confirmar que els FAA requereixen de l'activació dels receptors 5-HT_{1A} a l'EPFm per produir l'augment dels nivells de DA mesocortical. I en contra del que s'havia suggerit prèviament, aquest augment no depèn del bloqueig del receptor 5-HT_{2A} cortical (Bonaccorso et al., 2002; Ichikawa et al., 2001; Liegeois et al., 2002). De fet, l'administració local a EPFm de diferents antipsicòtics atípics com la clozapina, olanzapina i risperidona, produeix un augment similar dels nivells de DA a la mateixa EPFm tant en ratolins control com en ratolins KO pel receptor 5-HT_{2A}, indicant que l'antagonisme pel receptor 5-HT_{2A} no és el responsable de l'augment de DA.

Per contra, l'administració local dels mateixos FAA a EPFm de ratolins KO pel receptor 5-HT_{1A} no produeixen aquest increment de DA. Aquests resultats es van confirmar en rates tractades amb l'agent alquilant EEDQ, de forma que es van inactivar tots els GPCR excepte aquells receptors protegits per l'antagonista corresponent al receptor 5-HT_{1A} o bé al 5-HT_{2A} (WAY-100635 o ritanserina, respectivament). En aquestes condicions, la clozapina va ser capaç d'augmentar la DA cortical en presència d'únicament del receptor 5-HT_{1A} (EEDQ + protecció amb WAY-100635) i no en presència del receptor 5-HT_{2A} (EEDQ + protecció amb ritanserina).

En resum, els resultats confirmen estudis previs on s'indica que és necessari que el receptor 5-HT_{1A} estigui funcionalment actiu a l'EPFm per augmentar els nivells de DA mesocortical. Aquest és un efecte potencialment important per a les accions dels FAA sobre els símptomes negatius i dèficits cognitius en pacients que pateixen malalties psiquiàtriques. Addicionalment, el present estudi aporta per primera vegada que aquests efectes concrets sobre la neurotransmissió DA mesocortical no depenen del receptor 5-HT_{2A}, mentre que no s'oposa a que el bloqueig d'aquest receptor participi en l'acció terapèutica dels FAA.

1.2. **Modulació de la dopamina cortical pel sistema noradrenèrgic**

El sistema dopaminèrgic d'origen en l'ATV presenta una innervació més abundant cap a la via mesolímbica que cap a la via mesocortical (Swanson, 1982). A més, estudis previs indiquen una distribució i densitat dels transportadors de DA diferent en les dues vies (Letchworth et al., 2000; Marshall et al., 1990; Sesack et al., 1998), sent menor a l'EPF en comparació amb l'estriat. Aquestes diferències en la densitat de DAT podrien ser especialment rellevants en la regulació de l'activitat de les neurones DA de l'ATV que projecten cap a les vies mesocortical i mesolímbica. De fet, els resultats obtinguts en aquesta Tesi mostren un major augment de DA produït per la infusió local de l'inhibidor selectiu del DAT en el NAc en comparació amb l'EPFm de rata (treball 2).

En contraposició a la baixa densitat de la proteïna DAT a l'EPFm, aquesta regió rep una densa innervació noradrenèrgica (Seguela et al., 1990), i mostra una gran densitat de NET (Miner et al., 2003; Schroeter et al., 2000). Estudis *in vitro* han descrit que el NET mostra una afinitat per la DA similar a la de la pròpia NE (Gu et al., 1994; Raiteri et al., 1977). De fet, les nostres dades indiquen que el bloqueig *in vivo* del NET amb reboxetina (inhibidor selectiu del NET), tant local com sistèmica, en rates produeix un augment de DA a l'EPFm (treball 2 i 3) però no en el NAc, en concordança amb altres estudis (Bymaster et al., 2002; Carboni et al., 2006; Carboni et al., 1990; Di Chiara et al., 1992; Mazei et al., 2002; Pozzi et al., 1994; Tanda et al., 1994).

Així doncs, els resultats obtinguts confirmen i amplien estudis previs on ja es demostrava que el NET té un paper important en la recaptació de DA a EPFm de rata, mentre que el DAT és més rellevant en el NAc. De fet, els transportadors de monoamines recapten els respectius neurotransmissors mitjançant transport actiu d'ions Na^+/Cl^- . En concret, el DAT necessita dos ions Na^+ i un de Cl^- , mentre que el SERT i NET només un Na^+ i un Cl^- (Iversen, 2006; Torres et al., 2003). Aquesta diferència energètica pel transport actiu de monoamines, juntament amb la major densitat de NET respecte al DAT a EPFm, la similar afinitat de la DA i NE pel NET, i la localització cel·lular del DAT fora de les sinàpsis en l'EPFm de rosegadors (Sesack et al., 1998) podria explicar perquè en presència de DAT i NET, el NET és més actiu recaptant DA de l'espai extracel·lular que no el propi DAT en l'EPFm de rosegadors.

Per altra banda, el treball 2 també ens suggereix que la DA podria estar alliberada per terminals noradrenèrgics. En aquest cas s'ha de tenir en compte que la DA és el precursor de la NE i es troba en les mateixes vesícules sinàptiques. De fet, la lesió del sistema noradrenèrgic amb la toxina DSP-4 va evitar l'augment dels nivells de DA produït per l'inhibidor no selectiu del DAT i NET nomifensina a EPFm, però no en NAc. A més, l'estimulació elèctrica del *locus coeruleus* va produir un augment estímul-depenent de la concentració de DA únicament a l'EPFm, d'acord amb altres estudis que suggerien una coalliberació de DA per terminals NE (Devoto and Flore, 2006; Devoto et al., 2001; Devoto et al., 2005; Kawahara et al., 2001). Per tant, aquests resultats mostren un paper clau del sistema noradrenèrgic sobre l'alliberació de DA a EPFm, en comparació amb el NAc. Aquesta diferència regional sembla concordar amb la relació de fibres NE/DA, que tal com s'ha descrit anteriorment, és molt major en l'EPFm que en el NAc, on en aquesta última regió les fibres dopaminèrgiques són la principal aferència catecolaminèrgica.

En conjunt, aquestes dades ens van suggerir actuar sobre els mecanismes de regulació de les neurones noradrenèrgiques per modular selectivament la DA cortical. Concretament es va utilitzar una estratègia àmpliament descrita per augmentar la transmissió monoaminèrgica, i que involucra l'antagonisme de l'autoreceptor adrenèrgic α_2 juntament amb el bloqueig del NET pel sistema noradrenèrgic (Grandoso et al., 2004; Invernizzi and Garattini, 2004; Mateo et al., 1998) o bé el bloqueig de l'autoreceptor 5-HT_{1A} juntament amb el SERT pel sistema serotoninèrgic (Artigas et al., 1996; Romero and Artigas, 1997).

Així doncs, l'administració conjunta d'un inhibidor del NET com és la reboxetina amb un antagonista del receptor α_2 adrenèrgic com l'RX 821002 (treball 2) o bé la mirtazapina (treball 3), va ser capaç de potenciar l'augment de DA mesocortical -i no la mesolímbica- en comparació amb els mateixos fàrmacs administrats de forma individual. Per tant, els resultats ens indiquen que la modulació del sistema noradrenèrgic permet modificar també els nivells de DA a l'EPFm.

1.3. **Noves estratègies farmacològiques per tractar la esquizofrènia i depressió**

Recentment s'estan utilitzant estratègies de combinació de fàrmacs per millorar el tractament de malalties psiquiàtriques com esquizofrènia i depressió. Varioses regions i circuits cerebrals s'han vist implicats en la fisiopatologia i tractament d'aquestes malalties, on l'escorça prefrontal té un paper clau. Aquests circuits regulen els estats emocionals i les funcions executives, i la seva disfunció s'ha implicat en la seva fisiopatologia i tractament.

Aquest és el cas de la mirtazapina, que s'ha utilitzat com a coadjuvant per millorar el tractament tant en esquizofrènia (Joffe et al., 2009; Poyurovsky et al., 2006) com en depressió (Blier et al., 2010; Carpenter et al., 2002; de la Gandara et al., 2005; Lopez-Munoz et al., 2006). En aquest sentit, la combinació de fàrmacs *per se*, és una bona estratègia per potenciar els efectes dels tractaments antidepressius i antipsicòtics, ja que amplien l'espectre d'acció d'un sol tractament.

Els resultats de la present Tesi ens han permès proposar una nova estratègia concreta per augmentar de forma selectiva la DA cortical, combinant un inhibidor del NET i un antagonista del receptor α_2 adrenèrgic. A més, hem comprovat que l'efecte sobre els nivells de DA extracel·lular es mantenen quan es co-administren ambdós fàrmacs tant amb antipsicòtics clàssics i atípics (treball 2), com amb antidepressius del tipus SSRI (treball 3). Encara més, la interacció sinèrgica entre reboxetina i mirtazapina va produir un marcat efecte antidepressiu en el test de natació forçada, que no es va observar quan els compostos s'administraven de manera individual (treball 3).

Diversos sistemes de neurotransmissors i receptors han estat implicats en la resposta antidepressiva en el test de natació forçada (Cryan et al., 2002b; Page et al., 2003; Page et al., 1999; Reneric and Lucki, 1998). Però el paral·lisme entre els canvis de DA a la EPFm i la resposta comportamental induïts per aquesta combinació de reboxetina i mirtazapina suggereix que un increment de la funció cortical dopaminèrgica -i probablement NE (Mateo et al., 2001; Mateo et al., 1998)- podria estar relacionada amb l'acció antidepressiva d'aquests fàrmacs.

Per altra banda, trobar les dosis adequades dels tractaments és clau per al seu efecte, ja que un augment massa elevat també podria ser perjudicial per les funcions cognitives (Williams and Goldman-Rakic, 1995). En aquest sentit, les dosis de reboxetina i mirtazapina elegides per l'estudi (treball 3) van ser dosis que per si soles són prou baixes i quasi inefectives en l'augment de DA cortical, mentre que la combinació d'aquestes produeix un augment significatiu dels nivells de DA cortical que mostra un gran potencial antidepressiu en el test de natació forçada.

Tot i així, seria necessari un estudi farmacològic i dosis-resposta més detallat per poder generalitzar l'efecte antidepressiu de la combinació concreta de reboxetina + mirtazapina a tots els fàrmacs que bloquegen el NET i antagonitzen el receptor α_2 -adrenèrgic. Precisament, altres estudis que utilitzen fàrmacs amb perfil farmacològic semblant, com l'idazoxan i la desipramina, obtenen resultats diferents als presents quan els fàrmacs es combinen i s'analitza el seu efecte en el FST (Reneric et al., 2001; Zhang et al., 2009). A més, la mirtazapina mostra també cert agonisme pel receptor 5-HT_{1A}, fet que probablement li dóna propietats diferents a la resta d'antagonistes α_2 ja que, a part de l'augment de DA cortical degut a l'antagonisme pel receptor α_2 (Devoto et al., 2004; Millan et al., 2000), l'agonisme que presenta pel receptor 5-HT_{1A} facilita l'augment de DA cortical que produeix la mirtazapina *per se* (Nakayama et al., 2004).

Per últim, és interessant destacar que el tractament combinat de reboxetina + mirtazapina modifica l'expressió del gen *c-fos* comparat amb vehicle i en funció del nivell d'estrès de l'animal (treball 3). Algunes de les regions on s'observen aquests canvis de densitat d'expressió de *c-fos* en la rata es relacionen amb regions cerebrals implicades en els trastorns depressius en malats (Krishnan and Nestler, 2008; Nestler et al., 2002). En general, tant el tractament agut com subcrònic amb aquests fàrmacs va induir canvis similars en l'expressió de *c-fos* amb una densitat augmentada en el nucli del rafe dorsal, escorça entorrinal i gir dentat, i una marcada reducció a l'EPFm. A més, el tractament repetit amb reboxetina + mirtazapina també va incrementar l'expressió de *c-fos* als nuclis catecolaminèrgics del cervell mig (ATV i LC). D'altra banda, els canvis de l'expressió de *c-fos* d'algunes d'aquestes regions, entre elles els nuclis catecolaminèrgics, gir dentat i el nucli tegmental laterodorsal, proveeixen un patró topogràfic d'activitat cerebral associat al test de natació forçada i a les accions neuroanatòmiques selectives de l'associació entre reboxetina i mirtazapina. Per tant, els resultats de la present investigació il·lustren la utilitat

d'avaluar l'expressió del ARNm del *c-fos* amb la finalitat d'examinar la correlació anatòmica i funcional entre el comportament associat a una situació d'estrès i l'acció dels fàrmacs antidepressius.

Finalment, el fet que la reboxetina i la mirtazapina siguin dos antidepressius que s'utilitzen actualment en la pràctica clínica, facilita que aquesta estratègia de combinació de fàrmacs proposada en la present Tesi Doctoral sigui fàcilment traslladable per al seu ús terapèutic, amb l'objectiu de millorar la simptomatologia depressiva i cognitiva tant en pacients esquizofrènics com en depressius resistent al tractament.

VI. *Conclusions*

1. Els antipsicòtics atípics, com la clozapina, olanzapina i risperidona, augmenten l'alliberament de dopamina a l'escorça prefrontal medial de rosegadors per un mecanisme que requereix l'activació del receptor 5-HT_{1A} de serotonina però no el bloqueig del receptor 5-HT_{2A}.
2. La utilització d'inhibidors selectius pel transportador de dopamina i de noradrenalina mostren que en àrees riques en fibres noradrenèrgiques com l'escorça prefrontal de rata, la dopamina es recaptada pels terminals noradrenèrgics.
3. Les lesions dels sistemes dopaminèrgic i noradrenèrgic, així com l'estimulació del *locus coeruleus*, indiquen que l'alliberament de dopamina a escorça prefrontal es produeix principalment en terminals noradrenèrgics. Aquest comportament és diferent en el nucli accumbens, on la dopamina s'allibera i es recapta en terminals dopaminèrgics.
4. El bloqueig dels receptors adrenèrgics α_2 potencia l'augment de dopamina a escorça prefrontal produït per la inhibició del transportador de noradrenalina. Aquest fenomen es manté en presència d'antipsicòtics i obre la porta a la utilització d'aquesta estratègia terapèutica en el tractament dels símptomes negatius i cognitius en esquizofrènia.
5. El bloqueig simultani del transportador de noradrenalina i dels receptors adrenèrgics α_2 produeix un notable augment dels nivells de dopamina i noradrenalina corticals, que es manté en presència de l'inhibidor selectiu de recaptació de serotonina citalopram. Aquest efecte s'acompanya d'un marcat efecte antidepressiu en la prova de la natació forçada, suggerint que la combinació reboxetina + mirtazapina pot ser una nova estratègia antidepressiva basada en un augment de la funció catecolaminèrgica cortical.
7. L'estudi de l'expressió del gen *c-fos* ens permet establir una correlació anatòmica i funcional entre el comportament associat a una situació d'estrès i l'acció de la combinació de reboxetina amb mirtazapina. L'àrea tegmental ventral, el *locus coeruleus*, el gir dentat i el nucli tegmental laterodorsal són regions clau on el tractament varia el seu efecte sobre l'activitat neuronal en funció de l'estat d'estrès de l'animal.

VII. *Bibliografia*

A

- Abi-Dargham A, Mawlawi O, Lombardo I, Gil R, et al.** (2002). Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *J.Neurosci.*, **22**(9): 3708-3719.
- 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**(6): 1361-1367.
- Akil M, Pierri JN, Whitehead RE, Edgar CL, et al.** (1999). Lamina-specific alterations in the dopamine innervation of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects. *Am.J.Psychiatry*, **156**(10): 1580-1589.
- Alvir JM, Lieberman JA, Safferman AZ, Schwimmer JL, et al.** (1993). Clozapine-induced agranulocytosis. Incidence and risk factors in the United States. *N Engl J Med*, **329**(3): 162-167.
- Amargos-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, et al.** (2004). Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, **14**(3): 281-299.
- Andlin-Sobocki P, Jonsson B, Wittchen HU, Olesen J** (2005). Cost of disorders of the brain in Europe. *Eur J Neurol*, **12 Suppl 1**: 1-27.
- Ansorge MS, Hen R, Gingrich JA** (2007). Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Curr Opin Pharmacol*, **7**(1): 8-17.
- Arnt J, Skarsfeldt T** (1998). Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. *Neuropsychopharmacology*, **18**(2): 63-101.
- Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P** (1996). Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT1A antagonists. *Trends Neurosci.*, **19**(9): 378-383.

B

- Beneyto M, Lewis DA** (2010). Insights into the neurodevelopmental origin of schizophrenia from postmortem studies of prefrontal cortical circuitry. *Int J Dev Neurosci.*
- Bishara D, Taylor D** (2008). Upcoming agents for the treatment of schizophrenia: mechanism of action, efficacy and tolerability. *Drugs*, **68**(16): 2269-2292.
- Bjorklund A, Dunnett SB** (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci*, **30**(5): 194-202.
- Blier P, Ward HE, Tremblay P, Laberge L, et al.** (2010). Combination of antidepressant medications from treatment initiation for major depressive disorder: a double-blind randomized study. *Am.J.Psychiatry*, **167**(3): 281-288.

- Boehm S, Kubista H** (2002). Fine tuning of sympathetic transmitter release via ionotropic and metabotropic presynaptic receptors. *Pharmacol Rev*, **54**(1): 43-99.
- Bonaccorso S, Meltzer HY, Li Z, Dai J, et al.** (2002). SR46349-B, a 5-HT(2A/2C) receptor antagonist, potentiates haloperidol-induced dopamine release in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Neuropsychopharmacology*, **27**(3): 430-441.
- Bortolozzi A, Diaz-Mataix L, Scorza MC, Celada P, et al.** (2005). The activation of 5-HT receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. *J.Neurochem.*, **95**(6): 1597-1607.
- Bortolozzi A, Diaz-Mataix L, Toth M, Celada P, et al.** (2007). In vivo actions of aripiprazole on serotonergic and dopaminergic systems in rodent brain. *Psychopharmacology (Berl)*, **191**(3): 745-758.
- Boyajian CL, Loughlin SE, Leslie FM** (1987). Anatomical evidence for alpha-2 adrenoceptor heterogeneity: differential autoradiographic distributions of [3H]rauwolscine and [3H]idazoxan in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*, **241**(3): 1079-1091.
- Breier A, Su TP, Saunders R, Carson RE, et al.** (1997). Schizophrenia is associated with elevated amphetamine-induced synaptic dopamine concentrations: evidence from a novel positron emission tomography method. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **94**(6): 2569-2574.
- Brog JS, Salyapongse A, Deutch AY, Zahm DS** (1993). The patterns of afferent innervation of the core and shell in the "accumbens" part of the rat ventral striatum: immunohistochemical detection of retrogradely transported fluoro-gold. *J Comp Neurol*, **338**(2): 255-278.
- Burki HR, Ruch W, Asper H, Baggiolini M, et al.** (1973). [Pharmacological and neurochemical effects of clozapine (Leponex): new aspects in the drug therapy of schizophrenia]. *Schweiz Med Wochenschr*, **103**(48): 1716-1724.
- Bymaster FP, Calligaro DO, Falcone JF, Marsh RD, et al.** (1996). Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacology*, **14**(2): 87-96.
- Bymaster FP, Katner JS, Nelson DL, Hemrick-Luecke SK, et al.** (2002). Atomoxetine increases extracellular levels of norepinephrine and dopamine in prefrontal cortex of rat: a potential mechanism for efficacy in attention deficit/hyperactivity disorder. *Neuropsychopharmacology*, **27**(5): 699-711.

C

- Carboni E, Silvagni A, Vacca C, Di Chiara G** (2006). Cumulative effect of norepinephrine and dopamine carrier blockade on extracellular dopamine increase in the nucleus accumbens shell, bed nucleus of stria terminalis and prefrontal cortex. *J.Neurochem.*, **96**(2): 473-481.
- Carboni E, Tanda GL, Frau R, Di Chiara G** (1990). Blockade of the noradrenaline carrier increases extracellular dopamine concentrations in the prefrontal cortex: evidence that dopamine is taken up in vivo by noradrenergic terminals. *J.Neurochem.*, **55**(3): 1067-1070.
- Carlsson A** (1978). Antipsychotic drugs, neurotransmitters, and schizophrenia. *Am.J.Psychiatry*, **135**(2): 165-173.
- Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, et al.** (2001). Interactions between monoamines, glutamate, and GABA in schizophrenia: new evidence. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, **41**: 237-260.
- Carpenter LL, Yasmin S, Price LH** (2002). A double-blind, placebo-controlled study of antidepressant augmentation with mirtazapine. *Biol.Psychiatry*, **51**(2): 183-188.
- Carr DB, Sesack SR** (2000). Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J.Neurosci.*, **20**(10): 3864-3873.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, et al.** (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*, **301**(5631): 386-389.
- Castagne V, Porsolt RD, Moser P** (2009). Use of latency to immobility improves detection of antidepressant-like activity in the behavioral despair test in the mouse. *Eur.J.Pharmacol.*, **616**(1-3): 128-133.
- Castner SA, Williams GV, Goldman-Rakic PS** (2000). Reversal of antipsychotic-induced working memory deficits by short-term dopamine D1 receptor stimulation. *Science*, **287**(5460): 2020-2022.
- Chandramohan Y, Droste SK, Arthur JS, Reul JM** (2008). The forced swimming-induced behavioural immobility response involves histone H3 phosphorylation and c-Fos induction in dentate gyrus granule neurons via activation of the N-methyl-D-aspartate/extracellular signal-regulated kinase/mitogen- and stress-activated kinase signalling pathway. *Eur.J.Neurosci.*, **27**(10): 2701-2713.
- Chen Z, Skolnick P** (2007). Triple uptake inhibitors: therapeutic potential in depression and beyond. *Expert.Opin.Investig.Drugs*, **16**(9): 1365-1377.
- Cipriani A, Furukawa TA, Salanti G, Geddes JR, et al.** (2009). Comparative efficacy and acceptability of 12 new-generation antidepressants: a multiple-treatments meta-analysis. *Lancet*, **373**(9665): 746-758.

- Coppen A** (1967). The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry*, **113**(504): 1237-1264.
- Cryan JF, Markou A, Lucki I** (2002a). Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci*, **23**(5): 238-245.
- Cryan JF, Page ME, Lucki I** (2002b). Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *Eur.J.Pharmacol.*, **436**(3): 197-205.
- Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I** (2005). Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, **29**(4-5): 547-569.

D

- D'Aquila PS, Collu M, Gessa GL, Serra G** (2000). The role of dopamine in the mechanism of action of antidepressant drugs. *Eur.J.Pharmacol.*, **405**(1-3): 365-373.
- Dahlstroem A, Fuxe K** (1964). Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons. *Acta Physiol Scand Suppl*: SUPPL 232:231-255.
- Dailly E, Chenu F, Petit-Demouliere B, Bourin M** (2006). Specificity and efficacy of noradrenaline, serotonin depletion in discrete brain areas of Swiss mice by neurotoxins. *J.Neurosci.Methods*, **150**(1): 111-115.
- Davies LM, Barnes TR, Jones PB, Lewis S, et al.** (2008). A randomized controlled trial of the cost-utility of second-generation antipsychotics in people with psychosis and eligible for clozapine. *Value Health*, **11**(4): 549-562.
- de la Gandara J, Aguera L, Rojo JE, Ros S, et al.** (2005). Use of antidepressant combinations: which, when and why? Results of a Spanish survey. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, (428): 32-36.
- DeFelipe J** (2002). Cortical interneurons: from Cajal to 2001. *Prog Brain Res*, **136**: 215-238.
- Delfs JM, Zhu Y, Druhan JP, Aston-Jones GS** (1998). Origin of noradrenergic afferents to the shell subregion of the nucleus accumbens: anterograde and retrograde tract-tracing studies in the rat. *Brain Res.*, **806**(2): 127-140.
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I** (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*, **121**(1): 66-72.

- Deutch AY, Cameron DS** (1992). Pharmacological characterization of dopamine systems in the nucleus accumbens core and shell. *Neuroscience*, **46**(1): 49-56.
- Devoto P, Flore G** (2006). On the Origin of Cortical Dopamine: Is it a Co-Transmitter in Noradrenergic Neurons? *Curr.Neuropharmacol.*, **4**(2): 115-125.
- Devoto P, Flore G, Pani L, Gessa GL** (2001). Evidence for co-release of noradrenaline and dopamine from noradrenergic neurons in the cerebral cortex. *Mol.Psychiatry*, **6**(6): 657-664.
- Devoto P, Flore G, Pira L, Longu G, et al.** (2004). Mirtazapine-induced corelease of dopamine and noradrenaline from noradrenergic neurons in the medial prefrontal and occipital cortex. *Eur.J.Pharmacol.*, **487**(1-3): 105-111.
- Devoto P, Flore G, Saba P, Fa M, et al.** (2005). Stimulation of the locus coeruleus elicits noradrenaline and dopamine release in the medial prefrontal and parietal cortex. *J.Neurochem.*, **92**(2): 368-374.
- Di Chiara G, Tanda GL, Frau R, Carboni E** (1992). Heterologous monoamine reuptake: lack of transmitter specificity of neuron-specific carriers. *Neurochem.Int.*, **20 Suppl**: 231S-235S.
- Di Forti M, Lappin JM, Murray RM** (2007). Risk factors for schizophrenia--all roads lead to dopamine. *Eur Neuropsychopharmacol*, **17 Suppl 2**: S101-107.
- Diaz-Mataix L, Artigas F, Celada P** (2006). Activation of pyramidal cells in rat medial prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area by a 5-HT1A receptor agonist. *Eur.Neuropsychopharmacol.*, **16**(4): 288-296.
- Diaz-Mataix L, Scorza MC, Bortolozzi A, Toth M, et al.** (2005). Involvement of 5-HT1A receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action. *J.Neurosci.*, **25**(47): 10831-10843.
- Dobbs D** (2010). Schizophrenia: The making of a troubled mind. *Nature*, **468**(7321): 154-156.
- Duman RS** (2004). Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *Neuromolecular Med*, **5**(1): 11-25.
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ** (1997). A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry*, **54**(7): 597-606.
- Dunlop BW, Nemeroff CB** (2007). The role of dopamine in the pathophysiology of depression. *Arch Gen Psychiatry*, **64**(3): 327-337.

E

- Elhwuegi AS** (2004). Central monoamines and their role in major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, **28**(3): 435-451.
- Emilien G, Maloteaux JM, Geurts M, Hoogenberg K, et al.** (1999). Dopamine receptors--physiological understanding to therapeutic intervention potential. *Pharmacol Ther*, **84**(2): 133-156.

F

- Fava M, Kendler KS** (2000). Major depressive disorder. *Neuron*, **28**(2): 335-341.
- Fiorica-Howells E, Hen R, Gingrich J, Li Z, et al.** (2002). 5-HT(2A) receptors: location and functional analysis in intestines of wild-type and 5-HT(2A) knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **282**(5): G877-893.
- Floresco SB** (2007). Dopaminergic regulation of limbic-striatal interplay. *J Psychiatry Neurosci*, **32**(6): 400-411.
- Foote SL, Bloom FE, Aston-Jones G** (1983). Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiol Rev*, **63**(3): 844-914.
- Franklin K, Paxinos G** (1997). The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. *San Diego, USA: Academic Press*.
- Fritschy JM, Grzanna R** (1989). Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axon terminals. *Neuroscience*, **30**(1): 181-197.
- Fuchs E, Gould E** (2000). Mini-review: in vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications. *Eur J Neurosci*, **12**(7): 2211-2214.
- Fuster JM** (1997). Network memory. *Trends Neurosci*, **20**(10): 451-459.
- Fuster JM** (2001). The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. *Neuron*, **30**(2): 319-333.

G

- Gerfen CR** (1992). The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci*, **15**(4): 133-139.
- Giros B, Wang YM, Suter S, McLeskey SB, et al.** (1994). Delineation of discrete domains for substrate, cocaine, and tricyclic antidepressant interactions using chimeric dopamine-norepinephrine transporters. *J.Biol.Chem.*, **269**(23): 15985-15988.
- Goff DC, Coyle JT** (2001). The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *Am J Psychiatry*, **158**(9): 1367-1377.

- Gonzalez-Burgos G, Lewis DA** (2008). GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia. *Schizophr Bull*, **34**(5): 944-961.
- Goto Y, Grace AA** (2005). Dopamine-dependent interactions between limbic and prefrontal cortical plasticity in the nucleus accumbens: disruption by cocaine sensitization. *Neuron*, **47**(2): 255-266.
- Goto Y, Grace AA** (2008). Limbic and cortical information processing in the nucleus accumbens. *Trends Neurosci*, **31**(11): 552-558.
- Gouzoulis-Mayfrank E, Hermle L, Thelen B, Sass H** (1998). History, rationale and potential of human experimental hallucinogenic drug research in psychiatry. *Pharmacopsychiatry*, **31 Suppl 2**: 63-68.
- Gozlan H, Laporte AM, Thibault S, Schechter LE, et al.** (1994). Differential effects of N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ) on various 5-HT receptor binding sites in the rat brain. *Neuropharmacology*, **33**(3-4): 423-431.
- Grace AA, Floresco SB, Goto Y, Lodge DJ** (2007). Regulation of firing of dopaminergic neurons and control of goal-directed behaviors. *Trends Neurosci.*, **30**(5): 220-227.
- Grandoso L, Pineda J, Ugedo L** (2004). Comparative study of the effects of desipramine and reboxetine on locus coeruleus neurons in rat brain slices. *Neuropharmacology*, **46**(6): 815-823.
- Groenewegen HJ, 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, Beijer AV, Voorn P** (1999). Convergence and segregation of ventral striatal inputs and outputs. *Ann N Y Acad Sci*, **877**: 49-63.
- Grote HE, Hannan AJ** (2007). Regulators of adult neurogenesis in the healthy and diseased brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, **34**(5-6): 533-545.
- Groves JO** (2007). Is it time to reassess the BDNF hypothesis of depression? *Mol Psychiatry*, **12**(12): 1079-1088.
- Gu H, Wall SC, Rudnick G** (1994). Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. *J.Biol.Chem.*, **269**(10): 7124-7130.

H

- Haddad P** (1999). Do antidepressants have any potential to cause addiction? *J Psychopharmacol*, **13**(3): 300-307.
- Happe HK, Coulter CL, Gerety ME, Sanders JD, et al.** (2004). Alpha-2 adrenergic receptor development in rat CNS: an autoradiographic study. *Neuroscience*, **123**(1): 167-178.

- Harrison G, Hopper K, Craig T, Laska E, et al.** (2001). Recovery from psychotic illness: a 15- and 25-year international follow-up study. *Br J Psychiatry*, **178**: 506-517.
- Harrison PJ** (1999a). Neurochemical alterations in schizophrenia affecting the putative receptor targets of atypical antipsychotics. Focus on dopamine (D1, D3, D4) and 5-HT_{2a} receptors. *Br J Psychiatry Suppl*, (38): 12-22.
- Harrison PJ** (1999b). The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain*, **122 (Pt 4)**: 593-624.
- Harrison PJ, Weinberger DR** (2005). Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry*, **10**(1): 40-68; image 45.
- Hein L, Kobilka BK** (1995). Adrenergic receptor signal transduction and regulation. *Neuropharmacology*, **34**(4): 357-366.
- Holsboer F** (2001). Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord*, **62**(1-2): 77-91.
- Holsboer F, Barden N** (1996). Antidepressants and hypothalamic-pituitary-adrenocortical regulation. *Endocr Rev*, **17**(2): 187-205.
- Hoover WB, Vertes RP** (2007). Anatomical analysis of afferent projections to the medial prefrontal cortex in the rat. *Brain Struct Funct*, **212**(2): 149-179.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, et al.** (1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*, **46**(2): 157-203.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR** (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav*, **71**(4): 533-554.
- <http://kidb.cwru.edu/> PKD.

I

- Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, Fowler WL, et al.** (2001). 5-HT_{2A} and D₂ 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**(5): 1521-1531.
- Insel TR** (2010). Rethinking schizophrenia. *Nature*, **468**(7321): 187-193.
- Invernizzi RW, Garattini S** (2004). Role of presynaptic alpha₂-adrenoceptors in antidepressant action: recent findings from microdialysis studies. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **28**(5): 819-827.
- Iversen L** (2006). Neurotransmitter transporters and their impact on the development of psychopharmacology. *Br J Pharmacol*, **147 Suppl 1**: S82-88.

J

- Jaber M, Robinson SW, Missale C, Caron MG** (1996). Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology*, **35**(11): 1503-1519.
- Joffe G, Terevnikov V, Joffe M, Stenberg JH, et al.** (2009). Add-on mirtazapine enhances antipsychotic effect of first generation antipsychotics in schizophrenia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Schizophr Res*, **108**(1-3): 245-251.
- Joyce JN, Lexow N, Bird E, Winokur A** (1988). Organization of dopamine D1 and D2 receptors in human striatum: receptor autoradiographic studies in Huntington's disease and schizophrenia. *Synapse*, **2**(5): 546-557.

K

- Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H** (1988). Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch.Gen.Psychiatry*, **45**(9): 789-796.
- Kapur S, Seeman P** (2000). Antipsychotic agents differ in how fast they come off the dopamine D2 receptors. Implications for atypical antipsychotic action. *J Psychiatry Neurosci*, **25**(2): 161-166.
- Kargieman L, Santana N, Mengod G, Celada P, et al.** (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**(37): 14843-14848.
- Kawahara H, Kawahara Y, Westerink BH** (2001). The noradrenaline-dopamine interaction in the rat medial prefrontal cortex studied by multi-probe microdialysis. *Eur.J.Pharmacol.*, **418**(3): 177-186.
- Keefe RS, Young CA, Rock SL, Purdon SE, et al.** (2006). One-year double-blind study of the neurocognitive efficacy of olanzapine, risperidone, and haloperidol in schizophrenia. *Schizophr.Res.*, **81**(1): 1-15.
- Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, et al.** (2005a). Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, **62**(6): 593-602.
- Kessler RC, Chiu WT, Demler O, Merikangas KR, et al.** (2005b). Prevalence, severity, and comorbidity of 12-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry*, **62**(6): 617-627.
- King PR, Gundlach AL, Louis WJ** (1995). Quantitative autoradiographic localization in rat brain of alpha 2-adrenergic and non-adrenergic I-receptor binding sites labelled by [3H]rilmepidine. *Brain Res*, **675**(1-2): 264-278.

- Klimek V, Schenck JE, Han H, Stockmeier CA, et al.** (2002). Dopaminergic abnormalities in amygdaloid nuclei in major depression: a postmortem study. *Biol Psychiatry*, **52**(7): 740-748.
- Kopin IJ** (1985). Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol Rev*, **37**(4): 333-364.
- Krishnan V, Nestler EJ** (2008). The molecular neurobiology of depression. *Nature*, **455**(7215): 894-902.
- Kuroki T, Meltzer HY, Ichikawa J** (1999). Effects of antipsychotic drugs on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **288**(2): 774-781.

L

- Laruelle M, Abi-Dargham A, Gil R, Kegeles L, et al.** (1999). Increased dopamine transmission in schizophrenia: relationship to illness phases. *Biol.Psychiatry*, **46**(1): 56-72.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Gil R, et al.** (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**(17): 9235-9240.
- Lavergne F, Jay TM** (2010). A new strategy for antidepressant prescription. *Front Neurosci*, **4**: 192.
- Leh SE, Petrides M, Strafella AP** (2010). The neural circuitry of executive functions in healthy subjects and Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology*, **35**(1): 70-85.
- Letchworth SR, Smith HR, Porrino LJ, Bennett BA, et al.** (2000). Characterization of a tropane radioligand, [(3)H]2beta-propanoyl-3beta-(4-tolyl) tropane ([[(3)H]PTT), for dopamine transport sites in rat brain. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, **293**(2): 686-696.
- Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, et al.** (2009). Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet*, **373**(9657): 31-41.
- Levy ML, Cummings JL, Fairbanks LA, Masterman D, et al.** (1998). Apathy is not depression. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, **10**(3): 314-319.
- Levy R, Dubois B** (2006). Apathy and the functional anatomy of the prefrontal cortex-basal ganglia circuits. *Cereb Cortex*, **16**(7): 916-928.
- Lewis DA, Gonzalez-Burgos G** (2006). Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia. *Nat.Med.*, **12**(9): 1016-1022.
- Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW** (2005). Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nat Rev Neurosci*, **6**(4): 312-324.

- Lewis DA, Lieberman JA** (2000). Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron*, **28**(2): 325-334.
- Lewis DA, Sweet RA** (2009). Schizophrenia from a neural circuitry perspective: advancing toward rational pharmacological therapies. *J Clin Invest*, **119**(4): 706-716.
- Lieberman JA** (2004). Dopamine partial agonists: a new class of antipsychotic. *CNS Drugs*, **18**(4): 251-267.
- Liegeois JF, Ichikawa J, Meltzer HY** (2002). 5-HT(2A) receptor antagonism potentiates haloperidol-induced dopamine release in rat medial prefrontal cortex and inhibits that in the nucleus accumbens in a dose-dependent manner. *Brain Res*, **947**(2): 157-165.
- Llinas RR** (1977). Depolarization-release coupling systems in neurons. *Neurosci Res Program Bull*, **15**(4): 555-687.
- Lopez-Gimenez JF, Tecott LH, Palacios JM, Mengod G, et al.** (2002). Serotonin 5-HT (2C) receptor knockout mice: autoradiographic analysis of multiple serotonin receptors. *J Neurosci Res*, **67**(1): 69-85.
- Lopez-Munoz F, Rubio G, Alamo C, Garcia-Garcia P, et al.** (2006). Reboxetine addition in patients with mirtazapine-resistant depression: a case series. *Clin. Neuropharmacol.*, **29**(4): 192-196.

M

- Marshall JF, O'Dell SJ, Navarrete R, Rosenstein AJ** (1990). Dopamine high-affinity transport site topography in rat brain: major differences between dorsal and ventral striatum. *Neuroscience*, **37**(1): 11-21.
- Marwaha S, Johnson S, Bebbington P, Stafford M, et al.** (2007). Rates and correlates of employment in people with schizophrenia in the UK, France and Germany. *Br J Psychiatry*, **191**: 30-37.
- Masson J, Sagne C, Hamon M, El Mestikawy S** (1999). Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol Rev*, **51**(3): 439-464.
- Mateo Y, Fernandez-Pastor B, Meana JJ** (2001). Acute and chronic effects of desipramine and clorgyline on alpha(2)-adrenoceptors regulating noradrenergic transmission in the rat brain: a dual-probe microdialysis study. *Br J Pharmacol*, **133**(8): 1362-1370.
- Mateo Y, Pineda J, Meana JJ** (1998). Somatodendritic alpha2-adrenoceptors in the locus coeruleus are involved in the in vivo modulation of cortical noradrenaline release by the antidepressant desipramine. *J. Neurochem.*, **71**(2): 790-798.

- Mazei MS, Pluto CP, Kirkbride B, Pehek EA** (2002). Effects of catecholamine uptake blockers in the caudate-putamen and subregions of the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Res.*, **936**(1-2): 58-67.
- Meltzer HY** (1999). The role of serotonin in antipsychotic drug action. *Neuropsychopharmacology*, **21**(2 Suppl): 106S-115S.
- Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC** (1989). Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin₂ pKi values. *J Pharmacol Exp Ther*, **251**(1): 238-246.
- Meltzer HY, McGurk SR** (1999). The effects of clozapine, risperidone, and olanzapine on cognitive function in schizophrenia. *Schizophr.Bull.*, **25**(2): 233-255.
- Mengod G, Vilaro MT, Raurich A, Lopez-Gimenez JF, et al.** (1996). 5-HT receptors in mammalian brain: receptor autoradiography and in situ hybridization studies of new ligands and newly identified receptors. *Histochem J*, **28**(11): 747-758.
- Meredith GE** (1999). The synaptic framework for chemical signaling in nucleus accumbens. *Ann N Y Acad Sci*, **877**: 140-156.
- Millan MJ** (2006). Multi-target strategies for the improved treatment of depressive states: Conceptual foundations and neuronal substrates, drug discovery and therapeutic application. *Pharmacol.Ther.*, **110**(2): 135-370.
- Millan MJ** (2009). Dual- and triple-acting agents for treating core and co-morbid symptoms of major depression: novel concepts, new drugs. *Neurotherapeutics.*, **6**(1): 53-77.
- Millan MJ, Gobert A, Rivet JM, Adhumeau-Auclair A, et al.** (2000). Mirtazapine enhances frontocortical dopaminergic and corticolimbic adrenergic, but not serotonergic, transmission by blockade of alpha₂-adrenergic and serotonin_{2C} receptors: a comparison with citalopram. *Eur.J.Neurosci.*, **12**(3): 1079-1095.
- Miller EK, Cohen JD** (2001). An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci*, **24**: 167-202.
- Miller EK, Freedman DJ, Wallis JD** (2002). The prefrontal cortex: categories, concepts and cognition. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **357**(1424): 1123-1136.
- Miner LH, Schroeter S, Blakely RD, Sesack SR** (2003). Ultrastructural localization of the norepinephrine transporter in superficial and deep layers of the rat prelimbic prefrontal cortex and its spatial relationship to probable dopamine terminals. *J Comp Neurol*, **466**(4): 478-494.
- Mita T, Hanada S, Nishino N, Kuno T, et al.** (1986). Decreased serotonin S₂ and increased dopamine D₂ receptors in chronic schizophrenics. *Biol Psychiatry*, **21**(14): 1407-1414.
- Mogenson GJ, Jones DL, Yim CY** (1980). From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol*, **14**(2-3): 69-97.

- Moron JA, Brockington A, Wise RA, Rocha BA, et al.** (2002). Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. *J.Neurosci.*, **22**(2): 389-395.
- Murray RM, Lappin J, di Forti M** (2008). Schizophrenia: from developmental deviance to dopamine dysregulation. *Eur.Neuropsychopharmacol.*, **18 Suppl 3**: S129-S134.

N

- Nakayama K, Sakurai T, Katsu H** (2004). Mirtazapine increases dopamine release in prefrontal cortex by 5-HT_{1A} receptor activation. *Brain Res Bull*, **63**(3): 237-241.
- Nelson AJ, Thur KE, Marsden CA, Cassaday HJ** (2010). Dissociable roles of dopamine within the core and medial shell of the nucleus accumbens in memory for objects and place. *Behav Neurosci*, **124**(6): 789-799.
- Nemeroff CB** (2007). The burden of severe depression: a review of diagnostic challenges and treatment alternatives. *J Psychiatr Res*, **41**(3-4): 189-206.
- Nestler EJ, Barrot M, DiLeone RJ, Eisch AJ, et al.** (2002). Neurobiology of depression. *Neuron*, **34**(1): 13-25.
- Nestler EJ, Carlezon WA, Jr.** (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol.Psychiatry*, **59**(12): 1151-1159.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS** (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*, **15**(11): 7539-7547.
- Nicola SM** (2007). The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology (Berl)*, **191**(3): 521-550.
- Nierenberg AA, Amsterdam JD** (1990). Treatment-resistant depression: definition and treatment approaches. *J Clin Psychiatry*, **51 Suppl**: 39-47; discussion 48-50.
- Nutt DJ** (2006). The role of dopamine and norepinephrine in depression and antidepressant treatment. *J Clin Psychiatry*, **67 Suppl 6**: 3-8.
- Nyberg S, Dencker SJ, Malm U, Dahl ML, et al.** (1998). D(2)- and 5-HT(2) receptor occupancy in high-dose neuroleptic-treated patients. *Int J Neuropsychopharmacol*, **1**(2): 95-101.

O

- Okubo Y, Suhara T, Suzuki K, Kobayashi K, et al.** (1997). Decreased prefrontal dopamine D1 receptors in schizophrenia revealed by PET. *Nature*, **385**(6617): 634-636.
- Page ME, Brown K, Lucki I** (2003). Simultaneous analyses of the neurochemical and behavioral effects of the norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine in a rat model of antidepressant action. *Psychopharmacology (Berl)*, **165**(2): 194-201.

P

- Page ME, Detke MJ, Dalvi A, Kirby LG, et al.** (1999). Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*, **147**(2): 162-167.
- Papakostas GI** (2006). Dopaminergic-based pharmacotherapies for depression. *Eur.Neuropsychopharmacol.*, **16**(6): 391-402.
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, et al.** (1998). Increased anxiety of mice lacking the serotonin1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**(18): 10734-10739.
- Patil ST, Zhang L, Martenyi F, Lowe SL, et al.** (2007). Activation of mGlu2/3 receptors as a new approach to treat schizophrenia: a randomized Phase 2 clinical trial. *Nat Med*, **13**(9): 1102-1107.
- Paxinos G, Watson C** (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney: Academic.
- Pazos A, Cortes R, Palacios JM** (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res*, **346**(2): 231-249.
- Pazos A, Gonzalez AM, Pascual J, Meana JJ, et al.** (1988). Alpha 2-adrenoceptors in human forebrain: autoradiographic visualization and biochemical parameters using the agonist [3H]UK-14304. *Brain Res*, **475**(2): 361-365.
- Pazos A, Palacios JM** (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res*, **346**(2): 205-230.
- Pennartz CM, Berke JD, Graybiel AM, Ito R, et al.** (2009). Corticostriatal Interactions during Learning, Memory Processing, and Decision Making. *J Neurosci*, **29**(41): 12831-12838.
- Philipp M, Hein L** (2004). Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes. *Pharmacol Ther*, **101**(1): 65-74.
- Pineyro G, Blier P** (1999). Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. *Pharmacol Rev*, **51**(3): 533-591.

- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M** (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol*, **47**(4): 379-391.
- Poyurovsky M, Pashinian A, Weizman R, Fuchs C, et al.** (2006). Low-dose mirtazapine: a new option in the treatment of antipsychotic-induced akathisia. A randomized, double-blind, placebo- and propranolol-controlled trial. *Biol Psychiatry*, **59**(11): 1071-1077.
- Pozzi L, Invernizzi R, Cervo L, Vallebuona F, et al.** (1994). Evidence that extracellular concentrations of dopamine are regulated by noradrenergic neurons in the frontal cortex of rats. *J.Neurochem.*, **63**(1): 195-200.
- Puig MV, Celada P, Diaz-Mataix L, Artigas F** (2003). In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT_{2A} receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cereb.Cortex*, **13**(8): 870-882.

R

- Raiteri M, del Carmine R, Bertolini A, Levi G** (1977). Effect of sympathomimetic amines on the synaptosomal transport of noradrenaline, dopamine and 5-hydroxytryptamine. *Eur.J.Pharmacol.*, **41**(2): 133-143.
- Raymond JR, Hnatowich M, Lefkowitz RJ, Caron MG** (1990). Adrenergic receptors. Models for regulation of signal transduction processes. *Hypertension*, **15**(2): 119-131.
- Reichenberg A, Caspi A, Harrington H, Houts R, et al.** (2010). Static and dynamic cognitive deficits in childhood preceding adult schizophrenia: a 30-year study. *Am J Psychiatry*, **167**(2): 160-169.
- Renic JP, Bouvard M, Stinus L** (2001). Idazoxan and 8-OH-DPAT modify the behavioral effects induced by either NA, or 5-HT, or dual NA/5-HT reuptake inhibition in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*, **24**(4): 379-390.
- Renic JP, Lucki I** (1998). Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*, **136**(2): 190-197.
- Reynolds GP** (1995). Neurotransmitter systems in schizophrenia. *Int Rev Neurobiol*, **38**: 305-339.
- Riedemann T, Patchev AV, Cho K, Almeida OF** (2010). Corticosteroids: way upstream. *Mol Brain*, **3**(1): 2.
- Robbins TW** (2000). Chemical neuromodulation of frontal-executive functions in humans and other animals. *Exp Brain Res*, **133**(1): 130-138.
- Robinson DG, Woerner MG, McMeniman M, Mendelowitz A, et al.** (2004). Symptomatic and functional recovery from a first episode of

schizophrenia or schizoaffective disorder. *Am J Psychiatry*, **161**(3): 473-479.

Rollema H, Lu Y, Schmidt AW, Sprouse JS, et al. (2000). 5-HT(1A) receptor activation contributes to ziprasidone-induced dopamine release in the rat prefrontal cortex. *Biol.Psychiatry*, **48**(3): 229-237.

Rollema H, Lu Y, Schmidt AW, Zorn SH (1997). Clozapine increases dopamine release in prefrontal cortex by 5-HT1A receptor activation. *Eur.J.Pharmacol.*, **338**(2): R3-R5.

Romero L, Artigas F (1997). Preferential potentiation of the effects of serotonin uptake inhibitors by 5-HT1A receptor antagonists in the dorsal raphe pathway: role of somatodendritic autoreceptors. *J.Neurochem.*, **68**(6): 2593-2603.

Rose JE, Woolsey CN (1947). The Orbitofrontal Cortex and Its Connections with the Mediodorsal Nucleus in Rabbit, Sheep and Cat. *Research Publications-Association for Research in Nervous and Mental Disease*, (27): 210-232.

Roth BL, Sheffler DJ, Kroeze WK (2004). Magic shotguns versus magic bullets: selectively non-selective drugs for mood disorders and schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov*, **3**(4): 353-359.

S

Sachar EJ, Baron M (1979). The biology of affective disorders. *Annu Rev Neurosci*, **2**: 505-517.

Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, et al. (2004). Expression of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex*, **14**(10): 1100-1109.

Savitz J, Drevets WC (2009a). Bipolar and major depressive disorder: neuroimaging the developmental-degenerative divide. *Neurosci.Biobehav.Rev.*, **33**(5): 699-771.

Savitz J, Lucki I, Drevets WC (2009). 5-HT(1A) receptor function in major depressive disorder. *Prog.Neurobiol.*, **88**(1): 17-31.

Savitz JB, Drevets WC (2009b). Imaging phenotypes of major depressive disorder: genetic correlates. *Neuroscience*, **164**(1): 300-330.

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

Schildkraut JJ (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*, **122**(5): 509-522.

Schroeter S, Apparsundaram S, Wiley RG, Miner LH, et al. (2000). Immunolocalization of the cocaine- and antidepressant-sensitive l-norepinephrine transporter. *J.Comp Neurol.*, **420**(2): 211-232.

- Scorza MC, Castane A, Bortolozzi A, Artigas F** (2010). Clozapine does not require 5-HT1A receptors to block the locomotor hyperactivity induced by MK-801 Clz and MK-801 in KO1A mice. *Neuropharmacology*, **59**(1-2): 112-120.
- Seeman P, Lee T** (1975). Antipsychotic drugs: direct correlation between clinical potency and presynaptic action on dopamine neurons. *Science*, **188**(4194): 1217-1219.
- Seeman P, Weinschenker D, Quirion R, Srivastava LK, et al.** (2005). Dopamine supersensitivity correlates with D2High states, implying many paths to psychosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **102**(9): 3513-3518.
- Seguela P, Watkins KC, Geffard M, Descarries L** (1990). Noradrenaline axon terminals in adult rat neocortex: an immunocytochemical analysis in serial thin sections. *Neuroscience*, **35**(2): 249-264.
- Selemon LD, Goldman-Rakic PS** (1999). The reduced neuropil hypothesis: a circuit based model of schizophrenia. *Biol Psychiatry*, **45**(1): 17-25.
- Sesack SR, Grace AA** (2010). Cortico-Basal Ganglia reward network: microcircuitry. *Neuropsychopharmacology*, **35**(1): 27-47.
- Sesack SR, Hawrylak VA, Matus C, Guido MA, et al.** (1998). Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *J.Neurosci.*, **18**(7): 2697-2708.
- Shah PJ, Ogilvie AD, Goodwin GM, Ebmeier KP** (1997). Clinical and psychometric correlates of dopamine D2 binding in depression. *Psychol Med*, **27**(6): 1247-1256.
- Shih JC, Zhu QS, Grimsby J, Chen K** (1994). Identification of human monoamine oxidase (MAO) A and B gene promoters. *J Neural Transm Suppl*, **41**: 27-33.
- Simon GE** (2003). Social and economic burden of mood disorders. *Biol Psychiatry*, **54**(3): 208-215.
- Slattery DA, Hudson AL, Nutt DJ** (2004). Invited review: the evolution of antidepressant mechanisms. *Fundam Clin Pharmacol*, **18**(1): 1-21.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM** (1995a). Effects of stress on neurotrophic factor expression in the rat brain. *Ann N Y Acad Sci*, **771**: 234-239.
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM** (1995b). Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci*, **15**(3 Pt 1): 1768-1777.
- Sorensen HJ, Mortensen EL, Schiffman J, Reinisch JM, et al.** (2010). Early developmental milestones and risk of schizophrenia: a 45-year follow-up of the Copenhagen Perinatal Cohort. *Schizophr Res*, **118**(1-3): 41-47.

- Starke K, Taube HD, Borowski E** (1977). Pre- and postsynaptic receptors in catecholaminergic transmission. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, **297 Suppl 1**: S43-44.
- Stockmeier CA, DiCarlo JJ, Zhang Y, Thompson P, et al.** (1993). Characterization of typical and atypical antipsychotic drugs based on in vivo occupancy of serotonin₂ and dopamine₂ receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, **266**(3): 1374-1384.
- Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS** (2000). Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry*, **157**(10): 1552-1562.
- Swanson LW** (1982). The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. *Brain Res Bull*, **9**(1-6): 321-353.
- Swanson LW** (1998). Brain maps: structure of the rat brain. *Elsevier Amsterdam. Synaptic transmission in rat cerebral cortex*, (82): 2989-2999.
- Swartz MS, Stroup TS, McEvoy JP, Davis SM, et al.** (2008). What CATIE found: results from the schizophrenia trial. *Psychiatr Serv*, **59**(5): 500-506.
- Szot P, Miguez C, White SS, Franklin A, et al.** (2010). A comprehensive analysis of the effect of DSP4 on the locus coeruleus noradrenergic system in the rat. *Neuroscience*, **166**(1): 279-291.

T

- Tanda G, Carboni E, Frau R, Di Chiara G** (1994). Increase of extracellular dopamine in the prefrontal cortex: a trait of drugs with antidepressant potential? *Psychopharmacology (Berl)*, **115**(1-2): 285-288.
- Thierry AM, Chevalier G, Ferron A, Glowinski J** (1983). Diencephalic and mesencephalic efferents of the medial prefrontal cortex in the rat: electrophysiological evidence for the existence of branched axons. *Exp Brain Res*, **50**(2-3): 275-282.
- Thierry AM, Deniau JM, Feger J** (1979). Effects of stimulation of the frontal cortex on identified output VMT cells in the rat. *Neurosci Lett*, **15**(2-3): 102-107.
- Tong ZY, Overton PG, Clark D** (1996). Stimulation of the prefrontal cortex in the rat induces patterns of activity in midbrain dopaminergic neurons which resemble natural burst events. *Synapse*, **22**(3): 195-208.
- Tong ZY, Overton PG, Martinez-Cue C, Clark D** (1998). Do non-dopaminergic neurons in the ventral tegmental area play a role in the responses elicited in A10 dopaminergic neurons by electrical stimulation of the prefrontal cortex? *Exp Brain Res*, **118**(4): 466-476.

- Tork I** (1990). Anatomy of the serotonergic system. *Ann N Y Acad Sci*, **600**: 9-34; discussion 34-35.
- Torres GE, Gainetdinov RR, Caron MG** (2003). Plasma membrane monoamine transporters: structure, regulation and function. *Nat Rev Neurosci*, **4**(1): 13-25.
- Tremblay LK, Naranjo CA, Graham SJ, Herrmann N, et al.** (2005). Functional neuroanatomical substrates of altered reward processing in major depressive disorder revealed by a dopaminergic probe. *Arch.Gen.Psychiatry*, **62**(11): 1228-1236.
- Trivedi MH, Claassen CA, Grannemann BD, Kashner TM, et al.** (2007). Assessing physicians' use of treatment algorithms: Project IMPACTS study design and rationale. *Contemp Clin Trials*, **28**(2): 192-212.
- Trivedi MH, Daly EJ** (2008). Treatment strategies to improve and sustain remission in major depressive disorder. *Dialogues Clin Neurosci*, **10**(4): 377-384.
- Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Nierenberg AA, et al.** (2006). Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry*, **163**(1): 28-40.
- Tsuang M** (2000). Schizophrenia: genes and environment. *Biol Psychiatry*, **47**(3): 210-220.

U

- Uylings HB, Groenewegen HJ, Kolb B** (2003). Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res*, **146**(1-2): 3-17.

V

- Vaidya VA, Marek GJ, Aghajanian GK, Duman RS** (1997). 5-HT_{2A} receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *J Neurosci*, **17**(8): 2785-2795.
- Vazquez-Borsetti P, Cortes R, Artigas F** (2009). Pyramidal neurons in rat prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area and dorsal raphe nucleus express 5-HT_{2A} receptors. *Cereb Cortex*, **19**(7): 1678-1686.
- Vertes RP** (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, **51**(1): 32-58.
- Vertes RP** (2006). Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience*, **142**(1): 1-20.

Vijayraghavan S, Wang M, Birnbaum SG, Williams GV, et al. (2007). Inverted-U dopamine D1 receptor actions on prefrontal neurons engaged in working memory. *Nat.Neurosci.*, **10**(3): 376-384.

W

Weinberger DR (1987). Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia. *Arch.Gen.Psychiatry*, **44**(7): 660-669.

Weinberger DR, Aloia MS, Goldberg TE, Berman KF (1994). The frontal lobes and schizophrenia. *J.Neuropsychiatry Clin.Neurosci.*, **6**(4): 419-427.

Weinberger DR, Berman KF, Chase TN (1988). Mesocortical dopaminergic function and human cognition. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **537**: 330-338.

Weisstaub NV, Zhou M, Lira A, Lambe E, et al. (2006). Cortical 5-HT2A receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science*, **313**(5786): 536-540.

Westerink BH, Kawahara Y, De Boer P, Geels C, et al. (2001). Antipsychotic drugs classified by their effects on the release of dopamine and noradrenaline in the prefrontal cortex and striatum. *Eur.J.Pharmacol.*, **412**(2): 127-138.

Williams GV, Goldman-Rakic PS (1995). Modulation of memory fields by dopamine D1 receptors in prefrontal cortex. *Nature*, **376**(6541): 572-575.

Wong DF, Wagner HN, Jr., Tune LE, Dannals RF, et al. (1986). Positron emission tomography reveals elevated D2 dopamine receptors in drug-naive schizophrenics. *Science*, **234**(4783): 1558-1563.

Woodberry KA, Giuliano AJ, Seidman LJ (2008). Premorbid IQ in schizophrenia: a meta-analytic review. *Am J Psychiatry*, **165**(5): 579-587.

Z

Zhang HT, Whisler LR, Huang Y, Xiang Y, et al. (2009). Postsynaptic alpha-2 adrenergic receptors are critical for the antidepressant-like effects of desipramine on behavior. *Neuropsychopharmacology*, **34**(4): 1067-1077.