

Tesis de Doctorado

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas

Área Biología, Subárea Neurociencias

Regiones, circuitos y bases moleculares involucradas en la sintomatología positiva y trastornos cognitivos inducidos por un modelo farmacológico de esquizofrenia.

Aportes a la terapéutica.

Departamento de Neurofarmacología Experimental
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

MSc. Ximena López Hill

Orientadora: Dra. Cecilia Scorza

Tribunal de Tesis:

Dra. Giselle Prunell (Presidenta)

Dra. Laura Quintana

Dr. Ignacio Carrera

Agosto 2019

Indice

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	3
PRESENTACIÓN DEL TEMA DE TESIS.....	5
I. INTRODUCCIÓN.....	6
1. Conceptos generales sobre la patología de Esquizofrenia.....	6
1.1. Epidemiología de la esquizofrenia.....	6
1.2. Síntomas y curso de la enfermedad.....	6
1.3. Etiología de la enfermedad.....	9
1.4. Tratamiento de la Esquizofrenia.....	11
1.5. Hipótesis Neuroquímicas asociadas a la sintomatología de Esquizofrenia.....	13
1.5.1. Hipótesis Glutamatérgica (vía NMDA-R) de la esquizofrenia.....	14
1.5.2. Glutamato y características generales del NMDA-R.....	15
1.6. Fisiopatología de la Esquizofrenia.....	18
1.6.1. Alteraciones estructurales y funcionales del SNC en la esquizofrenia.....	19
2. Región del Tálamo y su relevancia en la esquizofrenia.....	21
2.1. Estructura anatómica básica del tálamo y su naturaleza neuroquímica.....	22
2.2. Alteraciones estructurales, funcionales y neuroquímicas del tálamo vinculadas a la esquizofrenia	23
3. Aportes pre-clínicos al estudio de las bases anatómicas y moleculares de la esquizofrenia.....	26
3.1. Antagonistas del NMDA-R como modelo farmacológico para el estudio preclínico de la neurobiología de la esquizofrenia y su tratamiento.....	26
3.1.1. Antagonistas del NMDA-R y su relación con los síntomas tipo-psicóticos.....	27
3.1.2. Antagonistas del NMDA-R y su relación con el déficit cognitivo.....	27
3.1.3. Antagonistas del NMDA-R y su relación con el deterioro del procesamiento sensorial y trastornos afectivos.....	28
3.1.4. Antagonistas del NMDA-R y su relación con los circuitos tálamo-corticales.....	29
3.2. Hipótesis de desinhibición GABAérgica de los antagonistas del NMDA-R.....	31
3.3. Papel de la subunidad GluN2C de los NMDA-Rs en las acciones de los antagonistas del NMDA-R.....	33

4. Antecedentes de trabajo particulares para el desarrollo de la Tesis.....	34
4.1. Estudios sobre bases neurales del antagonismo del NMDA-R asociado a la sintomatología positiva.....	34
4.2. Estudio sobre el déficit cognitivo inducido por el antagonismo del NMDA-R observado en el LT y su tratamiento.....	37
II. HIPÓTESIS GENERAL.....	41
III. OBJETIVO GENERAL.....	41
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	42
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	43
1. Animales.....	43
2. Drogas.....	43
3. Cirugía Estereotáxica.....	44
4. Paradigmas comportamentales.....	44
5. Técnicas bioquímicas y análisis.....	47
6. Análisis estadístico.....	50
VI. ESTRATÉGIAS EXPERIMENTALES.....	51
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
Capítulo 1 Resultados I	61
Publicación Científica 1.....	62
Capítulo 1 Resultados II	69
Manuscrito en preparación.....	70
Capítulo 2 Resultados	78
Publicación Científica 2.....	81
Publicación Científica 3.....	82
VIII. CONCLUSIONES GENERALES.....	88
IX. PERSPECTIVAS.....	90
X. BIBLIOGRAFÍA.....	92

Palabras claves: Antagonistas NMDA-R, núcleo anterior del tálamo, núcleo reticular del tálamo, desinhibición GABAérgica, Subunidad GluN2C

ABREVIATURAS

5-HT: Serotonina

5-HT1A: Receptor serotoninérgico del tipo 1A

5-HT2A: Receptor serotoninérgico del tipo 2A

5-HT2c: Receptor serotoninérgico del tipo 2C

5-HT7: Receptor serotoninérgico del tipo 7

AAT: Antipsicóticos atípicos

AMPA-R: Receptor Glutamatérgico tipo AMPA

AT: Antipsicóticos típicos

ATN: Núcleo anterior del tálamo

BCA: Ensayo de ácido bicinconínico

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro

CA: Modelo de campo abierto

CA1: Subregión 1 del Cuerpo de Ammonis

Cg: CPF Cingulada

Clz: Clozapina

CPF: Corteza prefrontal

CPFm: CPF medial

CPu: Caudado-putamen

DA: Dopamina

DG: Giro dentado

EC: Corteza entorrinal

ELISA: Ensayo de inmuno-absorción ligado a enzimas

Fra-2: Producto del gen de expresión temprana fra2

Fra-2-IR: Inmuno-reactividad para la proteína Fra-2

GABAA-R: Receptor GABAérgico tipo A

Glu: Glutamato

Gluérgica: Glutamatérgica

GluN: Subunidades del Receptor Glutamatérgico tipo NMDA

GluN2C: Subunidad 2C del NMDA-R

HC: Hipocampo
HC: Hipocampo
IEGs: Genes de expresión temprana
IL: CPF Infralímbica
Ket: ketamina
KO-GluN2C: Knock-out GluN2C
LT: Modelo Latencia de Transferencia
LTP: Potenciación a largo plazo
M1: Receptor muscarínico tipo 1
MDT: Núcleo medio dorsal del tálamo
mGluR: Receptor Gluérgico metabotrópico
MK-801: Dizocilpina
NAc, Sh: Núcleo accumbens Shell
NAc,co: Núcleo accumbens core
NAc: Núcleo accumbens
NMDA-R: Receptor N-metil-D-aspartato
PCP: Fenciclidina
PET: Tomografía por emisión de positrones
PPI: Modelo de Inhibición pre-pulso
PrL: CPF Prelímbica
RD2: Receptor dopaminérgicos del tipo D2
RSC: Corteza Retrosplenial
RTN: Núcleo reticular del tálamo
Sb: Subículo ventral del hipocampo
SCM: Síndrome comportamental motor
SNC: Sistema nervioso central
 α 1: Receptor adrenérgico tipo alfa 1
 α 2: Receptor adrenérgico tipo alfa 2

RESUMEN

La esquizofrenia es un trastorno neuropsiquiátrico crónico caracterizado por la manifestación de síntomas positivos (alucinaciones, delirios y psicosis), negativos (aislamiento social, anhedonia) y trastornos cognitivos (memoria ejecutiva, atención, aprendizaje). Si bien su etiología es desconocida, evidencias clínicas han llevado a postular la hipótesis de una hipofunción glutamatérgica mediada por el receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA-R) en la base de su fisiopatología, aunque los circuitos anatómicos y las bases moleculares continúan bajo estudio. Sobre esta base, la utilización de antagonistas del NMDA-R, fenciclidina-PCP, ketamina y dizocilpina-MK-801, constituye uno de los modelos farmacológicos más utilizados para estudiar la neurobiología de base de la patología. La administración sistémica en roedores de PCP, ketamina y MK-801 (el antagonista más potente) induce una exacerbación motora caracterizada por hiperlocomoción, estereotipias y signos de ataxia, comportamientos asociados a la sintomatología positiva (comportamientos tipo-psicóticos), mientras que altera procesos de aprendizaje-memoria que modelaría los trastornos cognitivos de la enfermedad. Si bien hay regiones cerebrales que podrían participar en la inducción de estas alteraciones comportamentales (corteza prefrontal, núcleos del tálamo, caudado-putamen, hipocampo) aún no están claros los circuitos neurales y los mecanismos a través de los cuales los antagonistas del NMDA-R generan dichas acciones.

El objetivo de la Tesis se centró en el estudio de las bases anatómicas y moleculares implicadas en la sintomatología positiva y los trastornos cognitivos de la esquizofrenia. Antecedentes de nuestro laboratorio y evidencia de la literatura, nos permitieron proponer que el circuito conformado por el núcleo reticular del tálamo (RTN), el núcleo anterior del tálamo (ATN) y sus regiones de proyección directa, hipocampo (HC) y corteza retrosplenial (RSC), son sustratos de las alteraciones motoras tipo-psicóticas y cognitivas inducidas por MK-801 en ratas. Nos basamos además en la hipótesis que los efectos motores tipo-psicóticos son mediados por el bloqueo preferencial de NMDA-Rs expresados en neuronas GABAérgicas del RTN generando una desinhibición GABAérgica de las proyecciones hacia el ATN y sus regiones de proyección. Se piensa además que dicha preferencia se debe al bloqueo de NMDA-Rs conformados con la subunidad GluN2C, la cual confiere propiedades especiales al NMDA-R.

Abordajes farmacológicos, conductuales e inmuno-histoquímicos en ratas macho adultas fueron aplicados en el desarrollo de la Tesis.

Los resultados de este trabajo indicaron que, la desinhibición GABAérgica del ATN (generada por la microinyección local de bicuculina, antagonista GABAA-R) provocó una respuesta conductual tipo-psicótica similar, aunque de menor magnitud, a la observada luego de la administración sistémica de MK-801. Sin embargo, dicha respuesta comportamental se asoció a un patrón de expresión de Fra-2 (marcador de actividad neuronal) parcialmente diferente al observado por MK-801 sistémico. Por otro lado, no se observaron cambios en la respuesta de memoria espacial-episódica luego de la desinhibición GABAérgica del ATN evaluada en el modelo de latencia de transferencia. Ambos resultados sugieren la participación de regiones/circuitos diferentes en las acciones tipo-psicóticas y de déficit cognitivo, inducidas por el antagonista del NMDA-R. En concordancia, la hiperlocomoción inducida por la administración sistémica de MK-801 o PCP, no se vió atenuada en ratones *knock-out* para la subunidad GluN2C, mientras que los signos de ataxia fueron disminuidos significativamente. Estos resultados sugieren el reclutamiento de subunidad GluN2C expresadas en otra región (cerebelo) y no las que se expresan en el RTN. Por otro lado, Clozapina microinyectada en el ATN no bloqueó, sino que potenció la alteración motora tipo-psicótica inducida por MK-801 sistémico, sugiriendo que Clozapina, a través de determinados receptores expresados en ATN, podría estar alterando el balance excitatorio/inhibitorio de la región sin producir el efecto antipsicótico esperado. Finalmente, se determinó que el déficit cognitivo de MK-801 en el modelo latencia de transferencia es dependiente del nivel de BDNF en el HC pero no en la RSC; mientras que el efecto terapéutico demostrado por Clozapina no involucra al BDNF como molécula mediadora. Este trabajo aporta conocimiento sobre las bases neurales, moleculares y terapéuticas de la sintomatología de la esquizofrenia.

PRESENTACIÓN DEL TEMA DE TESIS

El trabajo de Tesis se centró en el estudio de la participación del circuito cerebral conformado por el núcleo anterior del tálamo (ATN), sus aferencias provenientes del núcleo reticular del tálamo (RTN) y sus aferencias principales hacia el hipocampo (HC) y la corteza retrosplenial (RSC), en las acciones farmacológicas de los antagonistas del receptor NMDA, vinculadas a la sintomatología positiva y déficit cognitivo de la enfermedad. Resultados previos del grupo determinaron que el ATN es sustrato neural clave en las acciones comportamentales tipo-psicóticas del antagonista del NMDA-R, MK-801. Sin embargo, restaba confirmar si era la desinhibición del ATN el mecanismo subyacente a los cambios comportamentales inducidos por MK-801 así como otras regiones que conectan con el ATN, si existe o no una acción preferencial de los antagonistas del NMDA-R por dicho circuito, si subyace además en la alteración cognitiva inducida por el antagonismo del NMDA-R y si es sustrato de la acción farmacológica de clozapina, antipsicótico atípico.

Esta tesis contiene resultados que fueron incluidos en cuatro trabajos científicos, tres de ellos ya publicados y un manuscrito en preparación:

- **López Hill X**, Richeri A, McGregor R, Acuña A, Scorza C. *Neuro-behavioral effects after systemic administration of MK-801 and disinhibition of the anterior thalamic nucleus in rats: Potential relevance in schizophrenia*. Brain Res. 1718: 176-185, 2019.
- Mireia Tarrés-Gatius, Lluís Miquel-Rio, **Ximena López-Hill**, Laura Castarlenas, Sara Fabius, Noemí Santana, Francesc Artigas, María Cecilia Scorza, Anna Castañé. *Influence of GluN2C subunit in the neurochemical and psychotomimetic-like effects induced by systemic administration of two NMDA-R antagonists, MK-801 and PCP: GluN2C knockout vs WT mice*. Manuscrito en preparación, 2019.
- **López Hill X**, Richeri A, Scorza MC. *Clozapine blockade of MK-801-induced learning/memory impairment in the mEPM: Role of 5-HT1A receptors and hippocampal BDNF levels*. Physiol Behav. 179: 346-352, 2017.
- **Ximena López Hill**, Analía Richeri, María Cecilia Scorza. *Measure of anxiety-related behaviors and hippocampal BDNF levels associated to the amnesic effect induced by MK-801 evaluated in the modified elevated plus-maze in rats*. Physiol Behav. 147: 359-63, 2015.

I. INTRODUCCIÓN

1. Conceptos generales sobre la patología de Esquizofrenia

1.1. Epidemiología de la esquizofrenia

La esquizofrenia es un desorden mental crónico y grave que afecta la forma en que una persona piensa, siente y actúa. En el año 2016 fue clasificada como una de las 15 principales causas de discapacidad a nivel global, medida en años vividos con discapacidad [Global Health Metrics 2016]. Su incidencia anual es de aproximadamente 0,4 % y su prevalencia de vida de aproximadamente el 0,7 % y se manifiesta en una relación de 1.4:1 entre hombres y mujeres, respectivamente [McGrath y Susser 2009]. A pesar de que los datos epidemiológicos muestran valores relativamente bajos en relación a otras patologías, la carga sanitaria, social y económica que este desorden psiquiátrico representa para los pacientes, sus familias, cuidadores y la sociedad en general, es muy alta [Chong y cols. 2016]. Según las investigaciones realizadas, los costos directos e indirectos generados por éste trastorno oscilan entre el 1,6 % y el 2,6 % del gasto total en atención de la salud lo que representa un 0,02-1,65 % del producto bruto nacional de los países evaluados [Chong y cols. 2016]. Estos altos costos, en parte, han sido asociados a la temprana edad de su inicio, a su naturaleza incurable y a la persistencia de sus síntomas. Además, las personas que padecen este desorden mental poseen un riesgo de mortalidad 2,5 veces mayor que la población en general, lo que reduce su expectativa de vida entre 10 y 20 años [Chesney y cols. 2014]. El elevado índice de mortalidad se vincula a una mayor tasa de suicidios registrada para los pacientes con esquizofrenia y a la existencia de una amplia gama de condiciones somáticas co-mórbidas asociadas, las cuales llevan a un mayor riesgo de muerte prematura [Palmer y cols. 2005; Brown 1997].

1.2. Síntomas y curso de la enfermedad

La sintomatología de la esquizofrenia se clasifica en tres categorías: 1) los síntomas positivos o síntomas psicóticos los cuales se caracterizan por la aparición de alucinaciones (visuales, auditivas, táctiles o gustativas), alteración en la percepción, alteración en el comportamiento, ansiedad exagerada, discurso alterado, delirios y paranoia, 2) los síntomas negativos, los cuales se caracterizan por un empobrecimiento de la capacidad emocional, apatía o falta de interés, expresión facial disminuida, pérdida de motivación y

un grave aislamiento social, hecho que dificulta una correcta integración del individuo en la sociedad, y 3) los trastornos cognitivos, los cuales implican alteraciones en las funciones cognitivas básicas y ejecutivas. Funciones tales como la atención/vigilancia, la memoria y el aprendizaje, manifestándose como la incapacidad para aprender nueva información o en la evocación de tareas o información aprendida previamente. Las funciones cognitivas ejecutivas, especialmente en la memoria de trabajo, en la capacidad de planificar, iniciar y regular las conductas dirigidas a objetivos, se ven seriamente alteradas. Está reportado que los trastornos cognitivos comienzan a manifestarse mucho antes del inicio de la enfermedad. Esto ha llevado a la propuesta que podrían utilizarse como posibles predictores del desorden psiquiátrico. A su vez, las patologías co-mórbidas, tales como los trastornos de ansiedad y el consumo de drogas de abuso, son muy frecuentes en pacientes con esquizofrenia [Lewis y Lieberman 2000; Kapur y Remington 2001].

Los síntomas descritos generalmente comienzan a manifestarse en la adolescencia tardía o en las primeras etapas de la edad adulta. Sin embargo, actualmente se reconoce que la esquizofrenia es un trastorno de por vida que comienza desde el nacimiento y se manifiesta a lo largo de la vida con diferentes manifestaciones y etapas [Tandon y cols. 2009; ver Figura 1]. Es muy frecuente observar que, previo al primer episodio psicótico, los pacientes ya presenten ciertos síntomas, permitiendo distinguir dos fases: una **fase premórbida** (Figura 1), que ocurre durante la infancia temprana y la niñez. En esta fase se puede observar que algunos de los hitos que se dan durante estas etapas del desarrollo, como por ejemplo, comenzar a caminar, se inician tardíamente y de manera errática. Además, se pueden observar síntomas neurológicos leves, ansiedad social, anomalías neuromotoras, falta de amigos y una disminución en el rendimiento escolar entre los 8 y los 11 años [Fish 1957; Fish y cols. 1992]. La siguiente es la **fase prodrómica** (Figura 1), la cual ocurre durante la adolescencia temprana y media. En ella se observan alteraciones de la conducta como aislamiento social, pérdida de interés por el trabajo o el estudio, deterioro del cuidado personal, alteraciones del humor y también síntomas psicóticos atenuados. Esta fase muchas veces es confundida con un trastorno depresivo u otro trastorno del humor [Lewis 2000; McGorry y cols 2006; Holder y Wayhs 2014]. La aparición de los síntomas psicóticos suele ocurrir entre los 17 y los 25 años en los hombres y algo más tarde (20-30 años) en las mujeres. Este hecho se define como el **primer episodio psicótico**, en el cual, generalmente, se diagnostica por primera vez a los pacientes con esquizofrenia. Junto a este primer episodio psicótico, suelen manifestarse también prominentes síntomas negativos y un sustancial deterioro cognitivo [Lewis y Lieberman 2000].



Figura 1. Diagrama representativo del curso clínico y fisiopatológico de la esquizofrenia en sus diversas etapas clínicas. Imagen adaptada de Lewis 2000.

Generalmente, los síntomas positivos son episodios psicóticos intermitentes que, en raras ocasiones, están presentes como síntomas crónicos, mientras que los síntomas negativos y los trastornos cognitivos suelen ser persistentes. A su vez, siguiendo un tratamiento adecuado, los pacientes generalmente logran reducir o incluso remitir los síntomas psicóticos, aunque los síntomas negativos y los trastornos cognitivos suelen permanecer [Lewis y Lieberman 2000]. Además, esta fase de episodios psicóticos recurrentes, con deterioro, generalmente se desencadena por una falta de adherencia a los medicamentos. Es frecuentemente observado que luego de una primera recuperación, varios de los pacientes eventualmente interrumpen su tratamiento, hecho que produce una reaparición repetida de los síntomas psicóticos, una respuesta menos eficaz de los medicamentos antipsicóticos y una creciente prominencia de los síntomas negativos y los trastornos cognitivos. Este proceso eventualmente lleva a un marcado deterioro clínico, el cual constituye el sello distintivo de la esquizofrenia. Este proceso conduce a una etapa final de la enfermedad en la que los pacientes gravemente afectados presentan síntomas persistentes y una discapacidad funcional profunda. Curiosamente, este patrón de deterioro clínico es más pronunciado en las primeras etapas de la enfermedad (primeros 5 a 10 años) y luego, en la mayoría de los casos, alcanza una meseta [Figura 1; Harvey 2012].

1.3. Etiología de la enfermedad

La causa o las causas subyacentes a la enfermedad de la esquizofrenia aún hoy continúan siendo desconocidas. Sin embargo, existen diversos factores de riesgo que parecen explicar la aparición y desarrollo de la enfermedad. A partir de estudios epidemiológicos con familias, gemelos y de adopción se encontró que existe un importante componente genético que contribuye de forma sustancial a la causa subyacente de la esquizofrenia [Owen y cols. 2016; Wray y Vissche 2010]. Varios *loci* genéticos, en varios cromosomas, que confieren cierta susceptibilidad para el desarrollo de éste trastorno mental han sido mapeados sugiriendo que la enfermedad es causada por la interacción de muchos componentes genéticos diferentes [Wray y Vissche 2010]. Sin embargo, aunque se haya logrado establecer claramente una base genética para la esquizofrenia, el mecanismo preciso de herencia no se ha esclarecido completamente ya que el mismo es complejo y no se ajusta a un modo típico de herencia, como el autosómico dominante, el vinculado al sexo o al mitocondrial. De hecho, alrededor de dos tercios de las personas con esquizofrenia no tienen un familiar de primer o segundo grado que padezca el desorden. Por lo tanto, la presencia de antecedentes familiares no es una condición necesaria ni suficiente para padecer la enfermedad; muchos pacientes no los presentan y muchas personas sanas sí [Sullivan 2005]. Si bien se ha demostrado que la esquizofrenia tiene un componente genético prominente hasta ahora no se ha encontrado un único gen que ejerza una influencia tan fuerte. Parece haber una fuerte interacción entre factores genéticos y no genéticos con una relevante influencia en la génesis del trastorno [Sullivan y cols. 2003; 2005]. Diversos estudios epidemiológicos han permitido identificar diferentes componentes ambientales como posibles factores de riesgo. Estos incluyen factores de riesgo biológicos y psicosociales que podrían producirse durante los períodos prenatal y perinatal, la infancia temprana y tardía, la adolescencia y la edad adulta temprana [Mäki y cols. 2005]. La exposición al estrés durante la gestación, por infecciones virales, o privación nutricional, así como complicaciones durante el embarazo o parto (diabetes, asfixia, atonía uterina) son alguno de los factores de riesgo ambientales bien establecidos. También el sufrimiento de estrés socio-económico (nacer y/o residir en poblaciones urbanas, estatus de migrante en lugares de gran inmigración) ha sido vinculado con un aumento en el riesgo de desarrollar la enfermedad [Allardice y Boydell 2006]. Es interesante que muchos de estos factores de riesgo ambientales ocurren durante los años de desarrollo, antes de que se diagnostique la enfermedad, apoyando la hipótesis de que la esquizofrenia podría tener un origen relacionado a aquellas alteraciones que se dan durante el desarrollo

neurológico [Marengo y Weinberger 2000]. Algunos de estos factores y su valor de importancia relativa se presentan en la Figura 2.

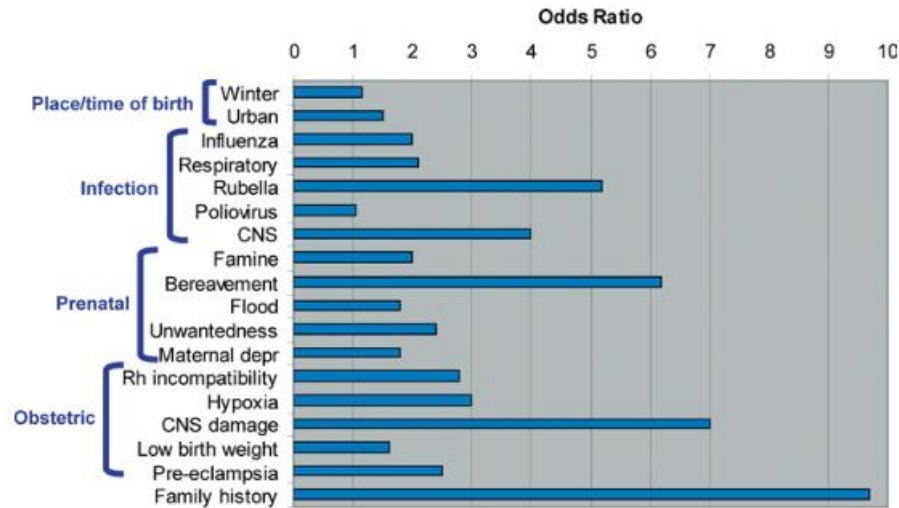


Figura 2. Comparación de un conjunto seleccionado de factores de riesgo relativamente bien establecidos para la esquizofrenia centrándose en los períodos pre y perinatal (abreviaciones: CNS, sistema nervioso central; depr, depresión; Rh, Rhesus; Odds Ratio: índice de relación de asociación entre dos variables; Odd Ratio=1 cuando no existe asociación entre las dos variables comparadas). Adaptado de Sullivan 2005.

Sin embargo, es importante destacar que los factores de riesgo ambiental por si solos, únicamente aumentan moderadamente el riesgo de desarrollar esquizofrenia, dado que, no se relacionan exclusivamente con éste desorden mental. Por ejemplo, se sabe que la infección prenatal también aumenta el riesgo de varios otros trastornos, como el autismo, el trastorno bipolar y la depresión [Machon y cols. 1997]. Por lo tanto, se piensa que factores genéticos y ambientales deben considerarse juntos ya que ambos son importantes en la etiología de la esquizofrenia y ninguno parece operar de forma aislada [Tsuang 2000; Tandon y cols. 2009].

Otro factor de riesgo esta vinculado al consumo de sustancias psicotomiméticas tales como el Cannabis (marihuana) y drogas de abuso psicoestimulantes (cocaína, pasta base de cocaína, anfetamina), sobre todo durante la edad de la adolescencia [Tsuang 2000; McGrath y Susser 2009; Bota y cols. 2011]. Algunos expertos cuestionan esta relación causa-efecto, y sugieren que el consumo de Cannabis estaría precipitando la manifestación de la esquizofrenia en individuos vulnerables o modificando de algún modo su expresión, sin aumentar el riesgo de desarrollarla [Degenhardt y Hall 2006; Barnes 2006].

A pesar de lo expresado, aún no se comprende cómo interactúan los diversos factores genéticos y ambientales para provocar la esquizofrenia y mediante qué precisos mecanismos neurobiológicos la generan.

1.4. Tratamiento de la Esquizofrenia

Los fármacos antipsicóticos son el pilar del tratamiento para la esquizofrenia [Bruijnzeel y cols. 2014]. Sin embargo, los que existen en la clínica hoy en día no son del todo adecuados para el tratamiento de una proporción sustancial de los pacientes [Harvey y Rosenthal 2016]. Además, el uso de los antipsicóticos actuales logra aliviar alguno de los síntomas de la enfermedad pero sin detener su curso y sin lograr resultados exitosos sustanciales a largo plazo [Bruijnzeel y cols. 2014].

Se diferencian dos tipos de antipsicóticos: los clásicos o típicos (AT) y los atípicos -o de segunda generación- (AAT) [Bruijnzeel y cols. 2014; Köster y cols. 2014]. Aunque existe una variedad de compuestos que integran ambos tipos, fármacos como el Haloperidol o la Clozapina, son los prototípicos para definir los AT y AAT, respectivamente. Si bien ambos tipos son altamente efectivos para el tratamiento de los síntomas positivos, existen grandes diferencias entre ambos fármacos en relación al perfil de los efectos secundarios que generan y, en relación a su eficacia sobre los otros síntomas de la enfermedad [Lieberman y cols. 2005; Miyamoto y cols. 2012]. Así, los AAT son considerados como los más eficaces para disminuir los síntomas negativos y trastornos cognitivos -en particular la Clozapina, en comparación con los AT. Sin embargo, distan de ser un tratamiento ideal debido a que no son efectivos en todos los pacientes y a los severos efectos secundarios que generan (agranulocitosis, obesidad, embotamiento en el pesamiento) que muchas veces obligan a detener el tratamiento [Leucht y cols. 2009; Kapur y Remington 2001]. Por lo tanto, continúa siendo un desafío encontrar fármacos antipsicóticos más eficaces y específicos para el tratamiento de este desorden mental [Nutt y Need 2014].

Se ha propuesto que el perfil de atipicidad de los AAT se podría explicar por su perfil farmacológico diferente al de los AT. Mientras que AT se caracterizan por ser potentes antagonistas de receptores dopaminérgicos del tipo D2 (RD2) y alcanzan su eficacia terapéutica con una ocupación del 80 % de estos receptores, la mayoría de los AAT poseen mayor afinidad por el subtipo de receptor serotoninérgico 5-HT_{2A} comparado con la afinidad que muestran por los RD2, logrando una eficacia terapéutica con un menor porcentaje de RD2 ocupados (Tabla 1).

Tabla 1. Perfil farmacológico comparativo entre antipsicóticos típicos y atípicos

Receptores	Antipsicóticos				
	Típicos		Atípicos		
	Haloperidol	Clorpromacina	Clozapina	Risperidona	Olanzapina
D ₁	210	19.95	85	430	31
D ₂	0.7	1.25	126	4	11
D ₃	2		473	10	49
D ₄	3		35	9	27
5-HT _{1A}	1100		875	210	> 10 000
5-HT _{2A}	45	7.94	16	0.5	4
5-HT _{2C}	>10 000	12.59	16	25	23
5-HT ₆	6000*		11*	2000*	10*
5-HT ₇	1100*		66*	3*	250*
α ₁	6	1	7	0.7	19
α ₂	1200*		50*	23*	470*
H ₁	440		6	20	7
M ₁	> 1500		1.9	> 10 000	1.9

Tabla 1. Valores de afinidad *in vitro* (K_i en nM) por diferentes receptores de antipsicóticos típicos (Haloperidol, Clorpromacina) y atípicos (Clozapina, Risperidona, Olanzapina). Datos obtenidos de Bymaster 1996, Arnt 1998. *afinidad *in vitro* de receptores humanos de células # HEK.

Esta capacidad de manifestar eficacia terapéutica, ocupando incluso una menor cantidad de RD2, generó la clasificación de antipsicóticos atípicos, dado que éstos se caracterizan por no generar síntomas motores extrapiramidales, como lo hacen los AT [Farde y cols. 1992; 1997]. Cabe mencionar que los RD2 están abundantemente expresados en regiones cerebrales que definen los ganglios basales, núcleos que contran la función motora extrapiramidal. La ocupación de un 80 % de RD2 (por parte de los AT) trae aparejado síntomas motores (catatonia, distonias, etc.) difíciles de atenuar. A su vez, los AAT también poseen afinidad por una amplia gama de otros receptores, por ejemplo serotoninérgicos (5-HT_{1A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₇) adrenérgicos (α₁ y α₂) y muscarínicos (M₁; Tabla 1) [Schoette 1993; Bymaster y cols. 1996; Arnt y Skarsfeldt 1998]. Se piensa que es la interacción de los AAT con la amplia clase de receptores, además de los RD2, estaría contribuyendo a su acción terapéutica diferencial respecto a los AT [Meltzer y Masei 2011].

Sin embargo, aún no está claro el papel de cada uno de estos receptores así como los circuitos neurales implicados en mediar los efectos terapéuticos de los AAT. La carencia actual de un tratamiento realmente eficaz, en gran parte, se debe a que, aún después de décadas de investigación, las bases fisiopatológicas de la esquizofrenia continúan siendo poco conocidas. Es así que, logrando una mejor comprensión de la neurobiología subyacente al trastorno, se estaría aportando a una posible mejora en los tratamientos existentes.

1.5. Hipótesis Neuroquímicas asociadas a la sintomatología de Esquizofrenia

Si bien las bases moleculares de la esquizofrenia no han sido completamente dilucidadas, una serie de evidencias genéticas, de estudios post-mortem, de imágenes cerebrales y farmacológicos, han implicado mecanismos que involucran alteraciones en diferentes sistemas de neurotransmisión (dopaminérgico, glutamatérgico, GABAérgico y serotoninérgico, entre otros) en la génesis de diferentes aspectos de la sintomatología de éste desorden. Esto llevo a la postulación de diferentes hipótesis neuroquímicas que intentan explicar la fisiopatología y los mecanismos moleculares subyacentes a la esquizofrenia [Carlsson 1978; Carlsson y cols. 2001; Javitt y Zukin 1991; Javitt 2010; Geyer y Vollenweider 2008].

Las diferentes hipótesis neuroquímicas propuestas buscan explicar la sintomatología de la enfermedad con alteraciones en un único sistema de neurotransmisión, en parte, con el fin de simplificar la obtención de resultados y ofrecer la posibilidad de encontrar blancos terapéuticos específicos en cada uno de los sistemas de neurotransmisión. Sin embargo, es importante tener en cuenta que las mismas no son excluyentes entre sí, sino que, los sistemas de neurotransmisión se encuentran interconectados por lo que modificaciones en alguno de ellos puede desencadenar, a través de mecanismos de adaptación, alteraciones funcionales en los otros [Carlsson y cols. 2001]. A pesar de esta visión multifactorial, en los últimos 30 años, la investigación en esquizofrenia ha estado enfocada en gran medida al estudio de los circuitos glutamatérgicos mediados por los receptores tipo N-metil-D-aspartato (NMDA; ver más adelante) incrementado significativamente las evidencias a favor de una posible alteración de éste sistema en la patología. **El desarrollo de esta Tesis se enmarca en la hipótesis de la existencia de una hipofunción glutamatérgica (Gluérgica), mediada por el receptor NMDA (NMDA-R), en la base fisiopatológica de la esquizofrenia.**

1.5.1. Hipótesis Glutamatérgica (vía NMDA-R) de la esquizofrenia

La hipótesis de una deficiencia Gluérgica involucrada en la esquizofrenia ha sido postulada hace ya varios años. Existe evidencia que datan de 1949 donde se reportaba que pacientes con esquizofrenia eran tratados con ácido glutámico con el fin de disminuir los síntomas [Kintzinger y Arnold 1949]. Uno de los primeros hallazgos de la presencia de anomalías Gluérgicas en pacientes con esquizofrenia fue la detección de niveles reducidos de glutamato en el líquido cefálo-raquídeo (LCR) [Kim y cols. 1980] aunque más adelante, otros grupos no pudieron replicar este hallazgo [Perry 1982; Korpi y cols. 1987]. Posteriormente, el surgimiento de dos evidencias clínicas indirectas fueron claves en impulsar la postulación de la hipótesis Gluérgica de la esquizofrenia. Estas evidencias mostraban que el uso de antagonistas no-competitivos de los NMDA-Rs, tales como los anestésicos disociativos fenciclidina (PCP) o ketamina (Ket), generaban síntomas tipo-esquizofrenia en individuos sanos y, a su vez, agravaban los síntomas en pacientes esquizofrénicos. Así, surgió la hipótesis Gluérgica de la enfermedad, la cual propone que una hipofunción en la neurotransmisión Gluérgica, asociada al NMDA-R, estaría vinculada a la sintomatología de la esquizofrenia [Javitt y Zukin 1991; Lahti y cols. 2001; Moghaddam y Jackson 2003]. A partir de ese momento, muchas otras evidencias han vinculado diversas alteraciones en diferentes aspectos de la transmisión Gluérgica con la esquizofrenia, donde la implicancia del NMDA-R fue tomando cada vez mayor relevancia [Rubio y cols. 2012; Merritt y cols. 2016]. En este sentido, estudios post-mortem, identificaron alteraciones en la expresión de ciertas subunidades que conforman los NMDA-R así como también disminuciones en el nivel de expresión de estos receptores en ciertas regiones cerebrales y tipos neuronales en los pacientes con esquizofrenia libres de medicación [Gao y cols. 2000; Pilowsky y cols. 2006; Rubio y cols. 2012]. En particular, se reportó que pacientes esquizofrénicos presentaban menor expresión del ARN mensajero para los NMDA-Rs expresados en las neuronas GABAérgicas presentes en la corteza prefrontal [Woo y cols. 2008]. Por otro lado, estudios genéticos también han apoyado fuertemente esta hipótesis dado el descubrimiento de varios genes posiblemente vinculados con la esquizofrenia que han demostrado poseer funciones de interacción en la actividad del glutamato a través de diferentes efectos en su transmisión mediada por el NMDA-R [Harrison y Weinberger 2005; Rujescu y cols. 2006]. Todas estas evidencias, sumado a la observación de que algunos fármacos antipsicóticos son capaces de bloquear la exacerbación de los diferentes síntomas psicogénicos inducidos por Ket [Malhorta y cols. 1997], apoyan la hipótesis Gluérgica en la fisiopatología de la esquizofrenia.

Sin embargo, y a pesar de que la hipótesis está fuertemente establecida en la literatura, los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a la disfunción Gluérgica aún continúan bajo estudio.

1.5.2 Glutamato y características generales del NMDA-R

El glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitador en el sistema nervioso central (SNC) de todos los mamíferos. La sinapsis Gluérgica tripartita se caracteriza por presentar comunicaciones bidireccionales entre la neurona presináptica, la neurona postsináptica y los astrocitos circundantes e implica numerosas moléculas que facilitan la liberación de Glu, la activación de los receptores, la recaptación de Glu y otras actividades sinápticas (Figura 3), [Araque y cols. 1999; Ni y cols. 2007]. La síntesis y la metabolización del Glu sucede en la neurona presináptica y los astrocitos respectivamente, mientras que una vez liberado en la hendidura sináptica, el Glu actúa sobre dos clases de receptores deferentes: los receptores ionotrópicos, que son canales iónicos activados por ligando los cuales median la transmisión excitatoria rápida y receptores metabotrópicos acoplados a proteína G responsables de modular y sintonizar la sinapsis [Hollmann y Heinemann 1994; Bleakman y Lodge 1998]. Los receptores de Glu ionotrópicos llevan el nombre de los agonistas que originalmente se encontraron para activarlos selectivamente: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolepropiónico (AMPA), kainato y NMDA. Los AMPA-Rs y NMDA-Rs se expresan en la membrana celular del componente postsináptico así como también en los astrocitos, mientras que los kainato se expresan únicamente en el componente presináptico [Kew y Kemp 2005; Abdelbaky 2012]. Por otro lado, los receptores metabotrópicos se subdividen en 3 grupos: los del grupo I (mGluR1 y mGluR5) son principalmente postsinápticos, mientras que el grupo II (mGluR2 y mGluR3) y III (mGluR4, mGluR6, mGluR7 y mGluR8) son primordialmente presinápticos y modulan la liberación de Glu (Figura 3).

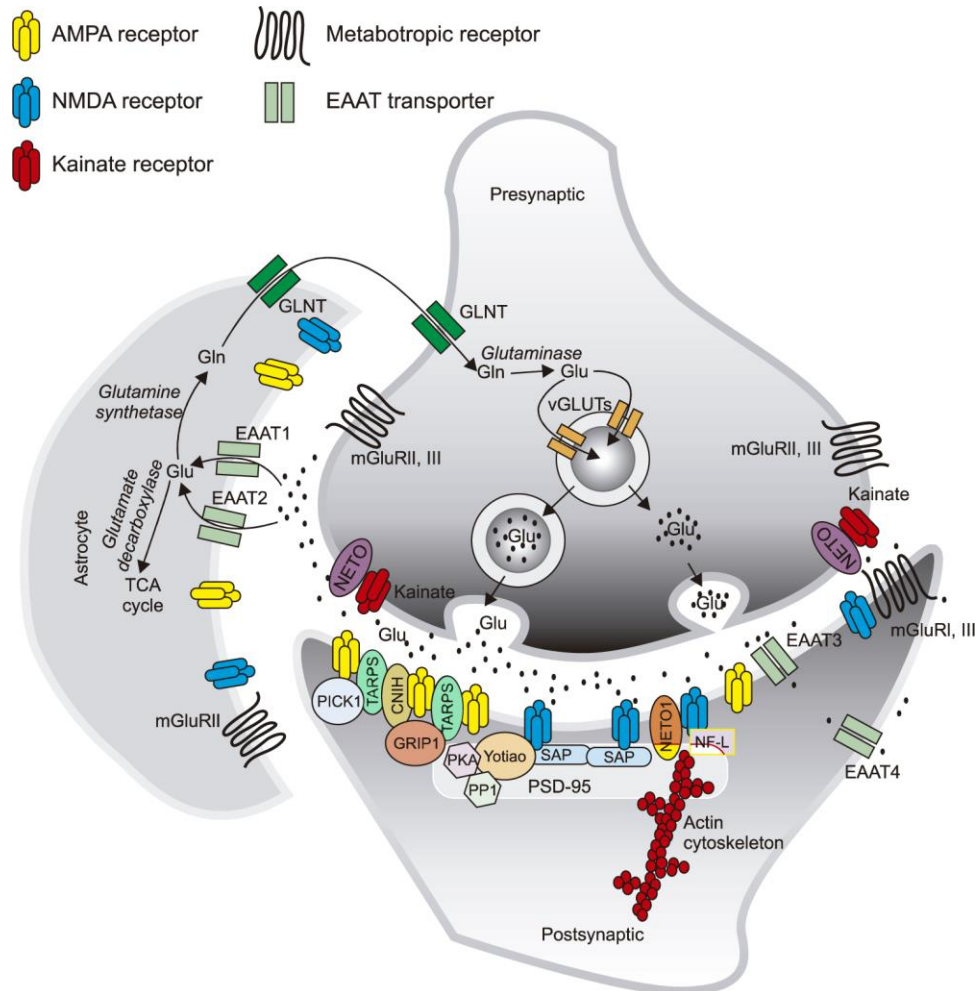


Figura 3. Sinapsis Gluérgica. El glutamato (Glu) se empaqueta en vesículas presinápticas a través del transportador (VGLUT 1-3) y se libera a la hendidura sináptica donde actúa en los receptores ionotrópicos y metabotrópicos y es rápidamente eliminado del espacio sináptico por los transportadores EAATs (EAAT1-EAAT5) expresados tanto en las neuronas postsinápticas como en astrocitos. En el astrocito, el glutamato es metabolizado vía el ciclo del TCA o de Krebs o se convierte en glutamina por la enzima glutamina sintetasa. La glutamina se libera del astrocito y recaptado por la neurona presináptica, donde se convierte en Glu y se empaqueta en vesículas para su posterior liberación. La acción de Glu en la neurona postsináptica, a través de su acción en los receptores GLUérgicos, genera una activación de diferentes vías de señalización responsables de diferentes funciones celulares, entre ellas la propia expresión del NMDA-R. TCA, ciclo de los ácidos tricarbóxicos; NETO, Neuropilina tolloid tipo 1; TRAPS, proteína transmembrana reguladora de AMPA; CNIH, proteína *cornichons*; PSD-95, proteína de densidad postsináptica-95; PICK1, Proteína accesoria de la proteína PSD; GRIP1, Proteína de interacción a Glutamato; PKA, Proteína Kinasa A; PP1, proteína fosfatasa 1; SAP, proteína asociada a la sinapsis; NF-L, neurofilamento-ligero. Imagen adaptada de Rubio y cols. 2012.

En particular, los NMDA-Rs se expresan ampliamente en todo el SNC [Abdelbaky 2012]. El Glu, a través de estos receptores, participa en numerosas funciones tales como la regulación del neurodesarrollo y de la plasticidad sináptica, procesos cognitivos como el aprendizaje y la formación de memorias, pensamiento, control comportamental, entre otras. También, el NMDA-R ha sido implicado con procesos de excitotoxicidad, como ocurre durante la isquemia y en algunos trastornos neurológicos [Fitzgerald 2012]. Debido a su amplia participación en complejos procesos cerebrales, se piensa que el Glu así como los NMDA-R, podrían estar involucrados en la etiopatogenia de varios trastornos neuropsiquiátricos, entre ellos la esquizofrenia.

Los NMDA-R son heterotetrámeros formados por diferentes combinaciones de tres tipos de subunidades: GluN1, GluN2 (A-D) y GluN3 (A-B), (Figura 4). Todos los NMDA-R funcionales poseen una o más subunidades GluN1. A su vez, la mayoría de ellos contienen subunidades de la clase GluN2, mayormente GluN2A y GluN2B, (en cerebro adulto), siendo las subunidades GluN2C y GluN2D las menos expresadas [Cull-Candy y cols. 2004; Paoletti y Neyton 2007].

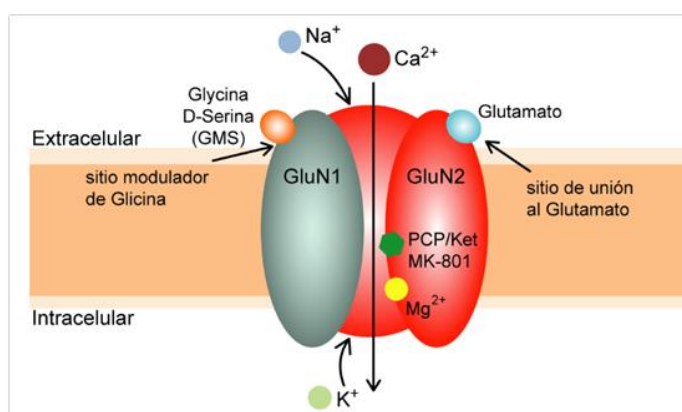


Figura 4. Diagrama que ejemplifica la estructura del NMDA-R ilustrando los sitios de unión de agonistas, antagonistas y moduladores, en particular los sitios de acción de PCP y MK-801. El NMDA-R convencional es un canal iónico heterotetramérico, que consta de dos subunidades GluN1 y dos GluN2. La activación del NMDA-R requiere, además de la unión de su agonista glutamato a la subunidad GluN2, (1) una despolarización postsináptica para liberar el bloqueo de Mg^{2+} en el canal y (2) la unión de glicina o D-serina al sitio modulador de glicina (GMS) en la subunidad GluN1. La apertura del canal NMDA-R permite el pasaje intra y extra neuronal del calcio (Ca^{2+}), sodio (Na^{+}) y potasio (K^{+}) desencadenando la respuesta celular. Imagen adaptada de Balu 2016.

Los NMDA-Rs son únicos en comparación con los otros miembros de la familia de receptores ionotrópicos de Glu. Esto se debe a que estos receptores tienen una cinética de desactivación mucho más lenta, son altamente permeables al Ca^{2+} y actúan como un detector de coincidencia molecular: además de la unión de su agonista Glu a la subunidad GluN2, la activación del NMDA-R requiere: (1) una despolarización postsináptica que atenúe el bloqueo del canal por el Mg^{2+} y, (2) la unión de glicina o D-serina al sitio modulador de Glicina (GMS) en la subunidad GluN1 (Figura 4). Al abrirse el canal del NMDA-R, el Ca^{2+} ingresa a la neurona y desencadena una cascada de eventos intracelulares que median las diferentes funciones asociadas a este sistema (ej.: plasticidad sináptica funcional local y aguda, cambios en la expresión génica que influyen en la plasticidad neural estructural a largo plazo, entre otras). Además, distintas combinaciones de las clases de subunidades dan lugar a diferentes sub-clases de NMDA-R con propiedades funcionales características de cada uno. Por ejemplo, las diversas combinaciones confieren diferente afinidad por agonistas y antagonistas NMDA-Rs, conductividad unitaria del canal, sensibilidad al bloqueo por Mg^{2+} dependiente de voltaje y distribución subcelular, entre otras propiedades. Las diferentes configuraciones y propiedades determinan características funcionales específicas pudiendo definir respuestas fisiológicas o patológicas distintas en respuesta al Glu u otros agentes moduladores [Karavanova y cols. 2007; Paoletti y Neyton 2007].

1.6. Fisiopatología de la Esquizofrenia

Hoy en día es incuestionable considerar a la esquizofrenia como un desorden mental que involucra alteraciones a nivel neuroquímico, anatómico y de cito-arquitectura. Algunas de estas alteraciones van a producir una serie de funcionamientos anómalos en el procesamiento de la información que determinarán las manifestaciones clínicas que se observan en los pacientes. La investigación de las bases neurobiológicas de la esquizofrenia es fundamental para poder establecer un diagnóstico precoz, predecir el resultado, delinear los mecanismos causales e identificar posibles blancos para su tratamiento. Los avances provistos por las técnicas de neuroimagen, electrofisiológicas y neuropatológicas han permitido un gran avance en el conocimiento de la neuroanatomía y funcionalidad neural que subyace a la esquizofrenia así como también en la determinación de cuáles son los cambios neurobiológicos que estarían en la base de los síntomas clínicos. Así, se han documentado varias alteraciones neurobiológicas en la estructura, la fisiología y la neuroquímica cerebral que pueden reflejar diversas vías fisiopatológicas desde el "genoma hasta el fenoma" [Nasrallah y cols. 2011].

1.6.1 Alteraciones estructurales y funcionales del SNC en la esquizofrenia

Alteraciones estructurales en diferentes regiones del cerebro así como anomalías en la conectividad funcional entre diferentes áreas del SNC se han vinculado a la fisiopatología de la esquizofrenia [DeLisi y cols. 2006; Dietsche y cols. 2017]. Los estudios post-mortem y de neuroimagen estructural, como la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RMN), han sido de gran importancia para determinar cuales son las áreas que están alteradas en mayor medida en el cerebro de los pacientes con esquizofrenia, ya sea a nivel estructural como funcional, y, a su vez, para evaluar la progresión de la enfermedad. Uno de los hallazgos más consistentes que revelaron estos estudios fue la observación de un aumento en el tamaño de los ventrículos laterales y en el tercer ventrículo de pacientes con esquizofrenia crónica. El aumento en el volumen ventricular se vio acompañado de una disminución en el volumen de la materia gris. Más de una década de investigación con RMN estructural han revelado que las reducciones volumétricas de la materia gris cerebral de los pacientes se observan con mayor frecuencia en las regiones cerebrales frontal, temporal, límbica y subcortical, en particular en el giro temporal superior, la corteza prefrontal (CPF; principalmente el sector dorsolateral), el hipocampo (HC), la corteza cingulada, ganglios basales y el tálamo (Figura 5), [Konick y Friedman 2001; Ellison-Wright y cols. 2008; Fornito y cols. 2009; Shepherd y cols. 2012]. En algunos casos se ha podido observar que, el aumento ventricular y el deterioro cognitivo fueron progresivos, sugiriendo que podría existir un proceso neurodegenerativo subyacente [Davis 1998], aunque la ausencia de características histológicas clásicas de neurodegeneración, incluso en este subconjunto de individuos, hacen que esta hipótesis sea cuestionada [Purohit y cols. 1998]. Si bien, más recientemente han aumentado las evidencias que apoyan la posibilidad de que un proceso de neurodegeneración también este presente en el progreso de esta enfermedad [Perez-Neri y cols. 2006; Schneider y Dwork 2011], lo más aceptado hasta hoy es que habría una anomalía en el desarrollo neurológico, debido probablemente a causas genéticas y ambientales [Weinberger 1987; Lewis 1997].

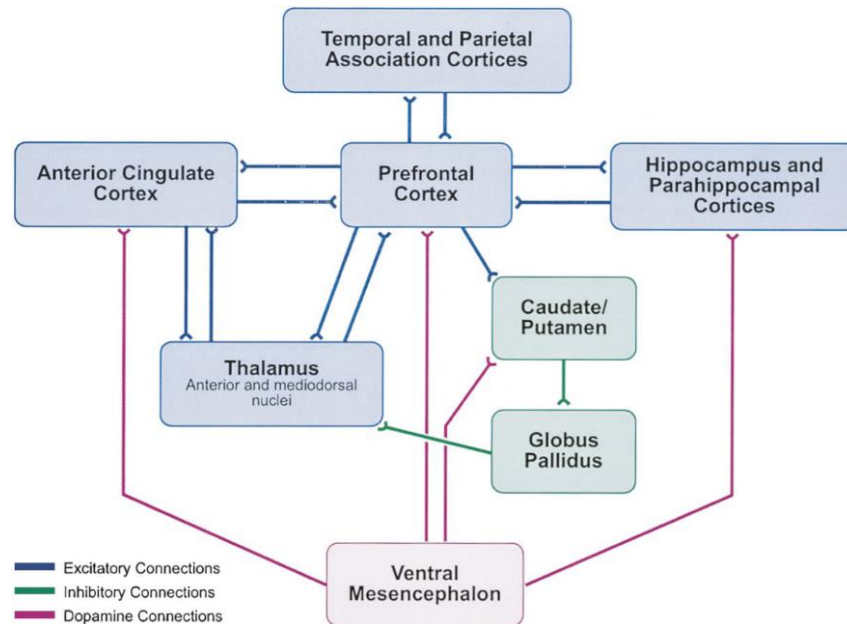


Figura 5. Áreas cerebrales que se ven afectadas en la esquizofrenia. El diagrama esquematiza algunas de las regiones del cerebro que se han visto implicadas de manera consistente en la fisiopatología de la esquizofrenia. Imagen adaptada de Lewis 2000.

Otras alteraciones comprometiendo la cito-arquitectura de varias de éstas regiones cerebrales también han sido evidenciadas en pacientes con esquizofrenia. Algunas de estas son: una reducción en el número y tamaño de las neuronas en algunos núcleos del tálamo, el hipocampo y la corteza entorrinal. Además, una disminución en la expresión de marcadores de conectividad sináptica en la CPF e HC y, excesos y deficiencias funcionales en la neurotransmisión dopaminérgica en el estriado y CPF respectivamente, fue observada [Abi-Dargham y cols. 1998; 2002; Hashimoto y cols. 2003; Coyle 2012]. A su vez, técnicas de RMN funcional (RMNf) y tomografía por emisión de positrones (PET) permitieron identificar anomalías funcionales en varias regiones cerebrales específicas y en circuitos neuronales asociadas a los síntomas que se manifiestan en la patología. En particular, se han reportado alteraciones del flujo sanguíneo en regiones frontales, tálamo y cerebelo durante la realización de tareas cognitivas que incluyen funciones ejecutivas, de memoria y de atención sostenida [Andreasen y cols. 1997; Fusar-Poli 2012].

Más recientemente, también fueron reportadas alteraciones morfológicas en la sustancia blanca en varias regiones del SNC vinculadas a la esquizofrenia. Algunos de éstos reportes mostraron un volumen reducido y una menor integridad en la microestructura de la sustancia blanca en aquellos pacientes cursando las primeras etapas de la enfermedad o en personas con alto riesgo de padecerla [Gasparotti y cols. 2009; Carletti y cols. 2012] aunque aún no está claro si estas alteraciones son progresivas en el curso de la enfermedad [Dietsche y cols. 2017]. Estas evidencias están en concordancia con las teorías fisiopatológicas más actuales de la esquizofrenia que plantean que la aparición de este trastorno representa una falla en la integración y la conectividad tanto funcional como anatómica, entre múltiples redes cerebrales que involucran diferentes regiones del SNC en lugar de anomalías en regiones únicas o en una red específica del SNC [Liu y cols. 2008; Pettersson-Yeo y cols. 2011; Zhang y cols. 2012b; Van den Heuvel y Fornito, 2014]. **Si bien se conocen las regiones y circuitos involucrados en la fisiopatología de la enfermedad, continúa bajo estudio el papel de cada una de las regiones y circuitos de conexión en relación a los tres dominios que se alteran en la sintomatología de la enfermedad.**

2. Región del Tálamo y su relevancia en la esquizofrenia

El tálamo es una importante estructura bilateral y simétrica del SNC que comprende la mayoría del diencefalo y provee los *inputs* excitatorios subcorticales más relevantes hacia distintas regiones de la corteza cerebral. En condiciones normales desempeña un papel clave de filtrado y procesamiento de una gran parte de la información sensorial que recibe la corteza cerebral [Sherman y Guillery 2002]. Además, desempeña un papel crítico en el procesamiento e integración de la información sensorial relevante para la regulación de múltiples funciones cerebrales que incluyen la percepción, la atención, la excitación, la emoción y el procesamiento cognitivo [Sherman y Guillery 2002]. Todas éstas, son funciones que se ven afectadas en la esquizofrenia, por lo que, una alteración a nivel del tálamo podría explicar gran parte de la sintomatología observada en el trastorno [Andreasen 1997]. De hecho, si bien las anomalías en la CPF y en las estructuras del lóbulo temporal han sido clásicamente asociadas a la fisiopatología de la esquizofrenia, importantes evidencias también han implicado una disfunción talámica en la base neurobiológica de este trastorno [Shenton y cols. 2001; Clinton y cols. 2005; Marengo y cols. 2012].

2.1. Estructura anatómica básica del tálamo y su naturaleza neuroquímica

Tanto en humanos como en roedores, el tálamo está compuesto por varios grupos de núcleos organizados topográficamente descritos por su ubicación anatómica: medial, lateral, ventral y anterior, así como los núcleos posteriores (pulvinar). Los diferentes núcleos procesan *inputs* de modalidades sensoriales específicas, como información somatosensorial o visual. La información sensorial entrante se proyecta inicialmente a uno de estos núcleos antes de que se envíe a la región cortical apropiada que procesa la información y que luego será nuevamente proyectada al tálamo [Paxinos 2004]. Los circuitos talámicos involucran tres tipos de células principales: células de relevo e interneuronas inhibitorias ubicadas en el tálamo dorsal y neuronas del núcleo reticular [Paxinos 2004]. Las neuronas de relevo, también denominadas neuronas de proyección, envían proyecciones excitatorias a la corteza a la vez que reciben información recíproca de estas mismas regiones corticales además de la información aferente sensorial [Sherman y Guillery 2002]. Todas estas proyecciones usan Glu como neurotransmisor primario, el cual ejerce su efecto a través de los receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA, kainato) y metabotrópicos del glutamato (mGluRs) expresados a lo largo de todo el tálamo. Las neuronas inhibitorias locales actúan vía el neurotransmisor GABA sobre las dendritas de las neuronas de proyección y las terminales aferentes sensoriales en un núcleo dado [Salt y Eaton 1996]. Por otro lado, las neuronas del núcleo reticular del tálamo (RTN) son neuronas GABAérgicas que se ubican conformando una lámina delgada que rodea el tálamo dorsal y al cual, a través de *inputs* GABAérgicos, regula su nivel de activación [Gonzalo-Ruiz y Lieberman 1995]. A su vez, estas neuronas reciben proyecciones colaterales provenientes de las proyecciones tálamo-corticales y cortico-talámicas [Gonzalo-Ruiz y cols. 1997a]. Por lo tanto el RTN se encuentra en una posición anatómicamente estratégica para modular el flujo de información entre el tálamo y la corteza, facilitando los estímulos sobresalientes y suprimiendo los estímulos irrelevantes [Pratt y Morris 2015]. Por otro lado, el tálamo también recibe proyecciones de neuronas noradrenérgicas, serotoninérgicas, dopaminérgicas y colinérgicas que modulan los *inputs* Gluérgicos y GABAérgicos [Gonzalo-Ruiz y cols. 1995a;b; Day y cols. 1997; Darvesh y Hopkins 2003; Rieck y cols. 2004; Garcia-Cabezas y cols. 2007; Rodriguez y cols. 2011]. Además, ciertos núcleos talámicos reciben *inputs* GABAérgicos del segmento interno del globo pálido, el pálido ventral y la sustancia nigra pars reticulata [Paxinos 2004].

2.2. Alteraciones estructurales, funcionales y neuroquímicas del tálamo vinculadas a la esquizofrenia

Un conjunto creciente de evidencias anatómicas y funcionales han vinculado la presencia de anomalías estructurales y funcionales del tálamo con la sintomatología de la esquizofrenia. Estudios de PET permitieron determinar que existe una activación talámica anormal en pacientes con esquizofrenia libres de medicación, en particular durante la manifestación de alucinaciones auditivas y también durante la realización de algunas tareas cognitivas [Andreasen y cols. 1994; 1996]. Otros estudios revelaron que los pacientes presentaban un menor tamaño y menor número de neuronas en ciertos núcleos talámicos en relación a pacientes control, específicamente, estas alteraciones fueron observadas en el núcleo medio dorsal (MDT), el núcleo anterior (ATN) y el pulvinar del tálamo [Andreasen 1997; Young y cols. 2000; Byne y cols. 2008]. Más recientemente, se han reportado alteraciones en la comunicación tálamo-cortical en pacientes con la patología [Klingner y cols. 2013; Anticevic y cols. 2014]. En particular, se demostró que existe un mayor grado de acoplamiento entre la CPF y el tálamo anterior dorsolateral y medio, así como también un déficit en el acoplamiento negativo entre el tálamo y algunas áreas de las cortezas somatosensorial, visual y auditiva sugiriendo que podría haber una falta de control talámico en el procesamiento de la información motora/sensorial dando como resultado un mayor envío de información (o menor filtrado) a la CPF en los pacientes esquizofrénicos (Figura 6). **Estas evidencias enfatizan la importancia funcional del tálamo en la fisiopatología de la esquizofrenia y en particular de los núcleos ATN y MDT** [Klingner y cols. 2013].

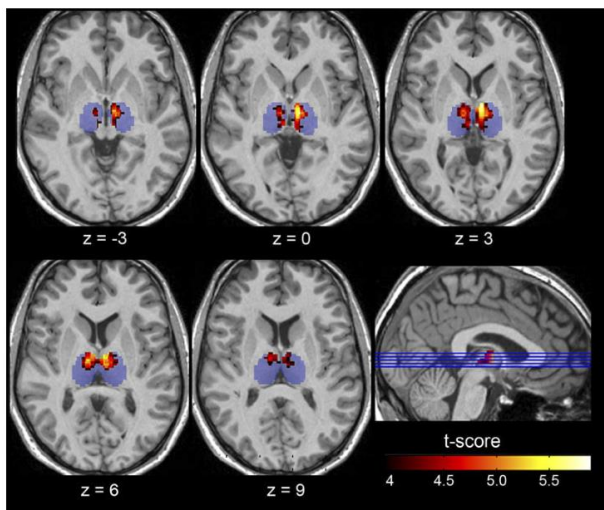


Figura 6. Imagen donde se observan las diferencias en la conectividad funcional talámica de la región de interés (color azul) del tálamo derecho e izquierdo entre pacientes con esquizofrenia respecto a pacientes controles sanos, mediante un análisis Voxelwise. La imagen muestra que hay diferencias significativas entre ambos grupos (escala de color rojo-amarillo-blanco) en los núcleos medial y anterior del tálamo. Imagen adaptada de Klingner y cols. 2013

Además de los cambios estructurales y metabólicos observados en el tálamo, otros estudios han reportado la presencia de alteraciones neuroquímicas en pacientes. Debido a que el Glu es el neurotransmisor más abundante en el tálamo y a la robusta vinculación de éste sistema de neurotransmisión con el desorden de esquizofrenia, gran parte de éstos estudios se han abocado a estudiar la presencia de alteraciones de éste sistema en el tálamo de pacientes esquizofrénicos. Importantes anomalías en diferentes niveles de la transmisión Gluérgicas han sido detectadas [Andreasen y cols. 1994; Bresink y cols. 1995]. Dentro de éstas anomalías se han observado disminuciones en los niveles de expresión de diferentes receptores de Glu así como en otras moléculas involucradas en la neurotransmisión Gluérgica (incluidos los transportadores de Glu y las proteínas asociadas, las proteínas de señalización intracelular asociadas con el NMDA-R y las enzimas Gluérgicas). Muchas de estas alteraciones reportadas fueron más prominentes específicamente en los núcleos talámicos con proyecciones recíprocas a diferentes regiones corticales límbicas. En particular, se destaca la observación de alteraciones en los niveles de expresión de varias de las subunidades GluN1, GluN2B y GluN2C de los NMDA-Rs, específicamente en el ATN, MDT y lateral dorsal [Ibrahim y cols. 2000; Watis y cols. 2008].

El ATN, es un núcleo de asociación que se ubica en la parte rostral del tálamo dorsomedial y que recibe aferencias provenientes mayormente de cortezas límbicas, HC y núcleos mamilares. En especial, este núcleo recibe densas proyecciones Gluérgicas, provenientes de la formación hipocampal, en particular del subículo, y de la CPF, regiones a las cuales el ATN también envía proyecciones [Dalrymple-Alford y cols. 2015]. A su vez, posee importantes conexiones recíprocas con la corteza cingulada anterior y posterior, en particular con la Corteza Retrosplenial (RSC), también definida como corteza cingulada posterior en ratas [Gonzalo-Ruiz y cols. 1997]. A su vez el ATN recibe aferencias Gluérgicas de las cortezas motora secundaria, visual, peri y entorrinal [Zikopoulos y Barbas 2006; Jankowski 2013]. De manera interesante, la actividad de las neuronas en el ATN está estrechamente controlada por proyecciones de las neuronas GABAérgicas del RTN, mientras que las neuronas del ATN a su vez envían proyecciones colaterales Gluérgicas controlando la actividad de las neuronas GABAérgicas del RTN, modulándose así el *output* talamo-cortical [Gonzalo-Ruiz y Lieberman 1995; Gonzalo-Ruiz y cols. 1997].

En ratas, este input inhibitorio proveniente del RTN posee un rol en la modulación de la excitación/inhibición del ATN de vital importancia ya que las interneuronas GABAérgicas en ese núcleo son escasas [Gonzalo-Ruiz y cols. 1996].

Respecto a su función, el ATN es considerado parte del sistema hipocampal extendido que, interactuando junto con la RSC y el HC, conforman un circuito neural clave para el procesamiento de ciertas categorías de aprendizaje y memoria. En particular, la importancia de éste circuito (ATN-RSC-HC) en procesos cognitivos implicando aprendizaje y recuperación de información tipo espacial y dependiente del contexto, es bien conocida [Aggleton y Sahgal 1993; Aggleton 2010; Shibata 1998]. A su vez, debido a las interacciones tálamo-corticales con cortezas límbicas y cortezas de asociación de alto orden, el ATN es también considerado como parte del sistema límbico y por lo tanto, también tendría un rol en procesos vinculados a la percepción sensorial y a las emociones [Byne y cols. 2008; Gennari y cols. 2018], funciones que se ven alteradas en la esquizofrenia. De hecho, de acuerdo a las evidencias que muestran la existencia de anomalías talámicas en la esquizofrenia, particularmente en el ATN y en los circuitos que él conforma [Andreasen 1997; Buchsbaum y cols. 1996; Young y cols. 2000; Clinton y cols. 2005], algunos autores han propuesto que este circuito talámico podría estar involucrado en la psicosis, particularmente a través de la transmisión Gluérgica [Tomitaka y cols. 2000]. Es interesante destacar que, además de la presencia de proyecciones Gluérgicas y GABAérgicas, la actividad del RTN y por tanto del propio ATN, está siendo también modulada por la acción de *inputs* serotoninérgicos y dopaminérgicos, provenientes del núcleo dorsal del rafe y de la sustancia nigra pars compacta, respectivamente, actuando sobre receptores tipo 5HT_{2A}, 5HT_{1A} y D4 que en él se expresan [Govindaiah y cols. 2010; Rodriguez y cols. 2011]. En el ATN también se ha demostrado la presencia de proyecciones serotoninérgicas y colinérgicas [Lavoie y Parent 1991; Gonzalo-Ruiz y cols. 1995a;b; Darvesh y Hopkins 2003] así como también la expresión de receptores serotoninérgicos y muscarínicos por los cuales los AAT poseen afinidad [Cortés y cols. 1986; Sikes y Vogt 1987; Kinsey y cols. 2001; Varnäs y cols. 2004]. **Debido a que estos subtipos de receptores, dopaminérgicos, muscarínicos y serotoninérgicos, demostraron poseer un rol relevante en el mecanismo de acción de los AAT, tanto en su efecto antipsicótico [Meltzer y Massey 2011; Abraham y cols. 2015; Yohn y Conn 2018] como en la mejora de las alteraciones cognitivas de la esquizofrenia [Furth y cols. 2013; Melancon y cols. 2013; Nikiforuk y cols. 2013], es posible que el circuito RTN-ATN sea un posible sitio blanco de acción de los AAT [Govindaiah y cols 2010; Erij y cols. 2012; Pratt y Morris 2015].**

3. Aportes pre-clínicos al estudio de las bases anatómicas y moleculares de la esquizofrenia

La complejidad de la esquizofrenia en términos de heterogeneidad en su sintomatología, el gran número de factores (genéticos, ambientales, etc.) y áreas cerebrales involucradas en su fisiopatología, implica una gran complejidad a la hora de abordar su estudio desde el punto de vista clínico y preclínico.

A grandes rasgos, el estudio de éste trastorno se ha centrado en 3 abordajes principales: estudios post-mortem en pacientes esquizofrénicos, estudios de neuroimagen (normalmente asociados a la realización de pruebas funcionales) y estudios en modelos animales de experimentación. Aunque los modelos animales solo pueden aproximarse al complejo fenotipo clínico de la esquizofrenia, el desarrollo de algunos modelos pre-clínicos farmacológicos y conductuales ha permitido comprender varios de los mecanismos biológicos que subyacen a la patogénesis y la fisiopatología de la esquizofrenia. Existen varios modelos fármaco-conductuales, basados en las distintas teorías de la fisiopatología de la esquizofrenia que se utilizan como herramientas para abordar el estudio de la neurobiología subyacente al trastorno así como al mecanismo de acción de los fármacos antipsicóticos. A través de la modelación de algunos de los síntomas de la enfermedad en animales de experimentación se ha logrado avanzar significativamente en la comprensión de la enfermedad, aportando importante información en la búsqueda de estrategias terapéuticas más efectivas, la reducción de la morbilidad y mejores resultados para los pacientes.

3.1. Antagonistas del NMDA-R como modelo farmacológico para el estudio preclínico de la neurobiología de la esquizofrenia y su tratamiento

El uso de fármacos antagonistas de los NMDA-Rs tales como PCP, Ket y el MK-801, el antagonista no-competitivo más potente [Bresink y cols. 1995], en animales de experimentación constituye un modelo farmacológico pre-clínico ampliamente utilizado para estudiar la sinomatología presente en la patología de la esquizofrenia [Andiné y cols. 1999; Geyer y Ellenbroek 2003; Javitt 2010]. Dicho modelo está basado en la hipótesis Gluérgica de la enfermedad y se considera uno de los más apropiados para el estudio de la neurobiología de éste desorden así como para testar el potencial terapéutico de nuevos fármacos con potencial antipsicótico. Esto se debe a que su administración en animales induce alteraciones conductuales que se asocian a la sintomatología positiva [Krystal y cols. 2005], así como también induce alteraciones cognitivas y negativas semejantes a las que se observan en la enfermedad [Moghaddam y Jackson 2003; Rung y cols. 2005].

A su vez, otras evidencias a nivel molecular, celular y de conexión neural han reforzado el uso de esta clase de fármacos como modelo farmacológico pre-clínico de esquizofrenia [Keilhoff y cols. 2004; Kaiser y cols. 2004; Kehrer y cols. 2008]. **De todas maneras, a pesar de su amplio uso, los sustratos neuroanatómicos y los mecanismos subyacentes responsables de las alteraciones conductuales que éstos agentes generan, continúan siendo estudiados. Su determinación podría proporcionar importante información sobre la neurobiología subyacente al trastorno de la esquizofrenia ayudando a la búsqueda de mejores tratamientos.**

3.1.1. Antagonistas del NMDA-R y su relación con los síntomas tipo-psicóticos

En roedores, la administración sistémica y sub-anestésica de antagonistas del NMDA-R produce una exacerbación del comportamiento natural de los animales definida como un efecto tipo-psicótico. Dicho efecto constituye un síndrome comportamental motor (SCM), el cual se caracteriza por la aparición de hiperlocomoción, acompañada de una marcada alteración en el patrón locomotor (característica que permite diferenciar la hiperlocomoción Gluérgica de una inducida por compuestos que aumentan la transmisión dopaminérgica), estereotipias (comportamientos repetitivos tales como head weaving, movimiento lateral de la cabeza; head shakes, sacudidas del cuerpo y cabeza) y signos de ataxia (caídas torpes o abducción de las patas traseras) [Andiné y cols. 1999; Geyer y Ellenbroek 2003; Krystal y cols. 2003; Scorza y cols. 2008; 2010]. Todas estas alteraciones conductuales son susceptibles de ser bloqueadas por fármacos antipsicóticos (AT y AAT). Este hecho le confiere validez predictiva al modelo farmacológico pre-clínico asociado a la sintomatología positiva o psicótica [Andiné y cols. 1999; Bubeníková- Bubeníková y cols. 2008; Geyer y Moghaddam 2003; Scorza y cols. 2008; 2010].

3.1.2. Antagonistas del NMDA-R y su relación con el déficit cognitivo

La administración sistémica de PCP, Ket y MK-801 en animales, induce deficiencias en diferentes dominios cognitivos que pueden ser evidenciadas a través del uso de diferentes paradigmas comportamentales [Dix y cols. 2010; Smith y cols. 2011; Brown y cols. 2014]. En particular, la alteración de funciones cognitivas vinculadas a procesos de aprendizaje-memoria y, en particular, a la memoria espacial, pueden ser estudiadas utilizando paradigmas comportamentales específicamente diseñados para evaluar este tipo de funciones cognitivas, funciones particularmente dependientes de la región del HC, tales como *Passive Avoidance* y *Morris water-maze* [Danysz y cols. 1988, Butelman 1990, Wozniak y cols. 1990].

Otros modelos, tales como el *Five-choice Serial Reaction Time Task* (de atención visual) o el *Delayed matching to position task* o *Radial arm maze test* [Marcus y cols. 2005; Enomoto y cols. 2008; Smith y cols. 2011], son habitualmente utilizados para evaluar alteraciones en la memoria de trabajo o en la función de la atención; funciones que dependen particularmente de la CPF. Varios trabajos han demostrado que los antagonistas del NMDA-R generan un efecto amnésico en un modelo sencillo de instrumentar diseñado para evaluar tareas de aprendizaje y memoria espacial, conocido como Latencia de Transferencia (LT), [Itoh y cols. 1991; Da Cunha y cols. 2005]. Estos autores describen específicamente un efecto amnésico inducido por MK-801 el cual es antagonizado por el AAT, risperidona, dejando en evidencia que dicho modelo es útil y sensible para el estudio de la acción terapéutica de fármacos antipsicóticos sobre la función cognitiva [Celikyurt y cols. 2011].

3.1.3. Antagonistas del NMDA-R y su relación con el deterioro del procesamiento sensorial y trastornos afectivos

Varias evidencias demuestran que existe una alteración en la función del filtrado sensorio-motor así como deficiencias en el comportamiento social en la esquizofrenia. Por un lado, la alteración sensorio-motora se ve reflejada en un aumento de la respuesta de sobresalto en pacientes esquizofrénicos sometidos al modelo de Inhibición pre-pulso (PPI). Se ha visto que el bloqueo de los NMDA-Rs en ratas y primates no humanos, induce alteraciones sensorio-motoras similares a las de la patología considerándolas conductas homólogas. Por otro lado, aunque los síntomas negativos de la esquizofrenia, tales como la apatía o el aplanamiento emocional, son difíciles de imitar e incluso de identificar en los animales la administración sistémica de antagonistas del NMDA-R induce una disminución en la interacción social en el modelo de aislamiento social con roedores, conducta que remeda al aislamiento social comúnmente observado en los pacientes con esquizofrenia [Geyer y Ellenbroek 2003; Rung y cols. 2005; Yang y cols. 2010; Neill y cols. 2010]. En este modelo de interacción social, las conductas evaluadas en los animales son relativamente sencillas en comparación con los otros síntomas negativos. Sin embargo, cabe mencionar que este mismo modelo también puede ser utilizado para evaluar ansiedad experimental, dificultando su interpretación [File 1980; File y Seth 2003]. Esta aparente desventaja explica porque, en parte, la literatura preclínica de esquizofrenia se encuentra ampliamente abocada a la investigación sobre las bases neurales y moleculares que subyacen a la sintomatología positiva y los trastornos cognitivos.

3.1.4. Antagonistas del NMDA-R y su relación con los circuitos tálamo-corticales

Los antagonistas del NMDA-R inducen efectos excitadores y neurotóxicos (dependiendo de la dosis) que comprometen varias regiones cerebrales corticales y subcorticales, entre las que se encuentran áreas corticales límbicas, la formación hipocampal, varios núcleos talámicos, el estriado ventral y el cerebelo, entre otros [Vollenweider y cols. 1997; Suzuki y cols. 2002; Homayoun y Moghaddam 2007; Mohadam 2012; Nowak y cols. 2012]. Muchas de estas regiones están estrechamente relacionadas a la sintomatología de la esquizofrenia [Lewis 2000]. Estas alteraciones, a nivel celular y molecular, podrían explicar varias de las respuestas comportamentales y alteraciones cognitivas que se observan luego de la administración de ésta clase de fármacos y que se asemejan a los síntomas positivos, negativos y cognitivos obseados en la enfermedad [Moghaddam y cols. 1997; Olney y Farber 1995].

Debido a su conocida vinculación con varias de las funciones que se ven alteradas en la esquizofrenia, la CPF es una de las regiones cerebrales donde los efectos de los antagonistas del NMDA-R han sido ampliamente estudiados [Krystal y cols. 2003; Kaiser y cols. 2004; Jackson y cols. 2004; Kargieman y cols. 2007; Amitai y cols. 2012]. Varios estudios han demostrado que en ésta región, luego de la administración sistémica de ésta clase de fármacos, se produce un aumento en la liberación extracelular de Glu, dopamina (DA), serotonina (5-HT) y acetilcolina [Adams y Moghaddam 2001; Lorrain y cols. 2003; López-Gil y cols. 2007; Liu y cols. 2016]. Además, se ha observado un aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales de la CPF medial (CPFm) acompañada de una desincronización de ésta región y un aumento en la expresión de genes de expresión temprana (IEGs) bajo el efecto de éstos fármacos [Jackson y cols. 2004; Kargieman y cols. 2007]. Se pensaba que era posible que estas alteraciones estuvieran mediando, de alguna manera, las alteraciones conductuales inducidas por los antagonistas del NMDA-R y que no necesariamente implicaran que la CPF fuera el sitio de acción primaria de los antagonistas del NMDA-R para la inducción de tales cambios comportamentales. De hecho, se demostró que la administración local de PCP o MK-801 en la CPFm no disminuyó la descarga de las neuronas piramidales [Suzuki y cols. 2002; Jodo y cols. 2005] y tampoco indujo el aumento en la liberación de los distintos neurotransmisores en CPF descrito luego de su administración sistémica y aguda [Amargos-Bosch y cols. 2006; López-Gil y cols. 2007]. Esto llevó a demostrar que el bloqueo de los NMDA-Rs en otras áreas del cerebro estaría contribuyendo al aumento en la actividad de la CPFm, abriendo la posibilidad de estudiar la participación de otros circuitos neurales, distales a la CPFm.

Otro de los efectos a nivel celular ampliamente reportada para los antagonistas del NMDA-R, es la inducción de un efecto neurotóxico a dosis similares a aquellas en las que generan un aumento en la liberación de diferentes neurotransmisores, particularmente en las neuronas piramidales de las cortezas límbicas, demostrando tener una mayor sensibilidad las neuronas piramidales de la RSC [Olney y cols. 1989; Farber 2003]. Estos efectos neurotóxicos pueden ser reversibles o irreversibles según la dosis y/o el régimen de tratamiento al que sean administrados los antagonistas del NMDA-R [Horvath y cols. 1997; Farber 2003]. Además, pueden ser prevenidos por la co-administración de AT y AAT [Sharp y Williams 1997; Farber 2003]. En rata, la RSC es un punto nodal para la integración y distribución de la información recíproca entre las cortezas límbicas y visuales, la formación hipocampal y el ATN [Van Groen y cols. 1999; 2004]. Lesiones de ésta región en ratas producen déficits en el rendimiento espacial y la memoria [Vann y Aggleton 2004; Van Groen y cols. 2004], similares a algunas de las alteraciones de comportamiento inducidas por los antagonistas del NMDA-R [Morgan y cols. 2004; 2010]. Por otro lado, en humanos, estudios de neuroimagen funcional sugieren que la RSC participa en la integración de las emociones y la memoria episódica [Maddock 1999; Maguire 2001]. Así, una disfunción/daño en la conectividad entre las neuronas RSC con las cortezas somatosensoriales y parahipocampales, podría estar en la base de las anomalías comportamentales provocadas por los antagonistas del NMDA-R en animales y humanos. Si bien el mecanismo de acción por el cual los antagonistas del NMDA-R estarían induciendo sus efectos neurotóxicos en la RSC aún no está del todo claro, éste ha sido asociado con un exceso de excitación cortical debido a un aumento en la liberación de acetilcolina y Glu en ésta región desde proyecciones provenientes del prosencéfalo basal y del tálamo anterior, respectivamente [Kim y cols. 1999; Farber y cols. 2002; Farber 2003]. Además del aumento en la liberación de diferentes neurotransmisores, cambios de excitabilidad y neurotoxicidad inducidos en las cortezas CPF y RSC, los antagonistas del NMDA-R inducen la expresión de IEGs en cortezas somatosensorial, parahipocampal, HC y diferentes núcleos del tálamo [Väisänen y cols. 2004; Santana y cols. 2011; Hervig y cols. 2016]. De manera interesante, experimentos de doble hibridación *in situ* revelaron que luego de la administración de PCP, el aumento en la expresión del IEG *c-fos* se daba en una gran proporción en neuronas talámicas de relevo (Gluérgicas), mientras que ese aumento no se evidenciaba en las neuronas GABAérgicas del RTN del tálamo [Santana y cols. 2011; Hervig y cols. 2016]. Estos experimentos sugerían que PCP, vía un bloqueo de los NMDA-Rs expresados en las neuronas GABAérgicas del RTN, estaba provocando una disminución en la inhibición tónica hacia las neuronas de relevo, Gluérgicas, presentes en otros núcleos talámicos, las cuales resultaron activadas por

efecto de PCP. Independientemente de la o las área de acción primaria de los antagonistas del NMDA-R, las evidencias parecen apoyar fuertemente la hipótesis de que ésta clase de fármacos tiene una acción preferencial sobre las neuronas GABAérgicas. Los motivos de esta selectividad celular no están claros.

3.2. Hipótesis de desinhibición GABAérgica de los antagonistas del NMDA-R

Todos los efectos comportamentales y celulares mencionados implican respuestas de aumento y/o excitación dejando en evidencia un mecanismo paradójico cuando se trata del antagonismo de un receptor excitatorio como el NMDA-R. El mecanismo que podría explicar, al menos en parte, los efectos inducidos por los antagonistas del NMDA-R es el modelo que implica un mecanismo de desinhibición GABAérgica. Este mecanismo implica que los antagonistas del NMDA-R actúan bloqueando NMDA-Rs expresados en neuronas GABAérgicas [Coyle 2012; Lisman y cols. 2008], las cuales estarían controlando neuronas de proyección excitatorias. Al disminuir la actividad de estos *inputs* GABAérgicos se produciría un bloqueo de la inhibición tónica sobre proyecciones Gluérgicas (esquema propuesto en la Figura 7) generando una desinhibición neta de la actividad de las células principales [Krystal y cols. 2003; Homayoun y Moghaddam 2007]. Este mecanismo implica entonces que, de alguna manera, la acción de los antagonistas del NMDA-R sobre las neuronas inhibitorias prime respecto a su acción sobre las neuronas excitatorias. En este sentido, Grunze y cols. 1996 demostraron que las neuronas GABAérgicas en el HC eran cerca de 10 veces más sensibles al bloqueo por los antagonistas del NMDA-R que las neuronas piramidales mientras que, Homayoun y Moghaddam 2007, observaron lo mismo en la CPF. Por otro lado, otros estudios reportaron y propusieron que PCP actúa de manera preferencial sobre las células GABAérgicas del RTN [Kargieman y cols. 2007; Santana y cols. 2011; Troyano-Rodríguez y cols. 2014]. Todas estas evidencias apoyan la hipótesis de un mecanismo de desinhibición GABAérgica subyacente a las acciones de los antagonistas NMDA-R.

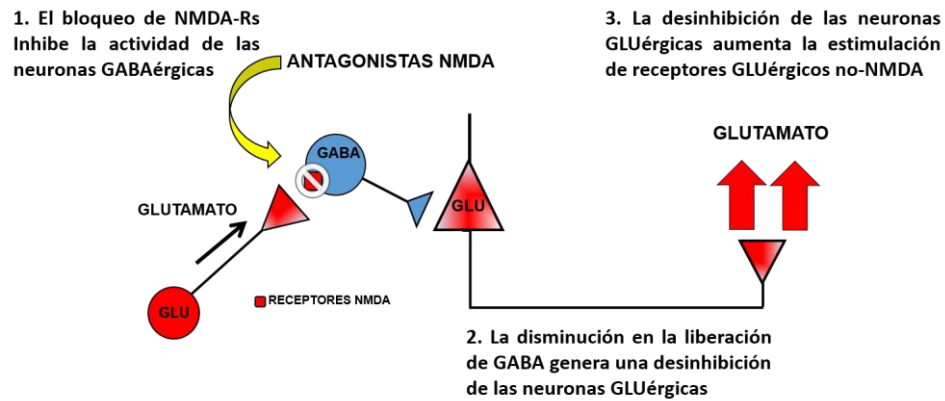


Figura 7. Esquema representativo de la hipótesis de desinhibición planteada como posible mecanismo de acción implicado en la inducción de los efectos inducidos por los antagonistas NMDA-R. El esquema ilustra como el bloqueo de los NMDA-Rs expresados en las neuronas GABAérgicas genera una desinhibición de la neurona Gluérgica aumentando la liberación de Glu en las regiones de proyección. Se sugiere que el bloqueo NMDA-R predomina en las neuronas GABAérgicas. (Moghaddam y cols. 1997; Homayoun y Moghaddam 2007).

Los motivos de la selectividad celular que parecen estar ejerciendo los antagonistas del NMDA-R no están claros, si bien varias explicaciones han sido propuestas [Greene 2001; Homayoun y Moghaddam 2007]. Una de particular relevancia para la presente Tesis es la que refiere a una composición diferencial entre las subunidades que conforman los NMDA-Rs de las interneuronas y neuronas piramidales. Se ha observado que a una concentración fisiológica de Mg^{2+} , memantina (antagonista no-competitivo del NMDA-R) y la Ket, bloquean preferentemente los NMDA-Rs tipo GluN1/2C y GluN1/2D [Kotermanski y cols. 2009]. Cabe destacar que en neuronas corticales no piramidales y del HC, GluN1/2C y GluN1/2D son las principales subunidades que conforman los NMDA-Rs, respectivamente, mientras que el RTN es rico en la expresión de la subunidad GluN2C [Monyer y cols. 1994; Karavanova y cols. 2007]. Los antagonistas del NMDA-R no-competitivos pueden, por lo tanto, manifestar una mayor potencia sobre los NMDA-Rs de "tipo interneurona", lo que podría explicar la desinhibición cortical inducida por los antagonistas. Según éste modelo, una desinhibición GABAérgica conduciría a una hiperestimulación en redes cortico-límbicas lo que podría explicar, al menos en parte, el desarrollo de síntomas tipo-psicóticos de los antagonistas del NMDA-R.

A su vez, algunos autores han propuesto que este mecanismo de desinhibición GABAérgica, podría explicar también algunas de las alteraciones cognitivas inducidas por estos fármacos, involucrando específicamente una inhibición, vía bloqueo de los NMDA-Rs expresados en las neuronas GABAérgicas del tálamo [Liu y cols. 2016] o en las interneuronas inhibitorias del HC [Grunze y cols. 1996, y cols. 2006]. **La identificación de circuitos neurales implicados en mediar los efectos inducidos por los antagonistas de los NMDA-Rs y que, a su vez, incluyan un control GABAérgico sobre la transmisión Gluérgica, aportaría importante información en la comprensión de las bases neurales de la sintomatología de la esquizofrenia.**

3.3 Papel de la subunidad GluN2C de los NMDA-Rs en las acciones de los antagonistas del NMDA-R

Se ha descrito que las subunidades GluN2A-D que conforman los NMDA-Rs poseen un patrón de expresión diferencial dependiente de la región cerebral y la etapa de desarrollo del individuo [Pachernegg y cols. 2012; Sanz-Clemente y cols. 2013]. Los NMDA-Rs que contienen la subunidad GluN2C son más abundantes en las neuronas granulares del cerebelo [Bhattacharya y cols. 2018], el tálamo [Monyer y cols. 1994; Wenzel y cols. 1997; Karavanova y cols. 2007], incluido el RTN [Zhang y cols. 2009; 2012a]. También se expresan en el bulbo olfativo, oligodendrocitos y en algunas interneuronas del HC y la corteza cerebral, aunque de manera menos abundante [Monyer y cols. 1994; Wenzel y cols. 1997]. Los NMDA-Rs exhiben diferentes propiedades cinéticas y farmacológicas, tales como la probabilidad de apertura del canal, la conductancia, la velocidad de desactivación y sensibilidad al bloqueo por Mg^{2+} , dependiendo del tipo de subunidad GluN2 que lo conforman [Dravid y cols. 2008], Esta conformación, sumado a su expresión diferencial en el SNC, podría explicar la generación de respuestas funcionales fisiológicas o patológicas distintas en respuesta al Glu u a otros agonistas y antagonistas de los NMDA-Rs [Karavanova y cols. 2007; Paoletti y Neyton 2007; Kantrowitz y Javitt 2010]. Un ejemplo de ello lo demuestra la evidencia que neuronas que expresan NMDA-Rs compuestos con subunidades GluN2C. Se reportó que estas neuronas muestran un mayor numero de oscilaciones delta en respuesta al bloqueo del NMDA-R, comparado con neuronas expresando NMDA-R con subunidades GluN2A/2B [Zhang y cols. 2009]. Los autores lo explican por el hecho que las subunidades GluN2C le confieren al NMDA-R una sensibilidad diferencial al bloqueo por Mg^{2+} y afectan así la propiedad rectificadora del canal iónico. Específicamente, la conformación de subunidades GluN2A/2B confiere una alta sensibilidad al bloqueo por Mg^{2+} y alta rectificación, mientras que la conformación de GluN2C/2D proporciona una baja sensibilidad al Mg^{2+} y baja rectificación al canal del NMDA-R [Karavanova y cols. 2007].

Se ha sugerido que la acción preferencial de los antagonistas del NMDA-R sobre el RTN se atribuye a la presencia de la subunidad GluN2C [Zhang y cols. 2009]. Esta propiedad fue confirmada mediante la utilización de ratones *knock out* para esta subunidad [Zhang y cols. 2012]. Sin embargo, aún existen escasas evidencias que demuestren la influencia de la subunidad GluN2C en los efectos comportamentales que inducen los antagonistas NMDA-Rs que remedan los síntomas de la esquizofrenia [Khlestova y cols. 2016]. Algunos estudios han demostrado un rol de los NMDA-Rs conformados con la subunidad GluN2C, en procesos cognitivos asociados a algunos tipos de memoria que se ven afectadas en la esquizofrenia [Hillman y cols. 2011]. Sin embargo, estos estudios no evalúan el rol de esta subunidad bajo el tratamiento con antagonistas del NMDA-Rs. Un estudio reciente, demostró que el potenciador selectivo para los NMDA-Rs-GluN2C/2D, CIQ(((3-chlorophenyl) (6,7-dimethoxy-1-((4-methoxyphenoxy)methyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)methanone), atenuaba la alteración inducida por MK-801 en el modelo de PPI y en un modelo de memoria de trabajo [Suryavanshi y cols. 2014]. Es así que, el efecto preferencial de los antagonistas del NMDA-R en los receptores que contienen la subunidad GluN2C plantea la posibilidad de que estos receptores puedan contribuir de manera preferencial a los efectos psicotomiméticos de los antagonistas del NMDA-Rs. **Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, no hay evidencias que muestren la participación funcional de la subunidad GluN2C sobre los efectos comportamentales vinculados a la sintomatología positiva inducidos por la administración sistémica de antagonistas del NMDA-R.**

4. Antecedentes de trabajo particulares para el desarrollo de la Tesis

4.1. Estudios sobre bases neurales del antagonismo del NMDA-R asociado a la sintomatología positiva

Interesados en identificar aquellas regiones y circuitos que participan y subyacen a los efectos comportamentales inducidos por los antagonistas del NMDA-R vinculados a la sintomatología positiva, nos focalizamos en el estudio del circuito RTN-ATN y sus regiones de proyección. Se había reportado que una desinhibición de circuitos cortico-talámicos estaba asociada a las alteraciones funcionales y comportamentales inducidas por los antagonistas del NMDA-R [Andreasen 1997; Tomitaka et al. 2000; Sharp y cols. 2001; Santana y cols. 2011]. Varias evidencias demostraban que los antagonistas del NMDA-R ejercían sus acciones directas a través del bloqueo de los NMDA-Rs expresados en regiones subcorticales o en regiones distales a la CPF [López-Gil y cols. 2007; Amargos-Bosch y cols. 2006; Scorza y cols. 2008].

Varios estudios preclínicos implicaron diferentes núcleos del tálamo con algunas de las acciones inducidas por los antagonistas del NMDA-R. En particular, se observó que la administración sistémica de MK-801 en animales indujo un aumento del metabolismo de glucosa y la expresión del gen *c-fos* en núcleos del tálamo que proyectan a áreas corticales motoras y de asociación [Kurumaji y McCulloch 1989; DeLeonibus y cols. 2002; Hervig y cols. 2016]. Entre estos núcleos talámicos, se destacó al ATN, el cual se conecta de manera recíproca principalmente con la CPF, la corteza cingulada anterior y posterior o RSC y con el HC [Shibata 1998; Dalrymple-Alford y cols. 2015]. En relación a la participación del ATN en los efectos inducidos por los antagonistas del NMDA-R se reportó que, la administración a altas dosis de antagonistas del NMDA-R en ratas produce daño neuronal, evidenciado por un aumento en los niveles de expresión de la proteína *heat shock 70* (marcador de injuria neuronal), principalmente en las neuronas piramidales de la RSC [Tomitaka y cols. 2000; Farber 2003]. Esta región ha demostrado ser altamente vulnerable a la toxicidad causada por estos fármacos y se ha sugerido que esto ocurre debido al severo aumento en la liberación de los neurotransmisores Glu y Acetilcolina en esa región [Olney y cols. 1989; Farber 2003]. Dicho efecto fue bloqueado por la administración local en el ATN de muscimol, un agonista de receptores GABA_A. Este resultado llevó a que se propusiera que el circuito ATN-RSC, posiblemente a través de una desinhibición del ATN mediada por un bloqueo de receptores excitatorios expresados en neuronas inhibitorias del RTN (principal control inhibitorio del ATN), estaba vinculado directamente con las acciones farmacológicas inducidas por los antagonistas NMDA-R [Tomitaka y cols. 2000; Sharp y cols. 2001; Farber 2003]. A su vez, este efecto neurotóxico también se bloqueaba por la administración sistémica de los antipsicóticos Haloperidol y Clozapina, llevando a proponer que una activación patológica de este circuito tálamo-cortical mediaría los síntomas tipo-psicóticos producidos por los antagonistas NMDA-R en humanos y podría subyacer así en la psicosis en la esquizofrenia [Sharp y cols. 2001]. Si bien estos resultados fueron muy importantes para determinar la participación del circuito ATN-RSC en la acción de los antagonistas NMDA-R, el efecto neurotóxico no reflejaba específicamente la sintomatología positiva de la enfermedad, sumado a que este efecto era generado por la administración sistémica de altas dosis de los antagonistas NMDA-R, las que no se utilizan para modelar la sintomatología positiva. Con el fin de resolver esta pregunta, y dado que el ATN recibe principalmente proyecciones GABAérgicas del RTN, nos interesó investigar si el circuito RTN-ATN mediaba la inducción de los efectos comportamentales tipo-psicóticos (o SCM) por el antagonista NMDA-R, MK-801.

Se describe el circuito RTN-ATN, cuya actividad depende de un balance excitatorio/inhibitorio (E/I) el cual parece ser alterado por la administración sistémica del antagonista NMDA-R (Figura 8). Nuestros resultados concuerdan con otros reportes de la literatura que indican que habría una acción preferencial de los antagonistas del NMDA-R por receptores expresados en neuronas del RTN [Zhang y cols. 2009]. **Sin embargo, hasta el desarrollo de ésta Tesis, no existían trabajos que demostraran si una desinhibición específica de la actividad del circuito talámico RTN-ATN era el mecanismo involucrado en los cambios conductuales motores tipo-psicóticos inducidos por la administración sistémica de antagonistas NMDA-R.**

Por otro lado, evidencias más recientes mostraron que la administración sistémica y aguda de PCP bloqueó la tasa de disparo de las neuronas GABAérgicas en el RTN reduciendo significativamente la actividad de éste núcleo, resultados que apoyan la propuesta de que las neuronas GABAérgicas del RTN son un sitio de acción primario de los antagonistas del NMDA-R [Troyano-Rodriguez y cols. 2014]. Las razones para la acción preferencial de los antagonistas del NMDA-R sobre neuronas GABAérgicas no están totalmente esclarecidas. En este sentido, algunas evidencias indican que el RTN posee un mecanismo intrínseco que lo hace más sensible a los antagonistas del NMDA-R [Zhang y cols. 2009], hecho que se vincularía con las propiedades biofísicas de los NMDA-R, determinadas por la composición de sus subunidades. Como fue mencionado previamente, las subunidades GluN2 son las responsables de conferirle una sensibilidad diferencial al bloqueo por Mg^{2+} al NMDA-R afectando así la propiedad rectificadora del canal [Karavanova y cols. 2007]. Se ha sugerido que la acción preferencial de los antagonistas del NMDA-R sobre el RTN se atribuye a la presencia de la subunidad GluN2C [Zhang y cols. 2012a]. Esta subunidad se expresa en forma abundante en el RTN en comparación con otras regiones del cerebro [Wenzel y cols. 1997; Karavanova y cols. 2007]. **Hasta el momento, se desconocía si los efectos comportamentales tipo-psicóticos inducidos por los antagonistas del NMDA-R implican un mecanismo de acción vía NMDA-Rs conformados por la subunidad GluN2C.**

4.2. Estudio sobre el déficit cognitivo inducido por el antagonismo del NMDA-R observado en el LT y su tratamiento

Se sabe que el déficit cognitivo en la esquizofrenia es el resultado de una función e interacción alterada de la actividad de varias regiones cerebrales, incluyendo la CPF, HC, estriado dorsal, así como de múltiples sistemas de neurotransmisión (Glu, GABA, DA), sistemas de modulación sináptica (BDNF) y

receptores [Barch y Ceaser 2012; Favalli y cols. 2012]. Los trastornos cognitivos que se manifiestan en la esquizofrenia poseen una elevada prevalencia en el transcurso de la enfermedad debido a la baja eficacia de los antipsicóticos actuales para tratar estos síntomas [Harvey 2012]. Un gran desafío en la investigación clínica y preclínica de la esquizofrenia es la búsqueda de tratamientos antipsicóticos novedosos que logren mayor eficacia para aliviar los déficits cognitivos. Para el desarrollo de ésta área, particularmente en la fase temprana de la demostración del potencial terapéutico de un fármaco, es de vital importancia la identificación y uso de modelos animales preclínicos que demuestran una sólida validez [Gilmour y cols. 2012]. En este sentido, está ampliamente reportado que la administración sistémica de antagonistas NMDA-R en animales induce deficiencias en diferentes dominios cognitivos que remedan aquellos presentes en la esquizofrenia [Dix y cols. 2010; Smith y cols. 2011; Brown y cols. 2014]. Varias de estas alteraciones cognitivas han sido asociadas con desregulaciones a nivel celular, molecular y neuroquímico en regiones cerebrales específicas, aportando importante información sobre las bases neurales subyacentes a estos déficits cognitivos [Abdul-Monim y cols. 2007; Braun y cols. 2007; Neill y cols. 2010; Reynolds y Neill 2016]. A su vez, varias de estas regiones cerebrales coinciden con aquellas que reportaban alteraciones en los pacientes con esquizofrenia. Este hallazgo permitió afianzar la validación de dichos modelos para su utilización en la evaluación de las alteraciones cognitivas y del mecanismo de acción de fármacos antipsicóticos [Barch y Ceaser 2012; Harvey 2012]. En concordancia con estos reportes, en nuestro grupo de trabajo hemos demostrado que la administración sistémica de MK-801, a dosis bajas (las cuales no inducen las conductas del SCM), genera un efecto amnésico evidenciado en el modelo de LT, un modelo sencillo de instrumentar y económico comparado con otros paradigmas que evalúan la función cognitiva los cuales, en muchos casos, requieren de una infraestructura compleja y costosa e implican entrenamientos prolongados o la punición de los animales [Danysz y cols. 1988; Butelman 1990; Wozniak y cols. 1999]. En los experimentos previamente realizados en nuestro grupo de trabajo, el antagonismo del NMDA-R demostró poseer un efecto sobre la retención o consolidación de la memoria espacial, evidenciado por un aumento de la latencia de transferencia del día 2 (retención o consolidación), en relación al día 1 (adquisición), sin afectar la adquisición de la tarea [López Hill y cols. 2015]. De manera interesante, el efecto amnésico inducido por MK-801 fue bloqueado por la co-administración del AAT Clozapina [López Hill y cols. 2017]. Estos y otros resultados [Celikyurt y cols. 2011] permitieron validar la utilidad del LT como un modelo para estudiar la neurobiología de los procesos de aprendizaje y memoria.

Debido al tipo de memoria que evalúa el modelo LT (memoria episódica espacial), es probable que la misma fuera HC dependiente. **Sin embargo, hasta el momento esta asociación no había sido estudiada. Además, tampoco se había profundizado en el mecanismo específico asociado al déficit cognitivo inducido por el MK-801 en el LT.**

El BDNF es una neurotrofina ampliamente relacionada con diferentes funciones cognitivas, especialmente en los procesos de aprendizaje y memoria dependientes del HC [Patterson y cols. 1996; Tyler y cols. 2002; Lu y cols. 2008; Bekinschtein y cols. 2014]. A su vez, evidencias de la literatura vinculan algunas de las alteraciones cognitivas de los antagonistas del NMDA-R en animales con cambios en la expresión de BDNF en regiones cerebrales fuertemente asociadas a los procesos cognitivos [Kesslak y cols. 2003; Snigdha y cols. 2011]. **Por lo tanto, identificar cambios en los niveles de expresión de BDNF asociados a la alteración conductual inducida por MK-801 evaluada en el LT, en aquellas regiones cerebrales específicamente vinculadas a éste dominio cognitivo brindaría una validez más robusta al modelo de LT para evaluar función cognitiva.**

En los mamíferos, el circuito conformado por el ATN-HC-RSC posee importantes funciones en la formación de memoria y el manejo del espacio, asociándose también con la forma de plasticidad neuronal denominada potenciación a largo plazo (LTP), uno de los principales mecanismos involucrados en el aprendizaje y almacenamiento de memoria [Izquierdo y Medina 1997; Aggleton y Brown 1999]. Estudios funcionales han demostrado que estos circuitos son cruciales en distintos procesos de atención, específicamente, en procesos de orientación y memoria espacial [Vann y cols. 2000; Aggleton 1993; 1999; 2010; Tsanov y cols. 2011]. De manera interesante, se ha observado que luego de la administración sistémica de antagonistas del NMDA-R (PCP y MK-801) se generan alteraciones a nivel celular (expresión del gen c-fos) y electrofisiológicas (alteraciones en el patrón de oscilaciones) en el HC, vinculando a esta estructura con la hipótesis de la hipofunción NMDA-R [Santana y cols. 2011; Kittelberger y cols. 2012]. A su vez, la RSC también se ha visto ampliamente asociada a varios de los efectos inducidos por los antagonistas del NMDA-R (aumento de IEGs, neurotoxicidad, aumento de BDNF), [Hashimoto y cols. 1998; Matsuki y cols. 2001; Farber y cols. 2002]. Estos efectos conductuales y moleculares inducidos por los antagonistas del NMDA-R podrían explicarse por una acción de los fármacos en microcircuitos locales, es decir, actuando sobre interneuronas GABAérgicas presentes en el HC o la RSC, como ha sido propuesto por algunos autores [Grunze y cols. 1996; Rujescu y cols. 2006; Kittelberger y cols. 2012].

Sin embargo, estas respuestas de exacerbación celular también podrían ser explicadas por una acción distal de los antagonistas del NMDA-R en aquellas regiones de proyección al HC y a la RSC que se encuentren bajo un control GABAérgico, como ocurre en el ATN [Liu y cols. 2016]. **En este sentido y en base a las evidencias anatómicas mencionadas y a los efectos comportamentales observados en el modelo de LT luego de la administración de MK-801, se podría hipotetizar que una exacerbación de la salida del ATN (provocada por una desinhibición GABAérgica en el ATN vía RTN) desencadenaría una activación del HC y/o la RSC, afectando, no solo la conducta motora del animal (SCM), sino también a la memoria espacial y la capacidad de aprendizaje del animal evaluada en dicho modelo.**

En particular, en este trabajo se plantea estudiar la participación del circuito RTN-ATN y sus principales regiones de proyección, HC y RSC, que involucre un mecanismo de desbalance en la actividad del ATN, como sustrato clave en la acción de antagonistas del NMDA-R para generar los efectos conductuales asociados a la sintomatología positiva y a los trastornos cognitivos de la esquizofrenia. A su vez, evaluaremos el papel de la subunidad GluN2C en la inducción de éstos efectos.

II. HIPÓTESIS GENERAL

El circuito de RTN-ATN, y sus principales regiones de proyección (HC y RSC), son un sustrato neural clave en la neurobiología de la esquizofrenia vinculada a la sintomatología positiva y los trastornos cognitivos, siendo sensible a la acción de Clozapina. Además, la subunidad GluN2C expresada particularmente en el RTN posee un rol preponderante en la generación de ambos grupos de síntomas.

III. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de esta Tesis se centra en aportar información sobre las bases anatómicas (regiones y circuitos) y moleculares implicadas en la sintomatología positiva y los trastorno cognitivo de la esquizofrenia, mediante el uso del modelo farmacológico del antagonismo del NMDA-R, así como de la acción de la Clozapina en dichas bases.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Capítulo 1. Objetivos específicos asociados al estudio de la sinomatología positiva de la Esquizofrenia

- 1.1.** Evaluar el efecto comportamental tipo-psicótico inducido por MK-801 sistémico y por la desinhibición GABAérgica del ATN, modelando la exacerbación de la actividad del circuito RTN-ATN.
- 1.2.** Evaluar el efecto en la actividad neural en el ATN y regiones de proyección, inducida por MK-801 sistémico y por la desinhibición GABAérgica del ATN, modelando la exacerbación de la actividad del circuito RTN-ATN.
- 1.3.** Evaluar la capacidad de Clozapina administrada en el ATN para atenuar el efecto comportamental tipo-psicótico inducido por la administración sistémica de MK-801.
- 1.4.** Evaluar la participación de la subunidad GluN2C en la inducción de los efectos comportamentales tipo-psicóticos por la administración sistémica de MK-801 y PCP.

Capítulo 2. Objetivos específicos asociados al estudio de los trastornos cognitivos de la Esquizofrenia

- 2.1.** Evaluar la participación de las regiones de proyección del ATN, HC y RSC y los mecanismos moleculares involucrados (BDNF), en el déficit cognitivo inducido por MK-801 sistémico en el modelo de LT, y la capacidad de Clozapina para atenuarlo.
- 2.2.** Evaluar los efectos comportamentales sobre la memoria espacial evaluada en el modelo LT, inducidos por la desinhibición GABAérgica del ATN.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

1.1 Ratas

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar de 270-320 gr. Los animales fueron obtenidos en el Bioterio del IIBCE. Fueron criados y alojados en cajas de 48.0 x 37.5 x 21.0 cm en grupos de 6 animales y mantenidos en condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C), ciclo de luz-oscuridad (7:00 AM-7:00 PM), alimentación y agua *ad libitum*. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo a las normas éticas establecidas y aprobadas por la Comisión de Bioética del IIBCE y de acuerdo con la Ley Nacional de experimentación animal Nº 18.611.

1.2 Ratones

Se utilizaron ratones macho adultos wild-type (WT) y *knock-out* para la subunidad GluN2C del receptor glutamatérgico NMDA (KO-GluN2C) retrocruzado sobre un fondo genético C57BL / 6J (logrando > 99% de homogeneidad genética). Todos los animales fueron criados y alojados en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Barcelona, en un entorno controlado (ciclo de luz / oscuridad de 12 h, 22 ± 1 °C temperatura ambiente) con acceso *ad libitum* a alimentos y agua. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la legislación nacional (Decreto Real 53/2013) y europea (Directiva 2010/63 / UE, sobre la protección de animales utilizados con fines científicos, 22 de septiembre de 2010), y fueron aprobados por el Institutional Animal Care y Comité de Uso de la Universidad de Barcelona.

2. Drogas y vías de administración

MK-801 [dizolcipina, (5R,10S)-(1)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo [a,d]cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate]] y PCP [fenciclidina, 1- (1-Fenilciclohexil) piperidina] fueron obtenidos en Sigma-Aldrich. Bicuculina met-bromide (14340) de Sigma-Aldrich fue donada por el Dr. Pablo Torterolo del Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina. Clozapina fue obtenida en Tocris Bioscience. La ketamina y la xilazina se adquirieron de Konsol Köning S.A Laboratory (número de serie 15-062 y 15-148, respectivamente). Las drogas fueron preparadas disueltas en salino (MK-801, PCP y Bicuculina) o vehículo HCl 2% (Clozapina), alicuotadas y conservadas a -20 °C hasta el momento de ser utilizadas en los experimentos.

Las vías de inyección fueron: intraperitoneal (i.p.) para el caso de MK-801, subcutánea (s.c.) para PCP y microinyección intracerebral para Bicuculina, mientras que para Clozapina se utilizaron las vías de administración s.c. y microinyección intracerebral. El volumen de inyección para la administración sistémica fue de 1 ml/kg en los experimentos con ratas y de 4 ml/kg en los experimentos con ratón.

3. Cirugía Estereotáxica

Ratas macho Wistar adultas fueron anestesiadas con ketamina (90 mg/kg i.p.) y xilasina (5 mg/kg i.p.) y colocados en un aparato estereotáxico para la implantación de cánulas bilaterales (Plastic One, USA) en el ATN (AP: -1,56; Lat: \pm 1.00; DV: -5.80) [Paxinos, Watson 2005] (Figura 9 A-B). Las cánulas fueron fijadas al cráneo con acrílico dental, 1 mm por encima de la región de interés para evitar el daño del tejido. Luego de la intervención los animales fueron trasladados nuevamente al Bioterio. Luego de 5 o 6 días de recuperación de la cirugía estereotáxica los animales fueron utilizados según los protocolos experimentales correspondientes a cada uno de experimentos realizados en los diferentes objetivos específicos.

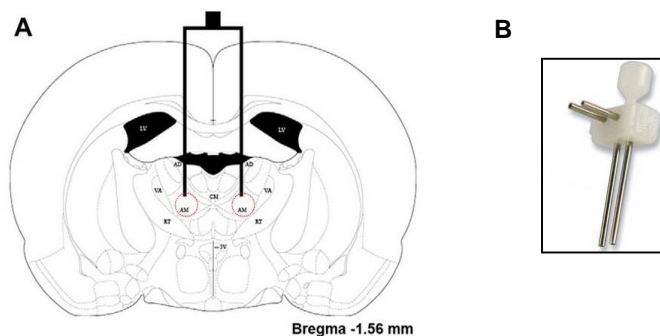


Figura 9 A-B. Representación de un corte coronal de cerebro de rata a nivel del ATN (Bregma -1.56 mm) mostrando la localización de la cánula de administración bilateral y la zona de microinyección de bicuculina (círculos rojos), (A). Imagen de la cánula de administración bilateral Plastic One (B).

4. Paradigmas comportamentales

Todos los experimentos conductuales realizados en este trabajo fueron llevados a cabo en el cuarto de experimentación del Departamento de Neurofarmacología Experimental del IIBCE, y en el Departamento de Neuroquímica y Neurofarmacología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona (IIBB).

En ambos casos las condiciones ambientales de temperatura y ciclo luz-oscuridad similares a las existentes en las instalaciones de crianza. En todos los casos, los animales fueron trasladados al cuarto de comportamiento 24 hs antes de la realización de cada experimento para lograr su correcta habituación al ambiente. Los efectos comportamentales inducidos por los diferentes tratamientos en cada uno de los objetivos específicos fueron evaluados en los siguientes paradigmas comportamentales:

4.1 Modelo de campo abierto para rata y ratón

El Campo Abierto (CA) es un modelo ampliamente utilizado para evaluar la actividad locomotora horizontal [Montgomery y Monkman 1955; Archer 1973; Lamprea 2008] así como la exploración vertical o *rearings*. El mismo consiste en una caja con paredes de acrílico con dimensiones que varían según sea el modelo animal que se vaya a utilizar: las dimensiones de la caja son de 60 x 60 cm de lado y 40 cm de alto en el caso de utilizar ratas, mientras que las dimensiones para ratones son de 30 x 30 cm de lado. En todos los casos el CA está equipado con una cámara de video conectada a un software de video-seguimiento Ethovision XP (Noldus) diseñado para el registro automático de la conducta de los animales (Figura 10). Dicho sistema permite filmar los experimentos para el posterior análisis y cuantificación de parámetros: distancia recorrida, patrón locomotor, velocidad de movimiento, tiempo de permanencia en el centro y la periferia durante el tiempo de registro.



Figura 10. Modelo de campo Abierto (CA) para rata acoplado a una cámara de video. Software de video-seguimiento Ethovision XP.

4.2 Modelo de Latencia de Transferencia

El modelo de Latencia de Transferencia (LT) fue diseñado a partir del modelo Laberinto en cruz Elevado o *Plus-Maze* clásicamente utilizado para evaluar ansiedad experimental en ratas [Lister, 1990; Pellow y File, 1986]. En este caso, se utiliza el mismo aparato pero con una modificación en el paradigma con el fin de poder evaluar la función cognitiva de los animales a través de registrar el parámetro de Latencia de transferencia [Hlinák 1998; 2002]. El aparato consiste en dos brazos abiertos (50 x 10 cm) cruzados en ángulo recto con dos brazos cerrados (50 x 10 x 40 cm), unidos por una plataforma central común (10 x 10 cm) y elevado 50 cm del suelo (Figura 11). El registro del parámetro LT consiste en cuantificar el tiempo que demora el animal entrar a uno de los brazos cerrados del modelo una vez que es colocado en el extremo de uno de los brazos abiertos del laberinto. Este procedimiento se realiza una vez por día durante 3 días consecutivos. El primer día se realiza la **sesión de adquisición** la cual consiste en someter al animal al modelo colocándolo en el extremo de uno de los brazos abiertos y dejando que lo explore libremente hasta que encuentre y entre en un brazo cerrado. Se registra el tiempo que demora en realizar esa tarea (LT1). En esta sesión el animal adquiere la tarea. En el día 2 (24 hs después de LT1) se realiza la **sesión de evocación** donde se vuelve a someter al animal a la misma tarea y se registra el tiempo de latencia (LT2). En el día 3 (48 hs después de LT1) se realiza la **sesión de evaluación de efecto a largo plazo** donde se registra LT3 como control de reversión de un potencial efecto amnésico. En este modelo se espera que un animal control reporte un tiempo de LT2 y LT3 menor al tiempo registrado para LT1 demostrando que el animal aprendió la tarea durante la sesión de adquisición y fue capaz de evocarla. Por el contrario un efecto amnésico se refleja en un valor de LT2 (y eventualmente de LT3) similar al de LT1.

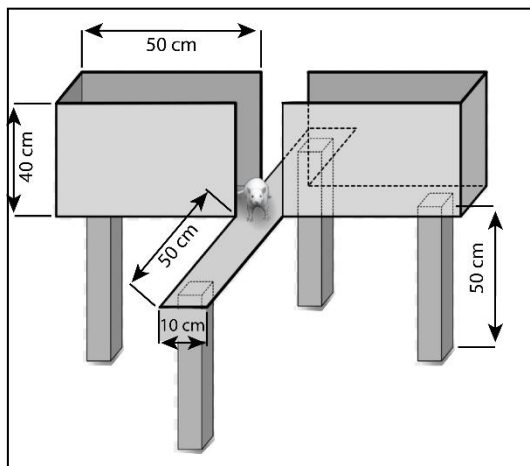


Figura 11. Modelo de Laberinto en cruz elevado utilizado para registrar Latencia de Transferencia donde se observan los brazos abiertos y cerrados y se especifican las dimensiones del aparato.

5. Técnicas bioquímicas y análisis

5.1 Inmuno-histoquímica para determinar la expresión del gen temprano Fra-2

La inmunohistoquímica es una técnica que permite localizar moléculas o antígenos (Ag) en los tejidos mediante el empleo de anticuerpos (Ac; proteínas del tipo inmunoglobulina G) específicos, a través de la generación de un complejo de unión Ag-Ac. Esta técnica, por la gran especificidad y alta afinidad que tienen los Ac para reconocer los Ag y unirse a ellos, permite detectar cantidades ínfimas de moléculas presentes en los tejidos [Hoffman y cols. 2008].

En este trabajo de Tesis, a través de la aplicación de ésta técnica, determinamos la inmuno-reactividad para la proteína Fra-2 (Fra-2-IR), producto protéico del gen de expresión temprana relacionado a *fos*, *fra-2* [Kovács 2008]. Se realizaron ensayos de inmunohistoquímica indirecta en criosecciones de tejido procesados en flotación libre lo cual permite una mayor penetración de los Ac, utilizando un Ac primario policlonal anti-Fra-2, un Ac secundario biotinilado y el método de detección del complejo Avidina-Biotina combinado con el cromógeno diaminobenzidina (DAB) y Niquel. La técnica se realizó en secciones de cerebros fijados de un grosor de 40 micras conteniendo las regiones de interés de animales tratados (MK-801 0.2 mg/kg i.p. o Bic 100 ng intra-ATN) o sus respectivos vehículos, y sacrificados luego de 120 minutos de recibir la administración de los distintos tratamientos y ser evaluados en el modelo de CA para confirmar la inducción del SCM.

5.1.1 Método de análisis de imágenes y cuantificación de Fra-2-IR

Todas las secciones fueron examinadas utilizando un microscopio Nikon E800. Para el muestro de las regiones cerebrales las imágenes digitales se capturaron con un objetivo x10 a través de una cámara digital monocromática CollSNAP-Pro (Media Cybernetic, Silver Spring, EE. UU.). El software Image ProPlus se utilizó para la adquisición y análisis de las mismas [Richeri et al. 2005; 2010]. Para la cuantificación de los núcleos inmunorreactivos de Fra-2 los núcleos positivos para Fra-2 se contaron mediante un procedimiento automatizado seleccionando partículas del tamaño apropiado. Se consideró que la señal de Fra-2 positiva estaba al menos tres veces por encima del fondo. Las áreas de muestreo fueron definidas de acuerdo a las regiones de interés.

Se generaron cuadrículas de diferentes tamaños teniendo en cuenta las dimensiones de las regiones específicas y se superponen en la imagen correspondiente para la cuantificación. Para RSC y HC, los núcleos positivos para Fra-2 se contaron en dos niveles diferentes (-3.48 y -5.40 mm desde bregma) y se expresaron como el recuento total \pm EEM. El número de núcleos positivos para Fra-2 para cada región se promedió en ambos hemisferios en dos secciones adyacentes. En la región hipocampal del giro dentado (DG), la inmunotinción de Fra-2 se cuantificó como área inmunorreactiva en todos los grupos experimentales.

Los detalles del procedimiento de la técnica, así como para la obtención del tejido, se describen en el Trabajo publicado 1.

5.2 Ensayo de inmuno-adsorción ligado a enzimas (ELISA) para determinar la expresión de BDNF

La técnica de ELISA (del inglés *enzyme linked immunosorbent assay*) es una técnica inmunológica en la cual el antígeno está inmovilizado en una placa y se detecta mediante un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable, como cambio de color o algún otro tipo [Hornbeck 1994]. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra. Una de las variantes de ésta técnica es el ensayo ELISA *Sandwich*. En esta variante un primer Ac anti-Ag se coloca en exceso recubriendo el piso de los pocillos de una placa. Luego se aplica la muestra problema en la que se encuentra el Ag el cual será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer Ac. Después se aplica una solución con un segundo Ac anti-Ag marcado. De esta forma cada molécula de Ag estará unida a un Ac en la base que lo retiene y un segundo Ac que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo Ac.

En este trabajo de Tesis se utilizó la técnica ELISA *Sandwich* para detectar la neurotrofina BDNF, presente en el sobrenadante de homogeinatos de tejido cerebral fresco de la región de interés de animales tratados con MK-801 i.p., Clozapina s.c. y la combinación de Clozapina y MK-801 o sus respectivos vehículos, y a continuación evaluados en el paradigma conductual LT. La detección colorimétrica se realizó con un Ac conjugado a la enzima Peroxidasa de rábano (HRP).

Los detalles del procedimiento de la técnica, así como para la obtención del tejido, se describen en los Trabajos publicados 2 y 3.

5.2.1 Ensayo de ácido bicinconínico (BCA) para cuantificación de proteínas

El ensayo de BCA es uno de los ensayos bioquímicos más comunes para cuantificar proteínas totales [Brown 1989]. Se basan en la conversión del Cu^{2+} a Cu^{1+} en condiciones alcalinas. Esta reacción es influenciada por cuatro aminoácidos (cisteína, cistina, tirosina y triptófano) y también por la cadena peptídica. BCA es un reactivo cromogénico específico para Cu^{1+} y en el segundo paso de la reacción dos moléculas de BCA reaccionan con una de ión Cu^{1+} . La cantidad de Cu^{2+} reducido es función de la concentración de proteínas y puede ser determinada espectrofotométricamente por un cambio en el color de la solución a púrpura, que absorbe a 562 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la solución y puede ser estimada por comparación con un estándar de proteína conocido, tal como la albúmina sérica bovina (BSA), [Wiechelman y cols. 1988]. Este ensayo fue utilizado para la normalización de los valores de BDNF presentes en el sobrenadante de las muestras de HC y RSC de los animales tratados con MK-801 i.p. y la co-administración de Clozapina y MK-801 y evaluados en el modelo de memoria LT. Para determinar la densidad óptica en todos los ensayos se utilizó un lector de placas Varioskan Flash, Thermo Scientific.

Los detalles del procedimiento de la técnica, así como para la obtención del tejido, se describen en los Trabajos publicados 2 y 3.

6. Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como la Media \pm Error Estándar de la Media (EEM). La distribución de los datos fue evaluada a través del test Kolmogorov-Smirnov. Según las comparaciones, se utilizó el Test de Student t-Test o el análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías de muestras independientes seguido de los tests de comparación múltiple Newman-Keuls o Duncan's según el grupo de experimentos analizados. Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa GraphPad Prism vs 7.0 o 12.0. La significancia estadística fue fijada en $P < 0.05$.

VI. ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES

Objetivo específico 1.1. *Evaluar el efecto comportamental tipo-psicótico inducido por MK-801 sistémico y por la desinhibición GABAérgica del ATN, modelando la exacerbación de la actividad del circuito RTN-ATN.*

Para llevar adelante este objetivo, fueron utilizados dos grupos experimentales independientes de animales

1) un grupo de animales sin operar fueron inyectados con MK-801 0.2 mg/kg i.p. o salino (grupo control). Treinta minutos después de la inyección los animales fueron colocados en el CA para el registro de las conductas motoras que componen el SCM de los antagonistas NMDA-R, durante 30 min. (Esquema 1A).

2) un grupo de animales con implantación de cánulas bilaterales en el ATN fueron micro-inyectados con bibuculina (antagonista GABAérgico; 100 ng) o salino intra-ATN (grupo control) a un flujo de 0.5 µl/min durante 1 min. y 20 seg de espera, mediante una bomba de perfusión Harvard PHD2000. Pasados 2 min., los animales fueron colocados en el modelo de CA para el registro de las mismas conductas motoras, durante 30 min (Esquema 1B).

En simultáneo al registro automático de la actividad locomotora, con el software de video seguimiento, se cuantificaron por observación directa las siguientes conductas motoras:

1) número de estereotipias: *head shakes* o sacudidas de cabeza (conducta natural de los animales) y *head weavings* (movimiento lateral y repetido de la cabeza sin locomoción, conducta únicamente inducida por fármacos);

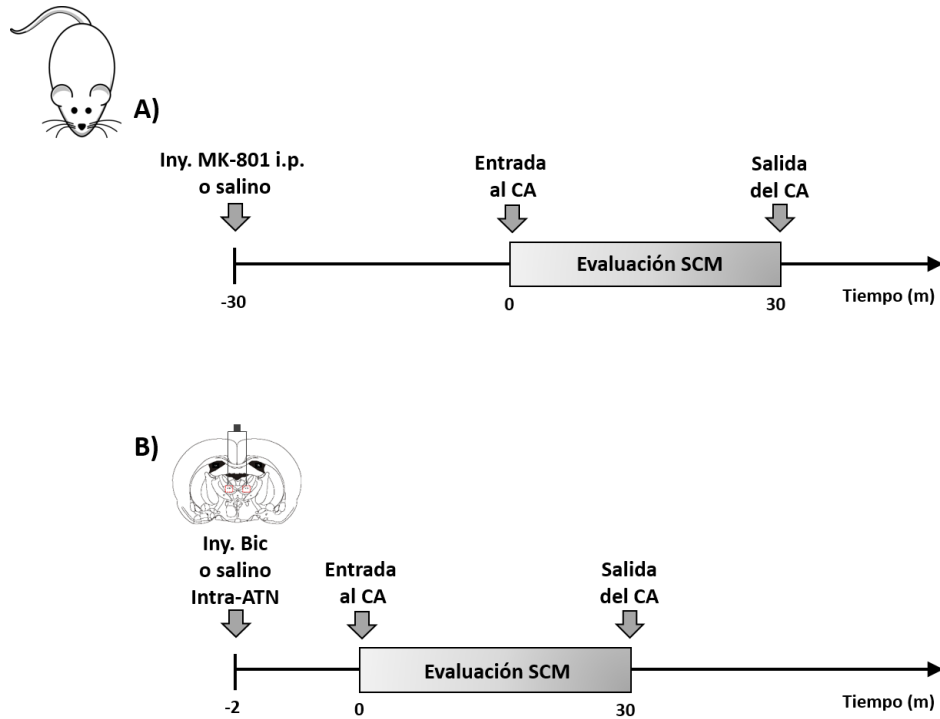
2) número de *rearings* como índice de la actividad exploratoria vertical;

3) patrón locomotor, definido por el grado de desorganización del movimiento (locomoción no dirigida por la exploración), por el grado de movimiento continuo o “no frenado” y por la aparición de conductas de ataxia tales como número de caídas torpes y la abducción de las patas traseras.

Para la cuantificación del movimiento desorganizado, movimiento continuo y la abducción de las patas traseras se utilizó una escala de intensidad de 0-3 donde 0= ausente, 1= leve, 2= presente y 3= intenso [Tricklebank 1985].

Una vez finalizado el tiempo de registro para cada animal, el CA fue limpiado con alcohol al 30 % para volver a colocar al siguiente animal.

Para el caso de los animales con cánulas de administración implantadas en el ATN, al final de cada experimento, la correcta localización de las cánulas en el ATN fue determinada por cortes en crióstato. Aquellos animales que no mostraron una correcta localización fueron excluidos del grupo experimental.



Esquema 1 A-B. Protocolos experimentales utilizados para evaluar el síndrome conductual motor inducido en ratas luego de la administración de MK-801 (0.2 mg/kg) i.p. (A) y bicuculina (Bic, 50 y 100 ng) intra-ATN (B) evaluado en el CA durante 30 min.

Con el fin de identificar la dosis de bicuculina intra-ATN inductora del SCM, se realizó una curva dosis-respuesta de bicuculina intra-ATN (Figura 12). En esta primera etapa se analizó únicamente la actividad motora, dado que la hiperactividad es la conducta prototípica del SCM.

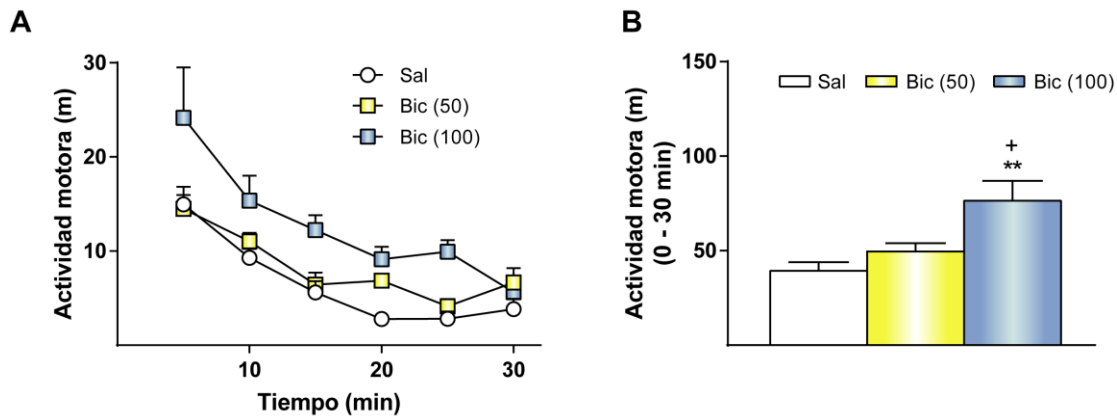


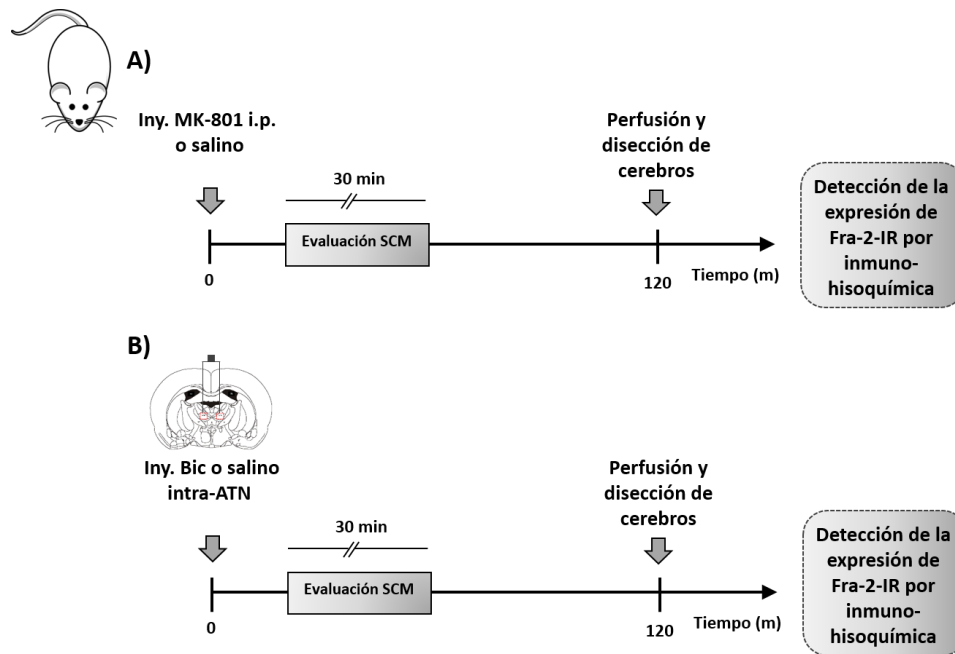
Figura 12. Efecto dosis-respuesta de la microinyección de bicuculina (Bic, 50 y 100 ng) intra-ATN, sobre la actividad motora de los animales, en función del tiempo (A) y la actividad total (B). Los datos se expresan como la media de porcentaje respecto al grupo control \pm EEM. ANOVA de una vía. Post-hoc Newman-Keuls. * = vs grupo control; += vs Bicuculina 50 ng; **= $p = 0,01$; + = $p = 0.05$. $N=7$.

De acuerdo a los resultados de esta curva dosis-respuesta, se seleccionó la dosis de 100 ng de bicuculina para realizar los experimentos de desinhibición GABAérgica del ATN y evaluación del SCM. La dosis menor (50 ng), fue utilizada para los estudios de memoria en el modelo de LT, dado que la hiperactividad motora puede alterar la performance del animal en la tarea de aprendizaje.

Objetivo específico 1.2. Evaluar el efecto en la actividad neural en el ATN y regiones de proyección, inducida por MK-801 sistémico y por la desinhibición GABAérgica del ATN, modelando la exacerbación de la actividad del circuito RTN-ATN.

Para cumplir este objetivo se procedió a cuantificar la Fra-2-IR en las regiones cerebrales de proyección directas e indirectas del ATN (RSC, HC, CPFm, EC, NAc Core y Shell) en ratas tratados con MK-801 (0.2 mg/kg) i.p o bicuculina (100 ng) micro-inyectada en el ATN o sus respectivos vehículos y evaluadas conductualmente en el CA durante 30 min. Dos horas después del momento de recibir el tratamiento correspondiente y de haber sido evaluados en el modelo CA para determinar la inducción del SCM, los animales fueron sacrificados y sus cerebros disecados para la posterior detección de Fra-2-IR por la técnica de inmunohistoquímica (Protocolo experimental: Esquema 2 A-B).

Como control negativo de la técnica se utilizó un corte conteniendo la misma región a evaluar aunque se omitió la incubación con el Ac primario. Como control positivo de la técnica se utilizaron cortes cerebrales con el mismo protocolo de fijación de animales tratados con el estimulante anfetamina (2.5 mg/kg). Todas las secciones de tejido de los grupos tratados de animales y de control, fueron teñidos al mismo tiempo y con el mismo lote de Ac. En todos los casos se realizaron controles de la especificidad de la inmunomarcación omitiendo la incubación con el Ac primario.



Esquema 2 A-B. Protocolo experimental para la determinación de Fra-2-IR en las principales regiones de proyección directas e indirectas del ATN en cortes de cerebros de ratas luego de 120 min de haber recibido una inyección de MK-801 (0.2 mg/kg) i.p. (A) o bicuculina (Bic, 100 ng) intra-ATN (B) y evaluado su comportamiento en el modelo de CA.

Regiones de interés para la detección de los niveles de expresión de IR-Fra-2

Las regiones de interés para los análisis inmunohistoquímicos de Fra-2 se determinaron según el atlas de Paxinos y Watson (2005). Todas las regiones analizadas según bregma: ATN, -1.56 mm; corteza prefrontal medial (mPFC), incluidas las subregiones cingulada (Cg), prelímbica (PrL) e infralímbica (IL), +3.24 mm; dorsal (caudado-putamen, CPu) y estriado ventral (núcleo y núcleo del núcleo accumbens, NAc, co y NAc, sh), +1.68 mm; hipocampo dorsal (HC; campo CA1 y DG) y corteza retrosplenial (RSC), -3.48 mm y -5.40 mm; subículo del hipocampo ventral (Sb), y la corteza entorrinal (EC), -5.40 mm (Figura 13).



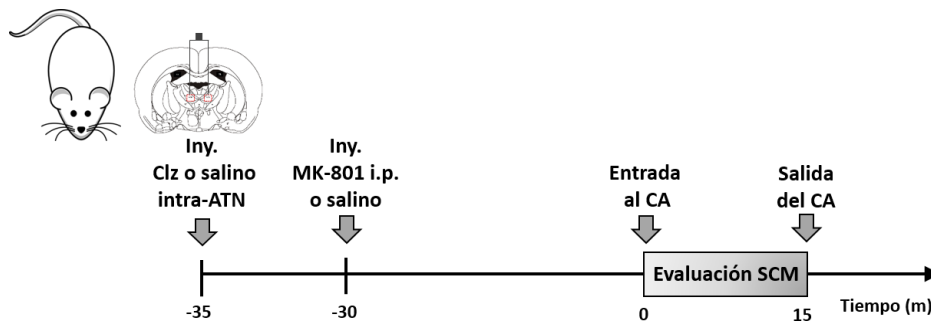
Figura 13. Principales regiones de proyección directas e indirectas del ATN en las cuales se determinó Fra-2-IR por inmunohistoquímica. Cg, Corteza prefrontal cingulada; PrL, Corteza prefrontal prelímbica; IL, Corteza prefrontal infralímbica; CPu, cuerpo estriado dorsal; NAc, Núcleo accumbens; c, core; Sh, Shell; ATN, núcleo anterior del tálamo; RT, núcleo reticular del tálamo; CA1, subregión 1 del Cuerpo de Ammonis; DG, Giro dentado; Sb, subículo; RSC, Corteza retrosplenial; EC, Corteza entorrinal; fmi, fórmix menor; cc, cuerpo caloso; LV, ventrículo lateral; DV, ventrículo dorsal; 3V, tercer ventrículo; Aq, acueducto.

Objetivo específico 1.3. *Evaluar la capacidad de Clozapina administrada en el ATN para atenuar el efecto comportamental tipo-psicótico inducido por la administración sistémica de MK-801.*

En este objetivo se utilizaron ratas implantadas con cánulas bilaterales en el ATN que luego de 5-6 días de recuperación de la cirugía fueron tratados con una micro-inyección de Clz (50 y 200 μ M) o salino intra-ATN mediante una bomba de perfusión a un flujo de 0.2 μ l/min, durante 1 min. y 1 min de espera. Inmediatamente después fueron inyectados con MK-801 (0.2 mg/kg) o salino i.p. y luego de 30 min. evaluados en el CA durante 15 min (Esquema 3). Estudios previos en nuestro laboratorio permitieron

determinar que en este tiempo se alcanza el efecto máximo de MK-801 siendo un tiempo óptimo para evaluar la capacidad de atenuación de Clz. Las dosis mayor de Clz fue seleccionada en base a evidencias que reportaban la inducción de un aumento en la liberación de DA extracelular en la CPF de ratas por la inyección local de dosis similares de Clz [Diaz-Matrix y cols. 2005]. Las conductas evaluadas son aquellas que conforman el SCM de los antagonistas del NMDA-R y que se detallaron anteriormente para el objetivo específico 1.1.

Al final de cada experimento, la correcta localización de las cánulas en el ATN fue determinada por cortes en crióstato. Aquellos animales que no mostraron una correcta localización fueron excluidos del grupo experimental.



Esquema 3. Protocolo experimental utilizado para determinar si la administración en ratas de Clz (50 y 200 μ M) intra-ATN es capaz de bloquear el SCM inducido por MK-801 (0.2 mg/kg) i.p evaluado en el modelo de CA.

Objetivo específico 1.4. Evaluar la participación de la subunidad GluN2C en la inducción de los efectos comportamentales tipo-psicóticos por la administración sistémica de MK-801 y PCP.

En esta serie de experimentos se utilizaron ratones *knock-out* para la subunidad GluN2C (KO-GluN2C) y se evaluó la inducción del SCM luego de la administración sistémica de MK-801 (0.25 mg/kg), PCP (5 mg/kg) o salino. Los resultados fueron comparados con ratones wild type (WT) tratados con la misma dosis de MK-801 y PCP (Esquema 4 A-B). Este objetivo se llevó adelante gracias a una colaboración establecida con el grupo dirigido por el Dr. Francesc Artigas del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona, quienes cuentan con una colonia de ratones KO-GluN2C.

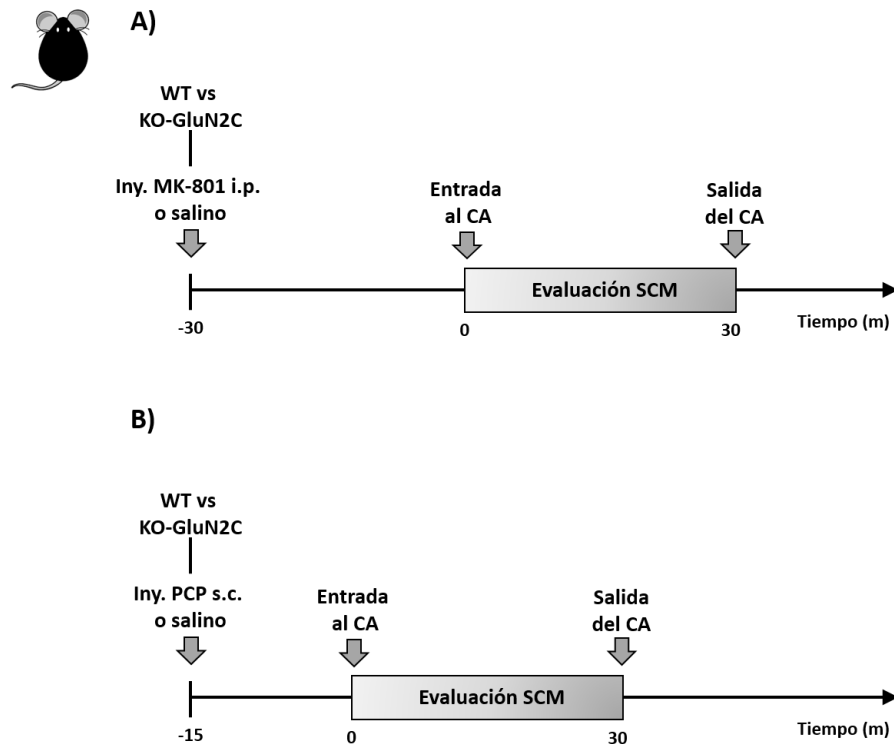
Las conductas evaluadas automáticamente con el software Ethovision 12 durante los 30 min. de registro fueron:

1) Actividad locomotora o distancia recorrida y 2) Sinuosidad del movimiento o *meander*, definido como un parámetro que describe el patrón del movimiento a través de la evaluación de los giros realizados por el animal durante su desplazamiento.

Paralelamente se registraron por observación directa, las otras conductas del SCM:

- 1) número de *rearings* como índice de la actividad exploratoria vertical;
- 2) signos de ataxia: incluyendo número de caídas torpes, abducción de patas
- 3) *Circling*, definido como el desplazamiento en forma de círculos, parámetro que evalúa el patrón del movimiento del animal.

Para la cuantificación de la abducción de las patas traseras y el *circling* se utilizó una escala de intensidad de 0-3 donde 0= ausente, 1= leve, 2= presente y 3= intenso [Tricklebank 1985].

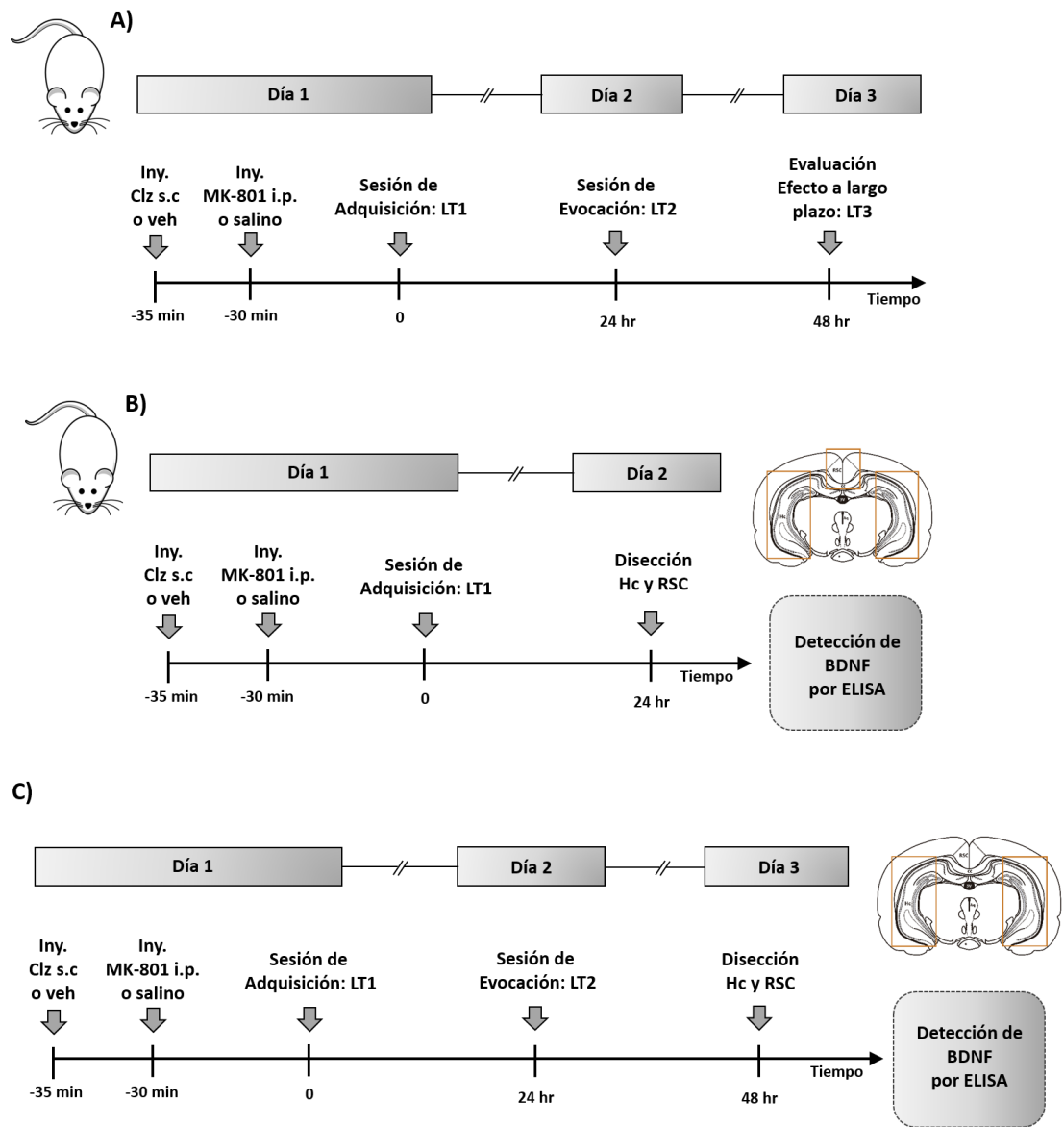


Esquema 4 A-B. Protocolo experimental utilizado para determinar si la administración de MK-801 (0.25 mg/kg) i.p (A) o PCP (5 mg/kg) s.c. (B) induce el SCM en ratones KO-GluN2C y WT, evaluados en el modelo de CA.

Objetivo específico 2.1. *Evaluar la participación de las regiones de proyección del ATN, HC y RSC y los mecanismos moleculares involucrados (BDNF), en el déficit cognitivo inducido por MK-801 sistémico en el modelo de LT, y la capacidad de Clozapina para atenuarlo.*

Para llevar adelante este objetivo se partió de resultados previos de nuestro laboratorio (Tesis de Maestría) en los que se había determinado que la administración sistémica i.p. de MK-801 0.05 mg/kg (que no genera el SCM) en ratas inducía un efecto amnésico en el modelo de memoria LT y que éste efecto era bloqueado por el antipsicótico atípico Clozapina. Restaba determinar si ambos efectos se asociaban a cambios en los niveles de BDNF en el Hc y la RSC, dos regiones fuertemente involucradas en procesos de memoria tipo espacial. Teniendo en cuenta el protocolo utilizado en esa instancia para inducir el efecto amnésico por MK-801 y su bloqueo por Clozapina (Esquema 5A), definimos tiempos experimentales similares para evaluar los niveles de expresión BDNF en las regiones neurales de interés planteadas en éste objetivo específico (HC y RSC).

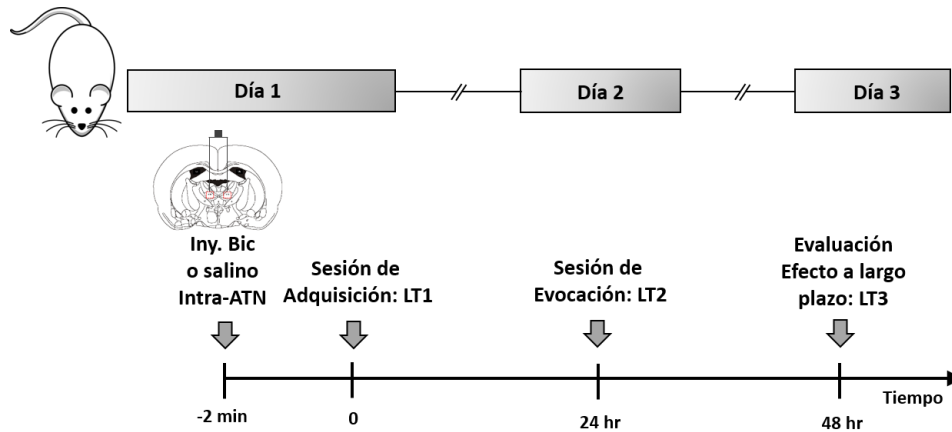
Utilizamos dos grupos de ratas, ambos tratadas con MK-801 (0.05 mg/kg) o salino y posteriormente (5 min.) inyectados con Clz (1 mg/kg s.c.) o su vehículo. Con el fin de determinar si el efecto amnésico inducido por MK-801 evidenciado en LT2 y su atenuación por Clozapina se asociaba a cambios en los niveles de BDNF, el primer grupo de animales fue sacrificado al tiempo de la evaluación comportamental (grupo LT2). Con el fin de determinar si los cambios en los niveles de BDNF permanecían o no a largo plazo, el segundo grupo de animales tratado con MK-801 y Clozapina fue sacrificado al tiempo correspondiente a LT3 (grupo LT3). En el Esquema 5 B y C se muestran ambos protocolos experimentales. En ambos casos, inmediatamente después del sacrificio de los animales, los cerebros fueron removidos para la disección de las regiones de interés (HC y RSC) y posterior evaluación de los niveles de la proteína BDNF por la técnica de inmunoabsorción ligado a enzimas ELISA.



Esquema 5 A-C: Protocolos experimentales utilizados para determinar el efecto amnésico de inducido por MK-801 y su atenuación por Clozapina (datos previos del laboratorio) (A); los niveles de expresión de la proteína BDNF en el HC y RSC 24 hs después de la sesión LT2 (B) y los niveles de expresión de la proteína BDNF en el HC 24 hs después de la sesión LT2 (C).

Objetivo específico 2.2. Evaluar los efectos comportamentales sobre la memoria espacial evaluada en el modelo LT, inducidos por la desinhibición GABAérgica del ATN.

Se utilizaron ratas implantadas con cánulas bilaterales en el ATN los cuales fueron micro-inyectadas con bicuculina (50 ng) o salino intra-ATN (grupo control) a un flujo de 0.5 μ l/min durante 1 min. y 20 seg de espera, mediante una bomba de perfusión Harvard PHD2000. Pasados 2 min. los animales fueron colocados en el modelo de LT para la sesión adquisición del modelo donde se registró LT1. 24 y 48 hs después, se registraron LT2 (sesión de evocación) y LT3 (sesión de evaluación de efecto a largo plazo), (Esquema 6). La dosis de bicuculina utilizada para este objetivo fue seleccionada según los resultados obtenidos en la curva dosis-respuesta. (Figura 12).



Esquema 6: Protocolo experimental utilizado para la evaluar el efecto sobre la memoria luego de la administración de bicuculina (50 ng) intra-ATN en ratas, mediante el modelo de latencia de transferencia.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

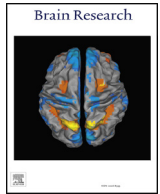
Capítulo 1-Resultados I

Los resultados que se describirán en esta sección se enmarcan dentro de los primeros 3 objetivos específicos planteados en la presente Tesis. En dichos objetivos se propuso evaluar los efectos comportamentales tipo-psicóticos (SCM) y celulares luego de la desinhibición GABAérgica del ATN y su comparación con los efectos observados luego de la administración sistémica de MK-801. A su vez, se evaluó si el ATN era un sustrato sensible a la acción de Clozapina para atenuar la inducción del SCM por MK-801 sistémico.

Los resultados obtenidos en los objetivos específicos 1.1 y 1.2 fueron incluidos en la Publicación científica 1.

- **Publicación científica 1: Ximena López Hill, Analía Richeri, Ronald McGreagor, Alejo Acuña, Cecilia Scorza.** Neuro-behavioral effects after systemic administration of MK-801 and disinhibition of the anterior thalamic nucleus in rats: Potential relevance in schizophrenia. *Brain Res.* 1718: 176-185, 2019.

Publicación científica 1



Research report

Neuro-behavioral effects after systemic administration of MK-801 and disinhibition of the anterior thalamic nucleus in rats: Potential relevance in schizophrenia



Ximena López Hill^a, Analía Richeri^{a,b}, Ronald McGregor^{c,d,e}, Alejo Acuña^a, Cecilia Scorza^{a,*}

^a Department of Experimental Neuropharmacology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

^b Laboratory of Cell Biology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

^c Veterans Administration Greater Los Angeles Healthcare System, Neurobiology Research (151A3), North Hills, CA 91343, United States

^d Department Psychiatry and Biobehavioral Sciences, University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, United States

^e Brain Research Institute, University of California at Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, United States

HIGHLIGHTS

- NMDA-R antagonists have been suggested to evoke psychotomimetic actions.
- GABAergic mechanisms in thalamic circuits seems to be involved.
- We studied the participation of the anterior thalamic nucleus and brain projections.
- Behavioral and brain activation studies were performed.
- Our data revealed brain circuits engaged in NMDA-R antagonists actions.

ARTICLE INFO

Keywords:

Schizophrenia
NMDA-R antagonism
Thalamus
Bicuculline
Fra-2 immunoreactivity

ABSTRACT

Non-competitive N-methyl-d-aspartate receptor (NMDA-R) antagonists have been suggested to evoke psychotomimetic-like behaviors by selectively targeting GABAergic elements in cortical and thalamic circuits. In previous studies, we had reported the involvement of the reticular and anterior thalamic nuclei (ATN) in the MK-801-evoked hyperactivity and other motor alterations. Consistent with the possibility that these responses were mediated by thalamic disinhibition, we examined the participation of cortical and hippocampal areas innervated by ATN in the responses elicited by the systemic administration of MK-801 (0.2 mg/kg) and compared them to the effects produced by the microinjection of a subconvulsive dose of bicuculline (GABA_A receptor antagonist) in the ATN. We used the expression of Fos related antigen 2 (Fra-2) as a neuronal activity marker in the ATN and its projection areas such as hippocampus (HPC), retrosplenial cortex (RS), entorhinal cortex (EC) and medial prefrontal cortex (mPFC). Dorsal (caudate-putamen, CPu) and ventral striatum (nucleus accumbens, core and shell, NAc,co and NAc,sh) were also studied.

Behavioral and brain activation results suggest a partial overlap after the effect of MK-801 administration and ATN disinhibition. MK-801 and ATN disinhibition increases locomotor activity and disorganized movements, while ATN disinhibition also reduces rearing behavior. A significant increase in Fra-2 immunoreactivity (Fra-2-IR) in the ATN, mPFC (prelimbic area, PrL) and NAc,sh was observed after MK-801, while a different pattern of Fra-2-IR was detected following ATN disinhibition (e.g., increase in DG and NAc,sh, and decrease in PrL cortex). Overall, our data may contribute to the understanding of dysfunctional neural circuits involved in schizophrenia.

1. Introduction

Patients with schizophrenia show histological and physiological

alterations in specific brain areas including the thalamus, hippocampus, basal ganglia and the prefrontal cortex (Andreasen et al., 1994a, 1994b; Michael et al., 2010). These brain alterations are thought to underlie

* Corresponding author at: Department of Experimental Neuropharmacology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, CP 11600, Montevideo, Uruguay.

E-mail address: cscorza@iibce.edu.uy (C. Scorza).

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.05.005>

Received 22 February 2019; Received in revised form 1 May 2019; Accepted 4 May 2019

Available online 06 May 2019

0006-8993/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1

Effect of systemic i.p. MK-801 (0.2 mg/kg) or local bicuculline intra-ATN (0.5 mM) on locomotor activity (distance moved) recorded in the OF test during 30 min. Additionally, other parameters were recorded. Data are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by Student-*t* test. * = denotes the significant differences between control group of each treatment; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; N = 5 animals per group. Saline (Sal) is the control group in each experimental group.

Treatments	Distance Moved (m)	Motor Pattern		Ataxia signs	Stereotype		Exploratory
		Disorganized Movement	Continuous movement	Number of falls	Number of Head weaving	Number of head shakes	number of rearings (5 min)
Sal	37.5 \pm 6.2	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.4 \pm 0.4	17.2 \pm 2.9
MK-801	122.7 \pm 8.4***	2.0 \pm 0.3***	0.5 \pm 0.3	1.3 \pm 0.9	2.2 \pm 1.6	0.0 \pm 0.0	19.7 \pm 4.1
ATN-Sal	47.1 \pm 7.8	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	2.6 \pm 1.0	28.6 \pm 6.2
ATN-Bic	86.7 \pm 7.5**	1.3 \pm 0.2***	0.3 \pm 0.3	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	1.4 \pm 0.7	9.5 \pm 3.3*

the functional and behavioral impairments that characterize this neuropathology (Meador-Woodruff et al., 2003; Morris et al., 2005; Nestler, 1997; Watis et al., 2008). However, the underlying etiological mechanisms still remain largely unknown.

Within the neurotransmitter systems potentially involved in schizophrenia, glutamatergic (GLUergic) transmission appears to play a major role (Coyle, 2012; Olney and Farber, 1995). Hence, non-competitive N-methyl-D-aspartate glutamate receptor (NMDA-R) antagonists such as phencyclidine (PCP) and ketamine, elicits schizophrenic like symptoms in healthy volunteers and aggravate clinical symptoms in individuals with schizophrenia (Javitt and Zukin, 1991; Krystal et al., 2003, 1994). In preclinical research, NMDA-R antagonists like PCP and MK-801 (dizocilpine maleate) have been widely used as a pharmacological tool to study schizophrenia-related neurobiological mechanisms (Geyer and Ellenbroek, 2003; Krystal et al., 2003; Olney et al., 1999). In rodents, the systemic administration of NMDA-R antagonists induce a motor behavioral syndrome characterized by hyperlocomotion and other behavioral alterations such as ataxia signs, stereotypes and an abnormal locomotor pattern (Scorza et al.; 2010; Tarrés-Gatius et al., 2018). All these alterations have often been used as acute manipulations of NMDA-R antagonists to model the positive (psychotic) symptoms of schizophrenia (Bubeníková-Valesová et al., 2008; Fan et al., 2018; Geyer and Moghaddam, 2002; Young et al., 2016). Moreover, these behaviors are sensitive to antipsychotic drugs as confirmed in clinical uses and preclinical studies (Andine et al., 1999; Bubeníková-Valesová et al., 2008; Hoffman, 1992; Ogren and Goldstein, 1994) supporting the predictive validity of the model.

Neuropathological studies have identified particular abnormalities of γ -aminobutyric acid (GABA) transmission in the brain in schizophrenia (Lewis, 2014; Lisman et al., 2008) which has also been reported in animal models of psychosis. It has been shown that the administration of NMDA-R antagonists elicits pathological changes in GABAergic interneurons in different brain regions such as, reticular thalamus, prefrontal cortex or hippocampus (Cadinu et al., 2018; Neill et al., 2010). This evidence led to propose a close relationship between a disruption of the balance of GABAergic/GLUergic neurotransmission, through NMDA-R hypofunction, and the appearance of pathological features in animals resembling those seen in schizophrenia (Kehrer et al., 2008; Lisman et al., 2008).

It has been suggested that disinhibition of thalamo-cortical GABAergic inputs mediates the actions of NMDA-R antagonists (Jackson et al., 2004; Kargieman et al., 2007; Santana et al., 2011; Sharp and Tomitaka, 2001; Tomitaka et al., 2000; Zhang et al., 2009). According with previous studies (Sharp and Tomitaka, 2001; Tomitaka et al., 2000), we had suggested that the anterior thalamic nucleus (ATN) is a key brain structure for the expression of the motor behavioral syndrome after the systemic administration of MK-801 (López and Scorza, 2012). Further, we showed that microinjection of the GABA_A-receptor agonist muscimol in ATN abolished this altered behavioral response evoked by MK-801 administration (López and Scorza, 2012). Since the reticular thalamic nucleus (RtN) provides the majority

of inhibitory GABAergic input to thalamocortical neurons, including those to the ATN (Gonzalo-Ruiz et al., 1997, 1996; Pinault, 2004), the systemic administration of MK-801 may preferentially block NMDA-Rs expressed in GABAergic neurons of the RtN. Therefore, anterior thalamic projection neurons would not be influenced by the GABA inhibition intensifying the thalamic output to terminal areas (López and Scorza, 2012). According to this view, antagonizing GABAergic signaling within this nucleus (eliciting a disinhibition of ATN) may mimic the behavioral responses evoked by systemic MK-801 administration.

In the present study, we compared the motor behavioral alterations evoked by the systemic administration of MK-801 and by the local application of a subconvulsive dose of bicuculline (GABA_A-R antagonist) in the ATN. Furthermore, we examined the effects of ATN disinhibition on neuronal activity in its main projections areas such as hippocampus, retrosplenial, entorhinal and medial prefrontal cortices (Aggleton, 2010; Aggleton et al., 2010; Nassar et al., 2018; Winter et al., 2015). These effects were also assessed in other subcortical areas which are not direct projection sites of the ATN (e.g., caudate-putamen, CPU; nucleus accumbens, core and shell, NAc,co and NAc,sh) although it has been proposed that they have a role in the pathophysiology of schizophrenia (Floresco et al., 2009; Shenton et al., 2001). To this end, we used Fra-2, a marker of neuronal activation (Gallo et al., 2018; Kontkanen et al., 2000; Kovacs, 2008; Pennypacker et al., 2000) to identify and compare the brain areas involved in both pharmacological models.

2. Results

2.1. Behavioral effects of MK-801 and intra-ATN bicuculline

Table 1 shows the behavioral alterations observed in MK-801-treated animals and intra-ATN bicuculline-treated animals. Student *t*-test showed that the systemic administration of MK-801 elicited a significant increase in the total distance travelled ($t_8 = 8.8$, $P < 0.001$, $d = 5.9$) with an increase in motor disorganization ($t_8 = 5.8$, $P < 0.001$, $d = 4.0$). Other behavioral alterations such as continuous movement ($t_8 = 2.2$, $P = 0.06$, $d = 1.4$), ataxia signs ($t_8 = 1.3$, $P = 0.23$); head weavings ($t_8 = 1.3$, $P = 0.22$), and rearings ($t_8 = 0.7$, $P = 0.49$) were not significantly modified respect to the saline control group. On the other hand, the statistical analysis revealed that distance travelled was significantly increased in intra-ATN bicuculline-treated animals compared to the control group ($t_8 = 3.6$, $P < 0.01$, $d = 2.3$) with a concomitant rise in motor disorganization ($t_8 = 6.5$, $P < 0.001$, $d = 4.1$). In contrast to MK-801, the number of rearings was significantly decreased by bicuculline ($t_8 = 2.6$, $P < 0.05$, $d = 1.6$) while other behavioral signs (e.g. continuous movement) were closely indistinguishable between intra-ATN bicuculline- and saline-treated animals ($t_8 = 1.0$, $P = 0.35$) similarly to MK-801-treated group (Table 1).

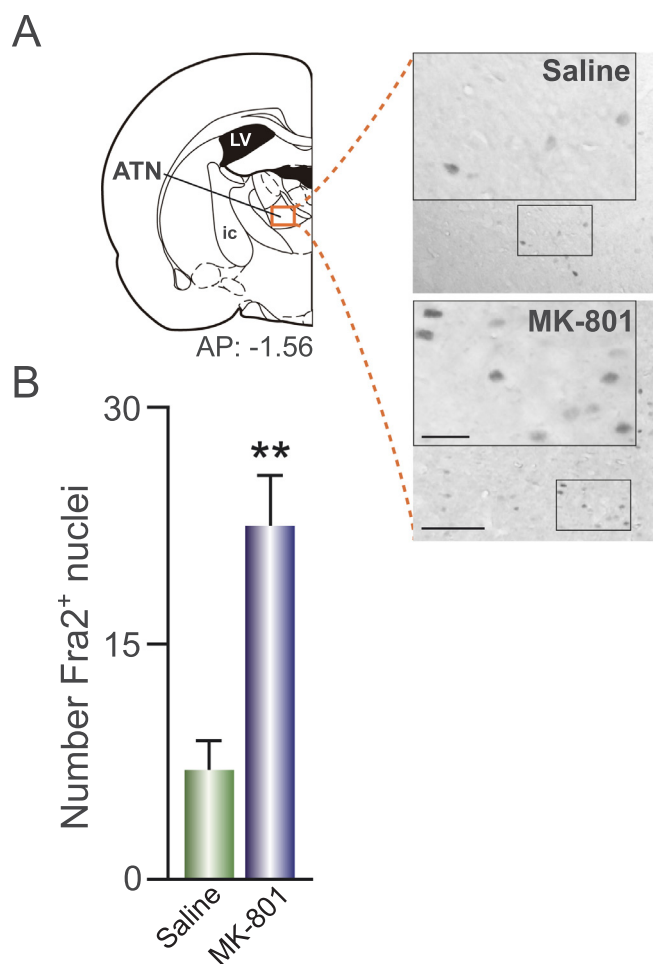


Fig. 1. Effects of systemic administration of MK-801 on Fra-2 immunoreactivity in the rat anterior thalamic nucleus (ATN). Left; schematic diagram of a coronal hemibrain section indicating the area sampled in the ATN (orange frame). (A) Representative photomicrographs of coronal sections of the ATN from saline and MK-801-treated animals immunostained with anti-Fra-2. Insets show higher magnification images of the areas indicated by the black frame. (B) Quantitative assessment of the total number of Fra-2 positive nuclei (Fra-2+) within the ATN. (** $p < 0.01$). $N = 5$. For all figures, schematic diagrams were modified from Paxinos and Watson (2005) and AP indicates distance (mm) from Bregma. *ic*, internal capsule; *LV*, lateral ventricle. Scale bar = 100 μm ; insets 25 μm .

2.2. MK-801 acute administration and Fra-2 immunohistochemistry

Fig. 1A and B show the effect of the systemic administration of MK-801, analyzed in the ATN. The statistical analysis showed a significant increase in Fra-2-IR of this region ($t_8 = 3.9$, $P < 0.01$, $d = 2.5$). On the basis of the functional connectivity of the ATN, no significant changes in Fra-2-IR were observed in the HPC, particularly in DG ($t_8 = 0.02$, $P = 0.99$), CA1 ($t_8 = 0.2$, $P = 0.86$) and ventral Sb sections of the hippocampus ($t_8 = 1.9$, $P = 0.08$, $d = 1.3$) and RS ($t_8 = 0.5$, $P = 0.60$) and EC cortices ($t_8 = 1.6$, $P = 0.14$; Fig. 2 A–E). On the other hand, the expression of Fra-2 was significantly increased in the PrL prefrontal cortex ($t_6 = 3.1$, $P < 0.05$, $d = 2.2$; Fig. 3 A and B) whereas the Cg and IL prefrontal cortex subregions remained unchanged ($t_6 = 1.8$, $P = 0.12$ and $t_6 = 1.2$, $P = 0.29$, respectively; Fig. 3 B). Within the basal ganglia regions, the NAc,sh showed increased Fra-2 expression ($t_8 = 2.4$, $P < 0.05$, $d = 1.5$; Fig. 3C and D) whereas the NAc,co ($t_8 = 0.8$, $P = 0.43$; Fig. 3E) and the CPu ($t_6 = 0.5$, $P = 0.64$; Fig. 3F) remained unchanged.

2.3. Intra-ATN bicuculline administration and Fra-2 immunohistochemistry

Fig. 4 A and B show that intra-ATN bicuculline microinjection resulted in a significant increase of Fra-2-IR in the DG compared with saline ($t_8 = 2.4$, $P < 0.05$, $d = 1.5$). However, no significant changes were observed in other hippocampal subregions, particularly in CA1 ($t_8 = 0.3$, $P = 0.81$; Fig. 4C) and ventral Sb ($t_8 = 0.1$, $P = 0.95$; Fig. 4D), or in the RS cortex ($t_8 = 1.0$, $P = 0.34$; Fig. 4E). Particularly, a trend to increase the neural activity was observed in the EC cortex ($t_8 = 2.0$, $P = 0.08$, $d = 1.3$; Fig. 4F). In the prefrontal cortex, the statistical analysis of the PrL subregion indicated a significant decrease ($t_8 = 2.7$, $P < 0.05$, $d = 1.7$) in neuronal activation after intra-ATN bicuculline compared to the control group (Fig. 5A and B), whereas no changes were observed in the other prefrontal subregions, Cg ($t_8 = 0.05$, $P = 0.96$; Fig. 5B) and IL ($t_8 = 0.6$, $P = 0.56$; Fig. 5B). On the other hand, a significant increase in Fra-2 immunoreactive nuclei was observed in the NAc,sh ($t_8 = 3.5$, $P < 0.01$, $d = 2.2$; Fig. 5C and D), but no significant changes were found in NAc,co ($t_8 = 1.4$, $P = 0.21$; Fig. 5E) and Cpu ($t_7 = 1.5$, $P = 0.19$; Fig. 5F).

3. Discussion

The aim of this study was to investigate the neuro-behavioral changes induced by the systemic administration of MK-801 and the ATN disinhibition. Our results demonstrate that local GABAergic disinhibition of ATN partially mimics the behavioral effects induced by systemic MK-801 administration. In addition, the anatomical analyses also revealed similarities as well as differences in Fra-2-IR expression between both pharmacological treatments.

3.1. Behavioral effects of MK-801 and intra-ATN bicuculline

In rodents, the ATN receives its mayor source of inhibition from the GABAergic neurons of the RtN (Clemente-Perez et al., 2017; Gonzalo-Ruiz et al., 1997, 1996). We had previously reported that the administration of muscimol into the ATN blunted the motor behavioral syndrome elicited by systemic MK-801, suggesting a preferential action of this NMDA-R antagonist on the RtN-ATN network (López and Scorza, 2012). We therefore hypothesized that the blockade of GABA_A-Rs within the ATN could neutralize the inhibition provided by GABAergic inputs from the RtN and elicit the same behavioral syndrome and Fra-2-IR-profile observed after systemic MK-801. Here we observed that a single low dose of MK-801 significantly altered animal behavior, mainly characterized by hyperactivity with a disorganized motor pattern without the induction of significant changes in signs of ataxia, stereotypes and rearings. It is not easy to explain this profile since we and others had previously reported significant changes in all these behavioral responses when a 0.2 mg/kg dose of MK-801 was used (Andine et al., 1999; López and Scorza, 2012; Ogren and Goldstein, 1994; Scorza et al., 2010, 2008). One possibility is that MK-801 injected at low doses, is in a limit to induce NMDA-Rs blockade due to the existence of a threshold. Thus, this could explain a partial or total induction of behavioral effects. Increased doses of NMDA-R antagonists assure the induction of the motor behavioral syndrome, but ataxia signs can overlap and finally impair animal motor displacement. In fact, other studies report differences in the effect induced by acute MK-801 at very low doses (0.1 and 0.2 mg/kg). Ogren and Goldstein (1994), defined 0.1 mg/kg of MK-801 as a low dose and 0.2 mg/kg as a high dose of MK-801. In that work, MK-801 0.1 mg/kg affected locomotion and also other behavioral signs appeared although in a slight way. In contrast, we have measured locomotor activity in rats treated with 0.1 and 0.2 mg/kg of MK-801 and we did not observe a significant change in animal behavior at 0.1 mg/kg (Scorza et al., 2008).

ATN disinhibition induced a similar behavioral syndrome characterized by hyperactivity, slight motor disorganization and no signs of ataxia or stereotypes. In addition, bicuculline-treated animals showed a

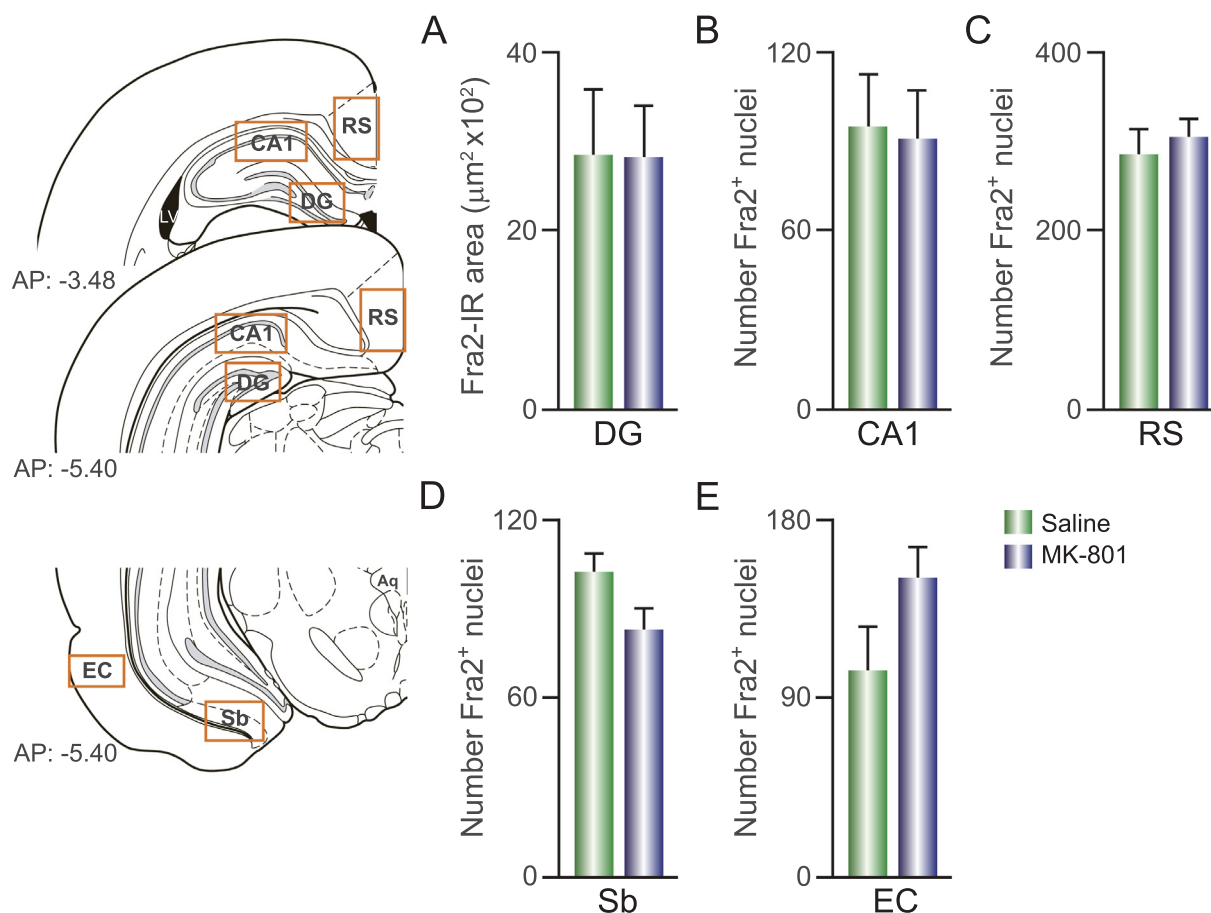


Fig. 2. Effects of systemic administration of MK-801 on Fra-2 immunoreactivity in the hippocampus, retrosplenial and entorhinal cortices. Left; schematic diagrams of coronal hemi-brain sections showing the sampled areas (orange frames) within each region of interest. Dorsal hippocampal CA1 field (CA1), dentate gyrus (DG) and retrosplenial cortex (RS) (upper panels) and entorhinal cortex (EC) and ventral hippocampal subiculum (Sb) (lower panel). (A-E) Quantitative assessment of the area occupied by Fra-2 immunoreactive nuclei (Fra-2-IR area) in DG and the total number of Fra-2-positive (Fra-2+) nuclei in CA1, RS, Sb and EC. N = 5. Aq, aqueduct; LV, lateral ventricle.

significant reduction in rearing activity in contrast to MK-801. An explanation for this behavioral difference could rely on the activation of different brain regions by each pharmacological agent. Local vs. systemic drug administration could also play a role in this differential effect.

3.2. MK-801 treatment and Fra-2 immunohistochemistry

MK-801 treatment significantly increased the number of Fra-2 positive nuclei in the ATN, possibly as a result of NMDA-R blockade of local GABAergic elements (e.g., interneurons or GABAergic projections from the RtN) in the ATN (Żakowski, 2017). This result reinforces the participation of the ATN in the mechanism of action of MK-801 in agreement with our previous report, showing that administration of muscimol into the ATN blocked the hyperactivity and other behavioral alterations elicited by systemic MK-801 (López and Scorza, 2012). Unexpectedly we did not find an increase in Fra-2 immunoreactivity in the analyzed hippocampal sections and RS cortex, despite the dense excitatory inputs that these brain regions receive from the ATN (Aggleton, 2010; Aggleton et al., 2010; Gonzalo-Ruiz et al. 1997, 1996). It is possible that the activation of ATN was not higher enough to yield an alteration in the excitatory/inhibitory balance to elicit a functional output which finally results in an increase in Fra-2-IR in both post-synaptic regions. Alternatively, the presence of axon collaterals of projecting neurons in the ATN to the RtN has been reported (Gonzalo-Ruiz et al., 1997; Żakowski, 2017). Then, these axons could facilitate the inhibition of a subpopulation of ATN neurons and thus prevent the

activation of specific projection regions since ATN projections are topographically organized (i.e., projections to different cortical areas arise from distinct parts of the ATN; Van Groen et al., 1999). Future studies will be needed to elucidate whether the ATN Fra-2-IR is associated to different subsets of neurons (inhibitory or excitatory) expressing NMDA-Rs and sensitive to the effect of the NMDA-R antagonists.

Previous studies have reported neurotoxic effects, specifically on the RS cortex, after prolonged systemic administration of very high doses of NMDA-R antagonists like MK-801 (1 to 5 mg/kg) and ketamine (40 to 100 mg/kg; Olney et al., 1991; Sharp et al., 1991). In the present study, we administered only a single dose of MK-801 using a concentration five times lower than that reported to be neurotoxic. Therefore, under our experimental conditions it is highly unlikely that MK-801 treatment will result in neurotoxic effects in RS cortex.

Among the analyzed regions, the PrL and NAc,sh, showed a significant increase in Fra-2-IR after MK-801 treatment, providing further evidence that the ATN-PFC-NAC network is involved in eliciting the behavioral alterations seen after the NMDA-R antagonist administration. This finding is in agreement with previous published studies suggesting the participation of a thalamic, cortical and limbic brain network in the systemic actions of NMDA-R antagonists (Hervig et al., 2016; Kargieman et al., 2007; Santana et al., 2011; Väisänen et al., 2004). Activation of PFC neurons by NMDA-R antagonists can involve excitatory inputs from regions outside the PFC, including the HPC (Greene, 2001; Grunze et al., 1996; Jay et al., 1992; Jay and Witter, 1991; Jodo et al., 2005; Kiss et al., 2011; Suzuki et al., 2002; Thierry

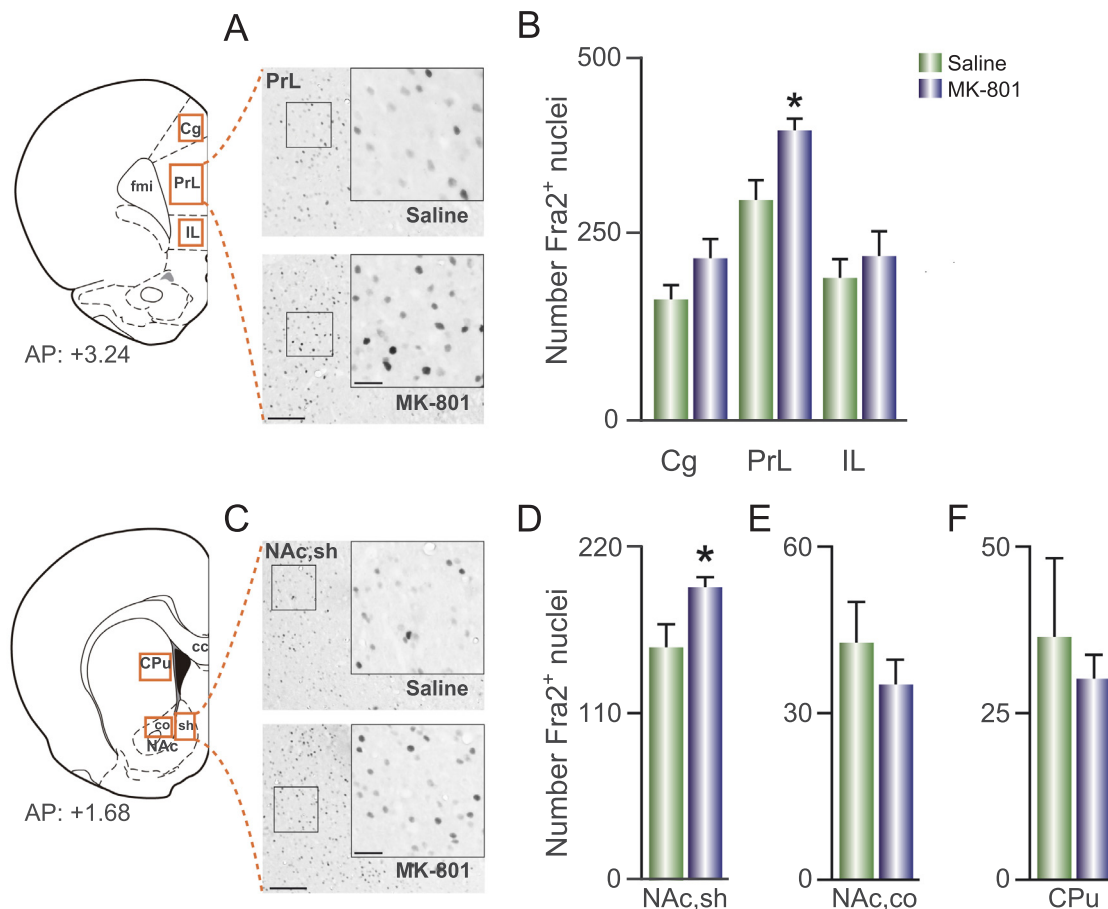


Fig. 3. Effects of systemic administration of MK-801 on Fra-2 immunoreactivity in medial prefrontal cortex, nucleus accumbens (NAc) and caudate-putamen (CPu). Left; schematic diagrams of coronal hemi-brain sections showing the sampled areas (orange frames): cingulate cortex (Cg); prelimbic cortex (PrL) and infralimbic cortex (IL) (upper panel) and NAc core and shell (NAc,co and NAc,sh) and CPu (lower panel). (A and C) Representative photomicrographs of coronal sections of PrL and NAc,sh, respectively, from saline and MK-801-treated rats immunostained with anti-Fra-2. (Insets). Higher magnification images of the areas indicated by the black frame. (B and D-F) Quantitative assessment of total number of Fra-2-positive (Fra-2+) nuclei. (* $p < 0.05$). $N = 4-5$. cc, corpus callosum; co, core; fmi, forceps minor; sh, shell. Scale bar = 100 μ m; insets 25 μ m.

et al., 2000). However, our results suggest an alternative pathway. Since MK-801 administration did not elicit significant changes in Fra-2 expression in the HPC, MK-801 may be acting on thalamic circuits that involve functional connections between ATN and PFC.

3.3. Intra-ATN bicuculline treatment and Fra-2 immunohistochemistry

Similarly to systemic MK-801, neuronal disinhibition of the ATN did not affect Fra-2 expression in the RS cortex. On the contrary, we observed a significant increase in Fra-2-IR in the DG after bicuculline treatment, suggesting that disinhibition of ATN is more effective in engaging the DG compared to MK-801. As DG receives glutamatergic inputs from EC (Kontkanen et al., 2000), it is possible that the difference between both treatments is due to the precise level of activation of the EC, since bicuculline treatment tended to increase the neuronal activity in this cortical region as well. Accordingly, the increase in Fra-2 expression in the NAc,sh observed after bicuculline treatment could result from the increase in neuronal activity in the EC (Brog et al., 1993; Humphries and Prescott, 2010). This suggests an augmented functional activity of a network involving the brain connectivity between the ATN, EC, DG and NAc.

Locomotor and rearing activities in a novel environment are positively correlated (Lever et al., 2006), and NMDA-R antagonists have been previously shown to dissociate these behaviors (Hargreaves and Cain, 1992; Scorza et al., 2010, 2008; Wu et al., 2005). In our current study, only bicuculline treatment resulted in decreased rearings. These

behavioral effects could result after a reduction in the level of neuronal activity in the PrL observed after bicuculline administration. This would agree with our previously published report showing a significant decrease in rearing behavior following mPFC lesion (Scorza et al., 2008). It is interesting to point out that differences in behavioral outcomes have been reported after a prefrontal hypoactivation or disinhibition induced by local administration of muscimol or picrotoxin, respectively (Pezze et al., 2014). Although the rearing activity was not recorded, muscimol reduced locomotor activity whereas picrotoxin caused locomotor hyperactivity (Pezze et al., 2014). This report and our results suggest that a correct animal habituation (in horizontal and vertical exploration) seems to require a balanced prefrontal activity. In our study, we showed that using different pharmacological strategies this balance is apparently altered. Further studies should be done to investigate if the functional ATN disinhibition could induce a specific prefrontal GABAergic/GLUergic disbalance which would explain the behavioral changes.

Stereotypes and signs of ataxia remained unchanged in both MK-801- and bicuculline-treated animals. Stereotypes are repetitive behaviors generally associated with striatal function (Takahata and Moghaddam, 2003). Therefore, it is possible that the concentration of bicuculline used or the dose of MK-801 was not sufficient to elicit the behavioral response or to engage brain areas involved in motor coordination. Moreover, ataxia signs have been associated to the cerebellum activity (Gowen and Miall, 2007; Hoxha et al., 2018). Since this region has not been included in the present study, further studies will

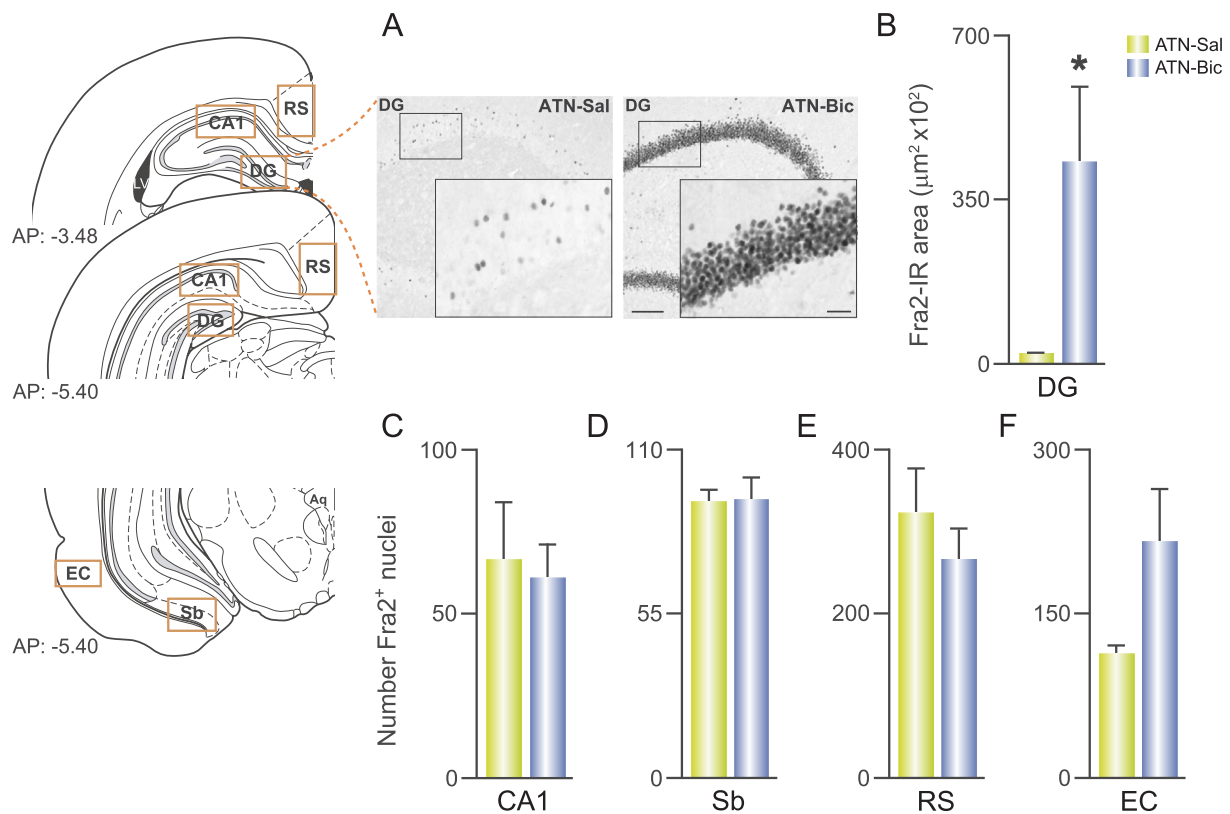


Fig. 4. Effects of local administration of bicuculline in the anterior thalamic nucleus (ATN-Bic) on Fra-2 immunoreactivity in the hippocampus, retrosplenial and entorhinal cortices. Left; schematic diagrams of coronal hemi-brain sections showing the sampled areas (orange frames) within each region of interest. Dorsal hippocampal CA1 field (CA1), dentate gyrus (DG) and retrosplenial cortex (RS) (upper panels) and entorhinal cortex (EC) and ventral hippocampal subiculum (Sb) (lower panel). (A) Representative photomicrographs of coronal sections of the DG from saline-intra-ATN microinjection (ATN-Sal) and ATN-Bic rats immunostained with anti-Fra-2. (Insets) Higher magnification images of the areas indicated by the black frame. (B-F) Quantitative assessment of the area occupied by Fra-2 immunoreactive nuclei (Fra-2-IR area) in DG and the total number of Fra-2-positive (Fra-2+) nuclei in CA1, RS, Sb and EC. (* $p < 0.05$). $N = 5$. Aq, aqueduct; LV, lateral ventricle. Scale bar = 100 μm ; insets 25 μm .

determine if higher doses of these pharmacological agents could affect stereotypes and signs of ataxia as well as the level of neuronal activity in both regions. Although the GABAergic disinhibition of ATN showed differences with systemic administration of MK-801, we propose that this pharmacological strategy could be useful to unmask a more specific engagement of brain regions (PrL, EC-DG and NAcc,sh) involved in the motor behavioral syndrome which otherwise could be unnoticed due to a systemic effect of MK-801.

3.4. Fra-2-immunoreactivity: A comparison between treatments

The observed differences in regional activation between systemic MK-801 administration and intra-ATN bicuculline microinjection likely arise from the different neurochemical and regional targets affected by both treatments. Disinhibition of any brain region disrupts normal function that in turn affects efferent projection areas (Bast et al. 2017). However, increased neuronal activity does not necessarily imply an increase or decrease in region excitability. In this study we assume that intra-ATN bicuculline can block GABA_A receptors expressed in excitatory/glutamatergic neurons of the ATN and therefore decreasing the influence of GABAergic inputs to this nucleus mainly provided by RtN. However, it cannot be ruled out the participation of GABAergic inputs provided by other regions (e.g., basal ganglia; López and Scorza, 2012), which can elicit a lower disinhibition. Additionally, systemic administration of MK-801 may block NMDA-Rs in principal neurons (e.g., excitatory) and/or inhibitory GABA interneurons in cortical and hippocampal areas, resulting in an entirely different regional profile of neuronal activity from that of intra-ATN bicuculline application. Despite these differences in neurochemical, cellular and regional targets,

both treatments evoked remarkably similar behavioral effects. Thus, whereas intra-ATN bicuculline administration locally blocked GABA_A receptors in thalamo-cortical neurons, systemic MK-801 administration antagonized NMDA-Rs in all brain areas, with a presumed preferential effect on GABA interneurons, as shown in mPFC (Homayoun and Moghaddam, 2007). Moreover, some studies have suggested that other neuronal populations are affected. Hence, a recent study using GluNR2C knockout mice (Karavanova et al., 2007; Zhang et al., 2009, 2012) suggests the involvement of cerebellar NMDA-Rs expressing this subunit in the psychotic-like effects of NMDA-R antagonists, including MK-801 (Tarrés-Gatius et al., 2018).

A limitation of the study could rely on the small sample sizes both for the behavioral studies and immunohistochemical assays. However, d values allow ruling out the risk of false negatives or false positives in the significance differences or trend level data (e.g. neural activity of EC in intra-ATN bicuculline group).

Previous studies have shown that brain injury or tissue damage can elicit long term increase in Fra-2 expression (Butler and Pennypacker, 2005; Dalrymple-Alford et al., 2015; Pennypacker et al., 2000). In our experimental design, administration of bicuculline is done through a cannula directly into the ATN, resulting in mechanical damage to the tissue. Therefore, Fra-2 immunoreactivity in the ATN was not quantified after bicuculline treatment. Expression of Fra-2 in the ATN projection regions, HPC and RS cortex remained unchanged in cannulated and sham-operated animals (data not shown). This result suggests that the lesion caused by the cannula has no effect in Fra-2 expression in these projection areas.

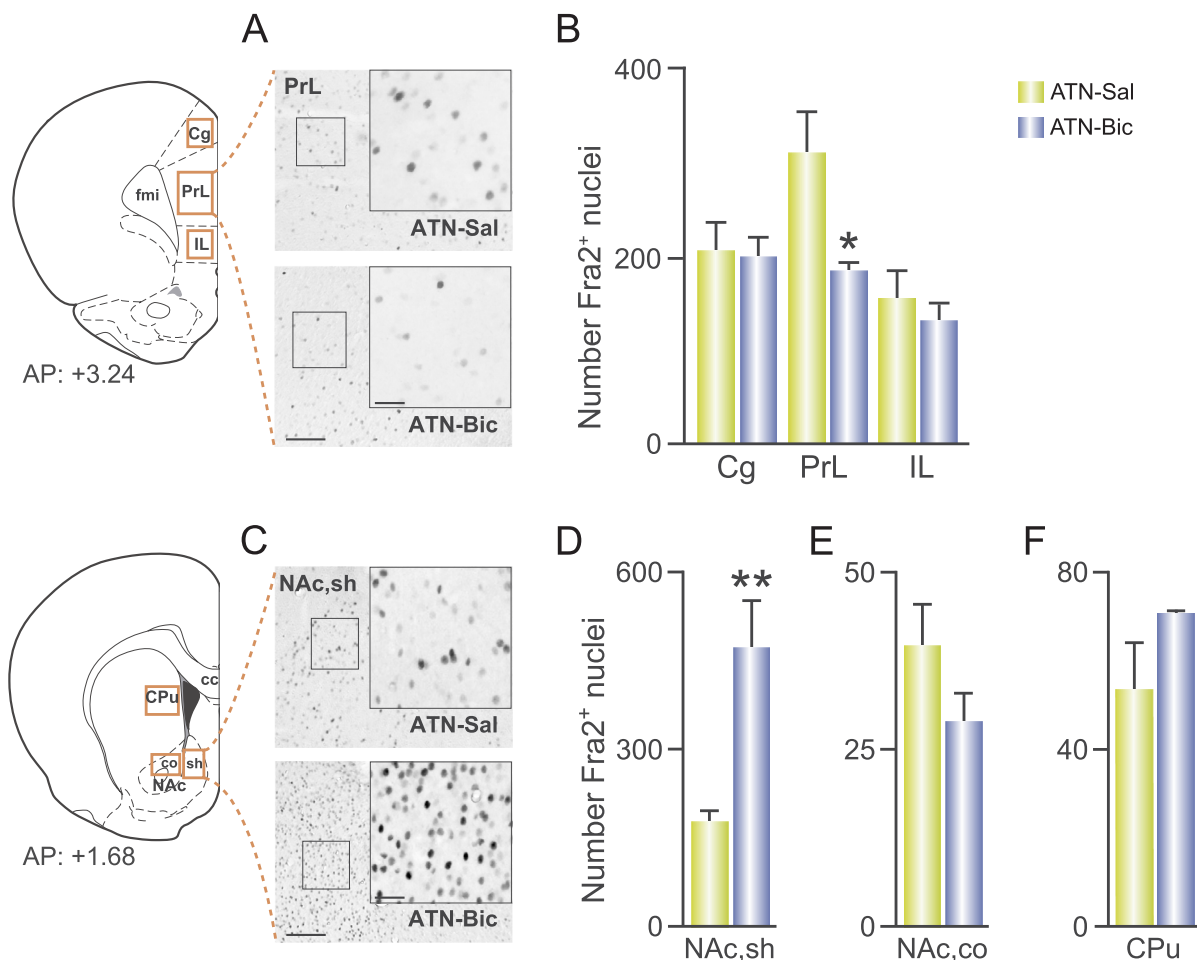


Fig. 5. Effects of the local administration of bicuculline in the anterior thalamic nucleus (ATN-Bic) on Fra-2 immunoreactivity in medial prefrontal cortex, nucleus accumbens (NAc) and caudate-putamen (CPU). Left; schematic diagrams of coronal hemi-brain sections showing the sampled areas (orange frames): cingulate cortex (Cg); prelimbic cortex (PrL) and infralimbic cortex (IL) (upper panels) and NAc, core and shell (NAc,co and NAc,sh), and CPU (lower panel). (A and C) Representative photomicrographs of coronal sections of PrL and NAc,sh, respectively, from saline intra-ATN (ATN-Sal) and ATN-Bic microinjected rats immunostained with anti-Fra-2. (Insets) Higher magnification images of the areas indicated by the black frame. (B and D-F) Quantitative assessment of total number of Fra-2-positive (Fra-2+) nuclei. (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, compared with control group in PrL). $N = 4-5$. cc, corpus callosum; co, core; fmi, forceps minor; sh, shell. Scale bar = 100 μm ; insets 25 μm .

3.5. Conclusion and perspective

Our data suggest that NMDA-Rs blockade on the RtN-ATN circuit accounts for some -but not all- motor actions of MK-801. Additional neuronal (e.g., interneurons) and brain regions (e.g., cerebellum) are likely involved. Assays combining regional neural disinhibition with additional behavioral tests are needed to characterize the role of RtN-ATN in psychotomimetic-like effects of NMDA-R antagonists. Finally, our data reveal additional brain circuits engaged in the disbalance of GABAergic/GLUergic neurotransmission, through NMDA-R hypofunction, elicited by MK-801. This information could be useful to design novel targeted pharmacotherapeutic approaches to ameliorate positive symptoms of schizophrenia specifically linked to these brain systems.

4. Experimental procedures

4.1. Animals

Adult male Wistar rats (260–300 g) bred in the IIBCE animal facilities (Montevideo) were used in the study. Animals were co-housed ($N = 5$) in plastic cages (50 × 37.5 × 21 cm) with food and water ad libitum and kept under controlled conditions (temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 12-h light-dark cycle, lights on at 7:00 am). Animal housing and all

experimental procedures were reviewed and approved by the ethics committee of the Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) and following the current ethical regulations under animal experimentation law N°18.611 and the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978). Adequate measures were taken to minimize discomfort or stress of the animals.

4.2. Drugs

(+)-MK-801 hydrogen maleate was from Sigma Aldrich (M107) and bicuculline (14340) from Sigma Aldrich was generously gifted by Prof. Pablo Tortorolo (School of Medicine, Uruguay). Ketamine and xylazine were purchased from Konsol Köning S.A Laboratory (series number 15-062 and 15-148, respectively). MK-801 and bicuculline were dissolved in saline solution and stored at -20°C .

4.3. Surgical procedures

Surgical procedures were performed as previously described (López and Scorza, 2012). Briefly, animals were anesthetized with a mixture of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg; i.p.) and placed in a stereotaxic frame (David Kopf instruments, USA). Once the skull was

exposed, two holes were drilled above the ATN (AP: -1.56 mm, L: ± 1.0 mm according to bregma, Paxinos and Watson, 2005) and a bilateral cannula (28 G, Plastics One, USA) was slowly lowered to target (DV: -6.0 mm). At the end of the experiments, the microinjection site was verified by histological assessment using the hematoxylin/eosin method (Fig. S1) as previously described in López and Scorza (2012). Animals in which the cannula was misplaced out of ATN were not included in the study.

4.4. Drug administration

Five days after the surgical procedure, animals were randomly assigned to experimental groups that received an intra-ATN microinfusion of bicuculline (0.5 mM; N = 5) or saline (N = 5). Bilateral cannula was connected via two polyethylene tubings coupled to a microsyringe (Hamilton, USA) charged with bicuculline or saline solution mounted on a microinfusion pump (Harvard Apparatus, Instech USA). Animals were manually restrained during tubing connection and then allowed to move freely in the cage while saline or bicuculline were perfused at a flow rate of $0.5 \mu\text{l}/\text{min}/\text{side}$ during 1 min (final volume of $0.5 \mu\text{l}$), which corresponds to a total amount of 0.3 nmol of bicuculline (0.5 mM) per injection site. To prevent reflux, the connection was left for 20 s after the end of each infusion. A concentration-curve was previously performed testing the behavioral effect induced by 0.2, 0.5 and 0.75 mM of intra-ATN bicuculline (López Hill, Unpublished results). Selected concentration of bicuculline was 0.5 mM, since it was the maximal dose at which infusion-induced motor convulsions were not induced (i.e., subconvulsive concentration). Another non-operated group of animals was injected intraperitoneally (i.p.) with saline (N = 5) or MK-801 (0.2 mg/kg; N = 5). This dose was selected because it effectively produces motor behavioral alterations without a high level of ataxia or stereotypes which could impair animal locomotor displacement (Andine et al., 1999; Scorza et al., 2008, 2010). The injected volume was 1 ml/kg body weight.

All efforts were made to use the least number of animals necessary to produce reliable scientific data.

4.5. Behavioral analysis

Animals were moved to the experimental room (with controlled temperature $22 \pm 2^\circ\text{C}$) in their home cages and identified prior to the behavioral test. Behavioral observations were conducted after either MK-801 (evaluated 30 min after administration) or bicuculline (evaluated 2 min after microinjection) were injected. An Open Field (OF) consisting of a square box ($60 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$) with red 40-cm-high acrylic walls and placed in a homogeneously illuminated room (45 lx) was used. Locomotor activity was automatically recorded during 30 min by a camera mounted above the OF and connected to a computer equipped with a video-tracking software (Ethovision XT-12.0, Noldus, The Netherlands). Additionally, continuous and intermittent behaviors (Baumann et al., 2001) were recorded by a trained researcher and differentially scored during the first 15 min of the test. Continuous behaviors including motor disorganized movement (i.e., incoordinated motor activity, characterized by the animals following a continuous, sine wave-like pattern) and permanent or continuous movement were scored using a graded scale: 0, absent; 1, equivocal; 2, present; and 3, intense as previously published (Spanos and Yamamoto, 1989; Scorza et al., 2010). Intermittent behaviors like signs of ataxia (number of falls during horizontal displacement or loss of balance while performing rearings) and stereotypes (head weaving and head shakes) were also quantified. The number of rearings or vertical exploratory behavior (i.e., raising both forelimbs from the ground and either resting them on the cage wall or not) was also recorded during the first 5 min of the experimental session. Rearing is a natural exploratory behavior directly related to the animal habituation to the environmental novelty (Young et al. 2016). After recording the animal behavior, the OF was cleaned

with alcohol 30% before placing the following rat. In all the experiments rats were naive to the OF and were used only once. To reduce the risk that a day's performance measures were biased, several experimental sets including both animal groups (non-operated and cannulated animals) were conducted. All the experiments were performed between 8:00 and 13:00 h.

4.6. Tissue processing

For tissue collection, 120 min after drug or saline administration and the behavioral evaluation in the OF as described above, animals were deeply anesthetized with urethane ($1.2 \text{ g}/\text{kg}$, i.p.) and transcardially perfused with 250 ml of heparinized (1000 units/l) 0.9% saline solution followed by 650 ml of 4% paraformaldehyde in phosphate buffer (PB 0.1 M, pH = 7.4). The brain was removed, coded and immersed in PBS with 20% sucrose and then transferred to 30% sucrose solution for cryoprotection. Forty-eight hours later, the brain was frozen and cut into $40 \mu\text{m}$ coronal sections using a cryostat (Leica Biosystems, USA). Each section was placed in one well of a 6-well tray containing PBS and immunohistochemical procedures were performed immediately. The remaining tissue was transferred to a cryoprotectant solution and stored at -20°C . Fra-2 immunoreactivity (Fra-2-IR) was detected in free-floating sections pretreated with 0.3% hydrogen peroxidase in PBS followed by overnight incubation at room temperature with rabbit anti-Fra-2 antibody (1:8,000, sc-604, Santa Cruz Laboratories, CA, USA) in PBS with 0.3% Triton X-100 (PBST). The sections were then exposed to biotinylated secondary antibody goat anti-rabbit (1:400 in PBST, PK-6101 Vector Labs, CA, USA), followed by incubation in standard ABC (1:300 in PBS; Vector Labs, CA, USA). Tissue was then processed by the diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) nickel-enhanced method, which consisted of tissue immersion in 0.6% nickel ammonium sulfate, 0.02% DAB, and 0.03% hydrogen peroxide in 10 ml of PBS, for 4–5 min. Omission of the primary antibody resulted in complete loss of signal. All tissue sections from experimental and control animals were stained at the same time and with the same antibody lot.

4.7. Regions of interest

The regions of interest for Fra-2 immunohistochemical analyses were determined based on the Paxinos and Watson atlas (2005). All analyzed regions according to bregma: ATN, -1.56 mm; medial prefrontal cortex (mPFC), including cingulate (Cg), prelimbic (PrL) and infralimbic (IL) subregions, $+3.24$ mm; dorsal (caudate-putamen, CPu) and ventral striatum (nucleus accumbens core and shell, NAc,co and NAc,sh), $+1.68$ mm; dorsal hippocampus (HPC; CA1 field and dentate gyrus, DG) and retrosplenial cortex (RS), -3.48 mm and -5.40 mm; ventral hippocampal subiculum (Sb), and the entorhinal cortex (EC), -5.40 mm.

4.8. Assessment of Fra-2 immunoreactivity

All sections were examined using a Nikon E800 microscope. Digital images were captured with a $\times 10$ objective lens via a CollSNAP-Pro Monochrome Digital camera (Media Cybernetic, Silver Spring, USA). Image ProPlus software was used for acquisition and analyses (Richieri et al., 2005, 2010). Quantification of Fra-2-immunoreactive nuclei was done by two trained histologists blind to the treatment. Fra-2 positive nuclei were counted by an automated procedure selecting particles of appropriate size. Positive Fra-2 signal was considered to be at least three times above the background. Sampling areas were defined according to the regions of interest. Grids of different sizes were generated considering specific regions dimensions and superimposed on the corresponding image for quantification. For ATN, 0.25 mm^2 ; NAc,c, 0.09 mm^2 ; NAc,sh, 0.15 mm^2 ; CPu, 0.09 mm^2 ; Cg, 0.33 mm^2 ; PrL, 0.42 mm^2 ; IL, 0.25 mm^2 ; RS, CA1 and GD, 0.12 mm^2 ; Sb, 0.04 mm^2 ;

EC, 0.43 mm². For RS and HPC, Fra-2 positive nuclei were counted at two different levels (−3.48 and −5.40 mm from bregma) and expressed as the total count ± SEM. The number of Fra-2 positive nuclei for each region was averaged from both hemispheres on two adjacent sections. A very high density of Fra-2 positive nuclei was detected in DG; therefore this area was not analyzed following the same criteria applied for the other regions. Fra-2 immunostaining in DG was quantified as immunoreactive area in all experimental groups. Considering that experiments conducted on different days could yield different absolute values of the color reaction, only intra-experimental comparisons were performed. The initial group size for the immunohistochemical assays was N = 5 except for the mPFC area of the MK-801 and saline-treated groups and CPu area from the same group as well the bicuculline intra-ATN group in which four animals were used (N = 4).

4.9. Statistical analyses

Data from behavioral and immunohistochemical assays were expressed as mean ± standard error of the mean (SEM). Statistical differences between controls and treated animals were assessed by the Student-*t* test. In addition, the effect size was estimated and provided by Cohen's *d* value (Cohen, 1988), classifiable as small (0.20), medium (0.50) and large (0.80). The effect sizes (*d* values) were only reported for the significant differences and the trend level data. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant.

Acknowledgements

We are grateful to Prof. Francesc Artigas and Dr. Anna Castañé for their critical reading of the manuscript.

Funding

This study was supported by Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA-Uruguay). Ximena López Hill has a postgraduate fellowship from ANII and CAP (Universidad de la República).

Conflicts of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.05.005>.

References

- Andiné, P., Widermark, N., Axelsson, R., Nyberg, G., Olofsson, U., Mårtensson, E., Sandberg, M., 1999. Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290, 1393–1408.
- Andreasen, N.C., Arndt, S., Swayze, V., Cizadlo, T., Flaum, M., O'Leary, D., et al., 1994a. Thalamic abnormalities in schizophrenia visualized through magnetic resonance image averaging. *Science* 266, 294–298.
- Andreasen, N.C., Flashman, L., Flaum, M., Arndt, S., Swayze, V., O'Leary, D.S., Ehrhardt, J.C., Yuh, W.T., 1994b. Regional brain abnormalities in schizophrenia measured with magnetic resonance imaging. *JAMA* 272, 1763–1769.
- Aggleton, J.P., O'Mara, S.M., Vann, S.D., Wright, N.F., Tsanov, M., Erichsen, J.T., 2010. Hippocampal-anterior thalamic pathways for memory: uncovering a network of direct and indirect actions. *Eur. J. Neurosci.* 31, 2292–2307.
- Aggleton, J.P., 2010. Understanding retrosplenial amnesia: Insights from animal studies. *Neuropsychologia* 48, 2328–2338.
- Bast, T., Pezze, M., McGarrity, S., 2017. Cognitive deficits caused by prefrontal cortical and hippocampal neural disinhibition. *Br. J. Pharmacol.* 174, 3211–3225.
- Baumann, M.H., Rothman, R.B., Pablo, J.P., Mash, D.C., 2001. In vivo neurobiological effects of ibogaine and its O-desmethyl metabolite, 12-hydroxyibogamine (nor-ibogaine), in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297, 531–539.
- Brog, J.S., Salyapongse, A., Deutch, A.Y., Zahm, D.S., 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, 255–278.
- Bubenřková-Valesová, V., Horáček, J., Vrajová, M., Höschl, C., 2008. Models of schizophrenia in humans and animals based on inhibition of NMDA receptors. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32 (5), 1014–1023.
- Butler, T.L., Pennypacker, K.R., 2005. The Transcriptional Response to Hypoxic Insult Controlled by FRA-2. *Gene Expr.* 12, 61–67.
- Cadinu, D., Grayson, B., Podda, G., Harte, M.K., Doostdar, N., Neill, J.C., 2018. NMDA receptor antagonist rodent models for cognition in schizophrenia and identification of novel drug treatments, an update. *Neuropharmacol.* 142, 41–62.
- Clemente-Perez, A., Makinson, S.R., Higashikubo, B., Brovarney, S., Cho, F.S., Urry, A., Holden, S.S., Wimer, M., et al., 2017. Distinct Thalamic Reticular Cell Types Differentially Modulate Normal and Pathological Cortical Rhythms. *Cell Rep.* 19, 2130–2142.
- Cohen, J., 1988. Statistical power analysis for the behavioral sciences. L. Erlbaum Associates, Hillsdale, N.J.
- Coyle, J.T., 2012. NMDA receptor and schizophrenia: a brief history. *Schizophr. Bull.* 38, 920–926.
- Dalrymple-Alford, J.C., Harland, B., Loukavenko, E.A., Perry, B., Mercer, S., Collings, D.A., Ulrich, K., Abraham, W.C., et al., 2015. Anterior thalamic nuclei lesions and recovery of function: relevance to cognitive thalamus. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 4, 145–160.
- Fan, H.R., Du, W.F., Zhu, T., Wu, Y.J., Liu, Y.M., Wang, Q., Wang, Q., Gu, X., et al., 2018. Quercetin Reduces Cortical GABAergic Transmission and Alleviates MK-801-Induced Hyperactivity. *E. Bio. Med.* 34, 201–213.
- Floresco, S.B., Zhang, Y., Enomoto, T., 2009. Neural circuits subserving behavioral flexibility and their relevance to schizophrenia. *Behavioural Brain Res.* 204, 396–409.
- Gallo, F.T., Katche, C., Morici, J.F., Medina, J.H., Weisstaub, N.V., 2018. Immediate Early Genes, Memory and Psychiatric Disorders: Focus on c-Fos, Egr1 and Arc. *Front. Behav. Neurosci.* 12, 79.
- Geyer, M.A., Ellenbroek, B., 2003. Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 1071–1079.
- Geyer, M.A., Moghaddam, B., 2002. Animal models relevant to schizophrenia disorders. In: Davis, K.L., Charney, D., Coyle, J.T., Nemeroff, C. (Eds.), *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress*. Lippincott Williams and Wilkins, New York, pp. 689–701 Chapter 5.
- Gonzalo-Ruiz, A., Sanz, J.M., Lieberman, A.R., 1996. Immunohistochemical studies of localization and co-localization of glutamate, aspartate and GABA in the anterior thalamic nuclei, retrosplenial granular cortex, thalamic reticular nucleus and mammillary nuclei of the rat. *J. Chem. Neuroanat.* 12, 77–84.
- Gonzalo-Ruiz, A., Morte, L., Lieberman, A.R., 1997. Evidence for collateral projections to the retrosplenial granular cortex and thalamic reticular nucleus from glutamate and/or aspartate-containing neurons of the anterior thalamic nuclei in the rat. *Exp. Brain Res.* 116, 63–72.
- Gowen, E., Miall, R., 2007. The cerebellum and motor dysfunction in neuropsychiatric disorders. *Cerebellum* 6, 268–279.
- Greene, R., 2001. Circuit analysis of NMDAR hypofunction in the hippocampus, in vitro, and psychosis of schizophrenia. *Hippocampus* 11, 569–577.
- Grunze, H.C., Rainie, D.G., Hasselmo, M.E., Barkai, E., Hearn, E.F., McCarley, R.W., Greene, R.W., 1996. NMDA-dependent modulation of CA1 local circuit inhibition. *J. Neurosci.* 16, 2034–2043.
- Hargreaves, E.L., Clain, D.P., 1992. Hyperactivity, hyper-reactivity, and sensorimotor deficits induced by low doses of the N-methyl-D-aspartate non-competitive channel blocker MK-801. *Behav. Brain Res.* 47, 23–33.
- Hervig, M.E., Thomsen, M.S., Kalló, I., Mikkelsen, J.D., 2016. Acute phencyclidine administration induces c-Fos-immunoreactivity in interneurons in cortical and sub-cortical regions. *Neuroscience* 334, 13–25.
- Hoffman, D.C., 1992. Typical and atypical neuroleptics antagonize MK-801-induced locomotion and stereotypy in rats. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 89, 1–10.
- Homayoun, H., Moghaddam, B., 2007. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J. Neurosci.* 27, 11496–11500.
- Hoxha, E., Balbo, I., Miniaci, M., Tempia, F., 2018. Purkinje Cell Signaling Deficits in Animal Models of Ataxia. *Front. Synaptic Neurosci.* 10, 6.
- Humphries, M.D., Prescott, T.J., 2010. The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy, and reward. *Prog. Neurobiol.* 90, 385–417.
- Jackson, M.E., Homayoun, H., Moghaddam, B., 2004. NMDA receptor hypofunction produces concomitant firing rate potentiation and burst activity reduction in the prefrontal cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8467–8472.
- Javitt, D.C., Zukin, S.R., 1991. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 148, 1301–1308.
- Jay, T.M., Witter, M.P., 1991. Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J. Comp. Neurol.* 313, 574–586.
- Jay, T.M., Thierry, A.M., Wiklund, L., Glowinski, J., 1992. Excitatory amino acid pathway from the hippocampus to the prefrontal cortex. Contribution of AMPA receptors in hippocampo-prefrontal cortex transmission. *Eur. J. Neurosci.* 4, 1285–1295.
- Jodo, E., Suzuki, Y., Katayama, T., Hoshino, K.Y., Takeuchi, S., Niwa, S., Kayama, Y., 2005. Activation of medial prefrontal cortex by phencyclidine is mediated via a hippocampo-prefrontal pathway. *Cereb. Cortex* 15, 663–669.
- Karavanova, I., Vasudevan, K., Cheng, J., Buonanno, A., 2007. Novel regional and developmental NMDA receptor expression patterns uncovered in NR2C subunit-beta-galactosidase knock-in mice. *Mol. Cell Neurosci.* 34, 468–480.
- Kargieman, L., Santana, N., Mengod, G., Celada, P., Artigas, F., 2007. Antipsychotic drugs reverse the disruption in prefrontal cortex function produced by NMDA receptor blockade with phencyclidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 14843–14848.

- Kehrer, C., Maziashvili, N., Dugladze, T., Gloveli, T., 2008. Altered Excitatory-Inhibitory Balance in the NMDA-Hypofunction Model of Schizophrenia. *Front. Mol. Neurosci.* 8, 1–6.
- Kiss, T., Hoffmann, W.E., Scott, L., Kawabe, T.T., Milici, A.J., Nilsen, E.A., Hajós, M., 2011. Role of thalamic projection in NMDA receptor-induced disruption of cortical slow oscillation and short-term plasticity. *Front. Psychiatry* 4, 14.
- Kontkanen, O., Lakso, M., Koponen, E., Wong, G., Castrén, E., 2000. Molecular effects of the psychotropic NMDA receptor antagonist MK-801 in the rat entorhinal cortex: increases in AP-1 DNA binding activity and expression of Fos and Jun family members. *Ann. NY Acad. Sci.* 911, 73–82.
- Kovacs, K.J., 2008. Measurement of Immediate-Early Gene Activation- c-fos and Beyond. *J. Neuroendocrinol.* 20, 665–672.
- Krystal, J.H., Karper, L.P., Seibyl, J.P., Freeman, G.K., Delaney, R., Bremner, J.D., Heninger, G.R., Bowers Jr., M.B., Charney, D.S., 1994. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch. Gen. Psychiatry* 51, 199–214.
- Krystal, J.H., D'Souza, D.C., Mathalon, D., Perry, E., Belger, A., Hoffman, R., 2003. NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacol. (Berl)* 169, 215–233.
- Lewis, D.A., 2014. Inhibitory neurons in human cortical circuits: substrate for cognitive dysfunction in schizophrenia. *Curr. Opin. Neurobiol.* 26, 22–26.
- Lever, C., Burton, S., O'Keefe, J., 2006. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. *Rev. Neurosci.* 17, 111–133.
- Lisman, J.E., Coyle, J.T., Green, R.W., Javitt, D.C., Benes, F.M., Heckers, S., Grace, A.A., 2008. Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci.* 31 (5), 234–242.
- López, Hill X., Scorza, M.C., 2012. Role of the anterior thalamic nucleus in the motor hyperactivity induced by systemic MK-801 administration in rats. *Neuropharmacol.* 62, 2440–2446.
- Michael, A.M., Baum, S.A., White, T., Demirci, O., Andreasen, N.C., Segall, J.M., Jung, R.E., Pearlson, G., et al., 2010. Does function follow form?: methods to fuse structural and functional brain images show decreased linkage in schizophrenia. *Neuroimage* 49 (3), 2626–2637.
- Meador-Woodruff, J.H., Clinton, S.M., Beneyto, M., McCullumsmith, R.E., 2003. Molecular abnormalities of the glutamate synapse in the thalamus in schizophrenia. *Ann. NY Acad. Sci.* 1003, 75–93.
- Morris, B.J., Cochran, S.M., Pratt, J.A., 2005. PCP: from pharmacology to modelling schizophrenia. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 101–106.
- Nassar, M., Simonnet, J., Huang, L.W., Mathon, B., Cohen, I., Bendels, M.H.K., Beranek, M., Miles, R., Fricker, D., 2018. Anterior Thalamic Excitation and Feedforward Inhibition of Presubicular Neurons Projecting to Medial Entorhinal Cortex. *J. Neurosci.* 38, 6411–6425.
- Nestler, E.J., 1997. Schizophrenia. An emerging pathophysiology. *Nature* 385, 578–579.
- Neill, J.C., Barnes, S., Cook, S., Grayson, B., Idris, N.F., McLean, S.L., Snigdha, S., Rajagopal, L., Harte, M.K., 2010. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol. Ther.* 128, 419–432.
- Ogren, S.O., Goldstein, M., 1994. Phencyclidine- and dizolcipine-induced hyperlocomotion are differentially mediated. *Neuropsychopharmacol.* 11, 167–177.
- Olney, J.W., Labryere, J., Wang, G., Wozniak, D.F., Price, M.T., Sesma, M.A., 1991. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. *Science* 254, 1515–1518.
- Olney, J.W., Farber, N.B., 1995. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 52, 998–1007.
- Olney, J.W., Newcomer, J.W., Farber, N.B., 1999. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* 33, 523–533.
- Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, fifth ed. Academic Press, Sydney.
- Pennypacker, K.R., Eidzadeha, S., Kassed, G.A., O'Callaghan, J.P., Sanberge, P.R., Willing, A.E., 2000. Expression of fos-related antigen-2 in rat hippocampus after middle cerebral arterial occlusion. *Neurosci. Lett.* 289, 1–4.
- Pezze, M., McGarrity, S., Mason, R., Fone, K.C., Bast, T., 2014. Too little and too much: hypoactivation and disinhibition of medial prefrontal cortex cause attentional deficits. *J. Neurosci.* 34, 7931–7946.
- Pinault, D., 2004. The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Res. Rev.* 46, 1–31.
- Richeri, A., Bianchimano, P., Mármol, N.M., Viettro, L., Cowen, T., Brauer, M., 2005. Plasticity in rat uterine sympathetic nerves: the role of TrkA and p75 nerve growth factor receptors. *J. Anat.* 207, 125–134.
- Richeri, A., Bianchimano, P., Crutcher, K.A., Brauer, M., 2010. Reduced sympathetic neurite outgrowth on uterine tissue sections from rats treated with estrogen. *Cell Tissue Res.* 340, 287–301.
- Santana, N., Troyano-Rodríguez, E., Mengod, G., Celada, P., Artigas, F., 2011. Activation of thalamocortical networks by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist phencyclidine: reversal by clozapine. *Biol. Psychiatry* 69, 918–927.
- Scorza, M.C., Meikle, M.N., Hill, X.L., Richeri, A., Lorenzo, D., Artigas, F., 2008. Prefrontal cortex lesions cause only minor effects on the hyperlocomotion induced by MK-801 and its reversal by clozapine. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 11, 519–532.
- Scorza, M.C., Castañé, A., Bortolozzi, A., Artigas, F., 2010. Clozapine does not require 5-HT1A receptors to block the locomotor hyperactivity induced by MK-801. *Neuropharmacol.* 59, 112–120.
- Sharp, F.R., Jasper, P., Hall, J., Noble, L., Sagar, S.M., 1991. MK-801 and ketamine induce heat shock protein HSP72 in injured neurons in posterior cingulate and retrosplenial cortex. *Ann. Neurol.* 30, 801–809.
- Sharp, F.R., Tomitaka, M., 2001. Psychosis: pathological activation of limbic thalamocortical circuits by psychomimetics and schizophrenia? *Trends Neurosci.* 24, 330–334.
- Shenton, M.E., Dickey, C.C., Frumin, M., McCarley, R.W., 2001. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 49, 1–52.
- Spanos, L.J., Yamamoto, B.K., 1989. Acute and subchronic effects of methylenedioxymethamphetamine [(+) MDMA] on locomotion and serotonin syndrome behavior in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav. USA* 32, 835–840.
- Suzuki, Y., Jodo, E., Takeuchi, S., Niwa, S., Kayama, Y., 2002. Acute administration of phencyclidine induces tonic activation of medial prefrontal cortex neurons in freely moving rats. *Neuroscience* 114, 769–779.
- Takahata, R., Moghaddam, B., 2003. Activation of glutamate neurotransmission in the prefrontal cortex sustains the motoric and dopaminergic effects of phencyclidine. *Neuropsychopharmacol.* 28, 1117–1124.
- Tarrés-Gatius, M., Scorza, C., López, X., Santana, N., Fabius, S., Artigas, F., Castañé, A., 2018. Relevance of the GluN2C subunit for the acute motor effects of NMDA receptor antagonists in mice. *Fens Forum* 2018. <https://forum2018.fens.org/>.
- Thierry, A.M., Gioanni, Y., Dégénétais, E., Glowinski, J., 2000. Hippocampo-Prefrontal Cortex Pathway: Anatomical and Electrophysiological Characteristics. *Hippocampus* 10, 411–419.
- Tomitaka, S., Tomitaka, M., Tolliver, B.K., Sharp, F.R., 2000. Bilateral blockade of NMDA receptors in anterior thalamus by dizolcipine (MK-801) injures pyramidal neurons in rat retrosplenial cortex. *Eur. J. Neurosci.* 12, 1420–1430.
- Väisänen, J., Ihalaainen, J., Tanila, H., Castren, E., 2004. Effects of NMDA-receptor antagonist treatment on c-fos expression in rat brain areas implicated in schizophrenia. *Cell Mol. Neurobiol.* 24, 769–780.
- Van Groen, T., Kadish, I., Wyss, J.M., 1999. Efferent connections of the anteromedial nucleus of the thalamus of the rat. *Brain Res. Rev.* 30, 1–26.
- Watis, L., Chen, S.H., Chua, H.C., Chong, S.A., Sim, K., 2008. Glutamatergic abnormalities of the thalamus in schizophrenia: a systematic review. *J. Neural Transm.* 115, 493–511.
- Winter, S.S., Clark, B.J., Taube, J.S., 2015. Spatial navigation. Disruption of the head direction cell network impairs the parahippocampal grid cell signal. *Science* 347, 870–874.
- Wu, J., Zou, H., Strong, J.A., Yu, J., Zhou, X., Xie, Q., Zhao, G., Jin, M., Yu, L., 2005. Bimodal effects of MK-801 on locomotion and stereotypy in C57BL/6 mice. *Psychopharmacol. (Berl.)* 177, 256–263.
- Young, J.W., Minassian, A., Geyer, M.A., 2016. Locomotor Profiling from Rodents to the Clinic and Back Again. *Curr. Top Behav. Neurosci.* 28, 287–303.
- Zhang, Y., Llinas, R.R., Lisman, J.E., 2009. Inhibition of NMDARs in the nucleus reticularis of the thalamus produces delta frequency bursting. *Front. Neural Circuits* 3, 1–9.
- Zhang, Y., Buonanno, A., Vertes, R.P., Hoover, W.B., Lisman, J.E., 2012. NR2C in the Thalamic Reticular Nucleus; Effects of the NR2C Knockout. *PLoS One* 7, e41908.
- Żakowski, W., 2017. Neurochemistry of the Anterior Thalamic Nuclei. *Mol. Neurobiol.* 54, 5248–5263.

Objetivo Específico 1.3. Evaluar la capacidad de Clozapina administrada en el ATN para atenuar el efecto comportamental tipo-psicótico inducido por la administración sistémica de MK-801.

Posteriormente, se evaluó el efecto local de Clozapina intra-ATN en la atenuación de los efectos comportamentales tipo-psicóticos (SCM) inducidos por la administración sistémica de MK-801. Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que la administración sistémica de Clozapina era capaz de atenuar significativamente la respuesta comportamental (SCM) inducida por la administración sistémica de MK-801 [Scorza y cols. 2010]. Teniendo en cuenta que el ATN, a través de un mecanismo de desinhibición, es sustrato en la inducción del SCM por parte del antagonista del NMDA-R, MK-801, [López Hill y Scorza, 2012] restaba evaluar si también era una región clave en el mecanismo de acción de Clozapina para la atenuación del SCM. Los resultados se muestran en la Figura 14 A y B y en la Tabla 3.

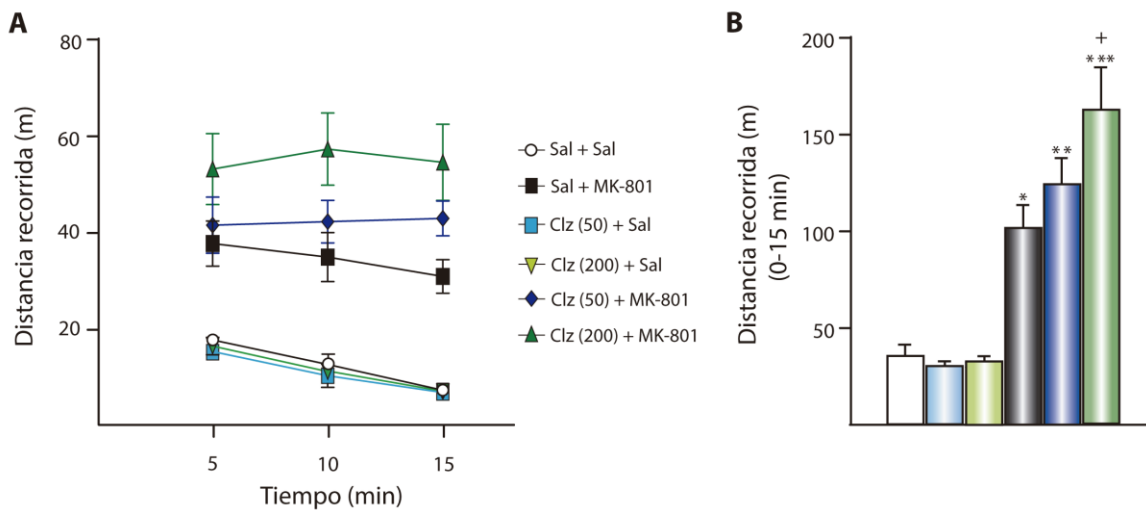


Figura 14 A-B. Efecto de MK-801 (0.2 mg/kg, i.p.) y la co-administración de Clozapina (50 y 200 μ M) intra-ATN sobre la actividad motora medida como distancia recorrida (m) cada 5 minutos (A) y en el tiempo total de registro (B). Los datos se expresan como la media \pm EEM. ANOVA de una vía seguido del *Test* de Newman-Keuls; * = vs Sal + Sal; + = vs Sal + MK-801; ***, +++ = $p < 0.001$. ** = $p < 0.01$. *,+ = $p < 0.05$. N= 4-6.

Se observó que los animales micro-inyectados con salino intra-ATN e inyectados con MK-801 (0.2 mg/kg i.p.) mostraron un aumento significativo de la locomoción con un perfil similar al descrito previamente [Lopez Hill y Scorza 2012]. El proceso de habituación natural de los animales controles parece estar alterado en los animales tratados con MK-801 (Fig. 14 A). A su vez, la administración de Clozapina (50 y 200 μ M) intra-ATN y salino i.p. no indujo un efecto *per se* en la actividad locomotora dado que mostraron un perfil comportamental similar al grupo control (salino intra ATN y salino i.p.) Los animales además, parecen tener una correcta habituación al modelo (Fig. 14 A). Contrario a lo que se esperaba, la co-administración de Clozapina en el ATN y MK-801 i.p., no atenúo la hiperactividad inducida por MK-801. Clozapina 50 μ M no bloquea la hiperactividad de MK-801, mientras que la dosis mayor de 200 μ M parece potenciar los efectos de MK-801, dado que provocó un aumento aún mayor del parámetro y estadísticamente significativo (Fig. 14 B).

Por otro lado, se observó que la hiperactividad en los animales tratados con MK-801 se acompañó de un patrón motor alterado reflejado en un aumento significativo en la desorganización motora así como en la continuidad del movimiento. En relación a la alteración de las otras conductas motoras que se han descrito para los antagonistas del NMDA-R, si bien se observó una aparición de caídas torpes, estos cambios no alcanzaron diferencias significativas respecto al grupo control (Tabla 3). A su vez, se observó una disminución significativa en el número de rearings en los primeros 5 min del registro de conductas (Tabla 3), sugiriendo una alteración en la habituación al ambiente. Clozapina no logró bloquear el aumento en la desorganización motora, en la continuidad del movimiento o las caídas torpes inducidos por MK-801 con ninguna de las dosis utilizadas. En cuanto al número de rearings, estos disminuyeron significativamente respecto al grupo tratado con Sal + MK-801 (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de Clozapina intra-ATN en las conductas del SCM inducidas por MK-801 sistémico

Tratamientos	Patrón Motor		Ataxia		Estereotípías		
	Mov. Desorganizado	Mov. Continuo	Caídas torpes	Abducción de patas	Head Weavings	Head shakes	Rearings (0-5 min)
Sal + Sal	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.7 ± 0.6	23.7 ± 2.1
Sal + MK-801	2.6 ± 0.2 ^{***}	1.8 ± 0.2 ^{***}	7.6 ± 4.4	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.3	2.2 ± 0.7	13.4 ± 2.7 [*]
Clz 50 + Sal	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.5 ± 1.7	25.3 ± 0.8
Clz 200 + Sal	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.2 ± 2.2	21.2 ± 2.2
Clz 50 + MK-801	2.8 ± 0.3 ^{***}	2.0 ± 0.4 ^{***}	16.5 ± 7.1	0.0 ± 0.0	3.0 ± 1.8	0.0 ± 0.0	8.5 ± 4.0 ^{**+}
Clz 200 + MK-801	2.8 ± 0.2 ^{***}	2.2 ± 0.4 ^{***}	4.4 ± 2.3	0.0 ± 0.0	3.0 ± 1.4	1.0 ± 0.6	5.4 ± 1.5 ^{***++}

Tabla 3. Efecto de la co-administración de clozapina 50 y 200 µM intra-ATN sobre la conducta exploratoria vertical durante la fase exploratoria (primeros 5 min. de registro), las estereotípías, patrón motor y signos de ataxia inducidos por la inyección i.p. de salino o MK-801 (0.2 mg/kg). Media ± EEM. ANOVA de una vía seguido del *Test* de Newman-Keuls; * = vs Sal + Sal; / = vs Clz 50 + Sal; # = vs Clz 200 + Sal; **, // = p < 0.01; ***, ///, ### = p < 0.001. N= 4-6.

Los resultados obtenidos para la primera serie de experimentos, incluidos en la Publicación científica 1, demostraron que la administración sistémica de MK-801 indujo un efecto comportamental caracterizado por hiperactividad con un patrón motor desorganizado, sin inducir cambios significativos en los signos de ataxia y estereotípías. Las alteraciones comportamentales se vieron acompañadas de una activación celular en el ATN demostrando que éste núcleo talámico participa en el mecanismo de acción de MK-801 para generar el SCM, posiblemente, implicando el bloqueo de los NMDA-Rs de las neuronas GABAérgicas del RTN. Por el contrario, el HC y la RSC no fueron activadas por MK-801 a la dosis utilizada, mientras que la subregión PrL de la CPF y el NAc,Sh, si mostraron activación neural. Este resultado brinda evidencias que apoyan la participación de una red cerebral tálamo-cortico-límbica, en particular aquellas que involucran conexiones funcionales entre ATN, PFC y NAc, en las acciones motoras de la administración sistémica MK-801, apoyando otros estudios ya publicados [Hervig y cols. 2016; Kargieman y cols. 2007; Santana y cols. 2011; Väisänen y cols. 2004]. Por otro lado, una posible existencia de un umbral farmacológico del bloqueo de los NMDA-Rs a partir del cual se induciría el SCM, podría explicar la ausencia de cambios en las estereotípías y los signos de ataxia luego de la administración de MK-801, sugiriendo que la dosis de MK-801 utilizada estaría en el límite de éste umbral, resultando insuficiente para inducir estas

conductas y también para reclutar las regiones cerebrales vinculadas a las mismas, CPU y cerebelo [Gowen y Miall 2007; Hoxha y cols. 2018].

La desinhibición del ATN indujo solo algunas de las conductas del SCM de los antagonistas NMDA, hiperactividad acompañada de una desorganización motora leve y ausencia de signos de ataxia y estereotipos, así como una disminución en los *rearings*. La alteración comportamental se vio acompañada de un aumento de Fra-2-IR en el GD del Hc y el NAc,Sh, la cual podría ser explicada por el mayor grado de activación neuronal en la EC inducida por bicuculina intra-ATN en comparación con MK-801, dado que la EC recibe aferencias desde el ATN [Dalrymple-Alford y cols. 2015] y a su vez, está íntimamente interconectada con la formación del HC, [Hargreaves y cols. 2005; Yun y cols. 2018] y envía inputs excitatorios al NAc core y shell [Totterdell y Meredith 1997; Humphries y Prescott 2010]. Por lo tanto, estos resultados sugieren la existencia de una actividad funcional aumentada en una red circuital que involucra la conectividad entre ATN, EC, DG y NAc, inducida por la desinhibición local del ATN la cual estaría vinculada al efecto comportamental observado. Por otro lado, el hecho de que la desinhibición del ATN no haya inducido signos de ataxia apoya una posible participación de otras regiones del SNC en la inducción de estas conductas, posiblemente, el cerebelo. Aunque la desinhibición GABAérgica de ATN mostró diferencias con la administración sistémica de MK-801, esta estrategia farmacológica podría ser útil para desenmascarar un papel más específico de las regiones cerebrales (PrL, EC-DG y NAcc, Sh) involucradas en el comportamiento motor que de otro modo podría pasar desapercibido debido a un efecto sistémico de MK-801.

En relación a los resultados obtenidos en el objetivo específico 1.3, estos parecen ir en el sentido contrario a lo postulado en nuestra hipótesis inicial. La administración local de Clz intra-ATN no solo logró atenuar los efectos del MK-801 sino que incluso generó una potenciación dosis-dependiente en alguna de las conductas inducidas por MK-801. En particular, indujo un aumento en la actividad motora y una disminución en el número de *rearings*. La interpretación de estos resultados puede vincularse con dos principales aspectos. Por un lado, es posible que la acción de Clz sobre alguno de los receptores expresados en el ATN, pueda estar generando una alteración en el balance excitatorio/inhibitorio en dicho núcleo generando esta respuesta conductual potenciada. De hecho, en esta Tesis hemos demostrado que una alteración en el nivel de excitación del ATN (desinhibición GABAérgica) es capaz de inducir alguna de las conductas motoras similares a las reportadas por los antagonistas del NMDA-R.

En este sentido, las conexiones excitatorias recíprocas del ATN con las diferentes regiones corticales [Gonzalo-Ruiz y cols. 1997; Shibata y Naito 2005; Wright y cols. 2010] y con los núcleos mamilares [Vann y cols. 2007] así como las proyecciones GABAérgicas que recibe del RTN [Gonzalo-Ruiz y Lieberman 1995] son los inputs responsables, en mayor medida, de mantener un balance excitatorio/inhibitorio adecuado en el ATN. Sin embargo, varias evidencias demuestran la presencia de *inputs* serotoninérgicos, noradrenérgicos y muscarínicos que llegan al ATN y que poseen la importante función de modular su nivel de activación [Park y cols. 2009; Zakowski 2017]. La modulación en la actividad de las neuronas del ATN se da a través de la acción de los distintos neurotransmisores en los diferentes tipos de receptores específicos que allí se expresan, varios de los cuales Clz posee afinidad [Day y cols. 1997; Rodriguez y cols. 2011; Zakowski 2017]. La acción de Clz sobre alguno de estos receptores podría explicar sus acciones potenciadoras. En este sentido, se vió que los receptores muscarínicos tipo 2 (M2-R) se expresan presinápticamente en las terminales axónicas de las proyecciones excitatorias provenientes de los núcleos mamilares en el ATN. Fue demostrado que los M2-R modulan negativamente el efecto excitatorio de éstas proyecciones sobre las neuronas relé del ATN [Sikes y Vogt 1987; Zakowski 2017]. Clz posee afinidad por los M2-R, actuando como un agonista parcial del mismo [Michal y cols. 1999]. Es posible que la acción de Clz sobre los M2-R resulte en una modulación inhibitoria menor sobre los inputs excitatorios que llegan desde los núcleos mamilares generando como resultado neto una mayor excitación de las neuronas relé del ATN reflejada en la alteración motora observada.

Por otro lado, estudios en el campo de la esquizofrenia sugieren que los compuestos que potencian la función del NMDA-R en las regiones cerebrales apropiadas podrían ser un agente antipsicótico eficaz [Javitt y cols. 1999]. En este sentido, se ha demostrado que Clz posee la capacidad de modular indirectamente los niveles de Glu, glicina y D-serina a través de una reducción en la expresión del transportador de Glu en cultivos de astrocitos y también en cerebro de rata [Schneider y cols. 1998; Schmitt 2003; Vallejo-Illarramendi y cols. 2005; Tanahashi y cols. 2012]. Sin embargo, en este caso, un aumento de Glu sináptico en el ATN podría ejercer un efecto excitatorio a través de la activación de receptores Gluérgicos no-NMDA [Gonzalo-Ruiz y cols. 1997; Turner y Salt 1998] resultando contraproducente para alcanzar el bloqueo de las conductas exacerbadas inducidas por MK-801. Finalmente, no se puede descartar una posible participación de receptores serotoninérgicos de los subtipos 5-HT₇, 5-HT₆ y 5-HT_{1A} y receptores adrenérgicos, subtipos α 1B y α 2B, los cuales también se expresan en el ATN y por los cuales Clz demuestra tener afinidad.

De manera interesante, algunas evidencias demostraron que la acción de Clz sobre ellos puede influir en la respuesta excitatoria de neuronas piramidales y también en la inducción de algunas respuestas motoras en animales [Day y cols. 1997; Kalkman y cols. 1998; Diaz Matrix y cols. 2005; Rodriguez y cols. 2011].

Si bien los resultados parecen ser contrarios a los esperados en relación a la demostración de un posible efecto antipsicótico de la Clozapina en el ATN, se podría especular que, en cierta medida, los datos continúan confirmando que ATN es sustrato de la inducción de los efectos comportamentales tipo-psicóticos. Identificar específicamente el receptor por el cual Clozapina u otro AAT posea afinidad, podría dar con la clave para atenuar los efectos comportamentales inducidos por los antagonistas del NMDA-R o la exacerbación del ATN.

Capítulo 1-Resultados II

Los resultados que se describirán en esta sección se enmarcan dentro del objetivo específico 1.4 planteado en el capítulo I de la presente Tesis. En dicho objetivo se propuso evaluar el papel de la subunidad GluN2C en la inducción de los efectos comportamentales tipo-psicóticos (SCM) luego de la administración sistémica de los antagonistas del NMDA-R, MK-801 y PCP.

Los resultados obtenidos fueron incluidos en un trabajo científico que se encuentra en las etapas de preparación, el cual esta siendo elaborado en colaboración con el grupo del IIBB. Es importante mencionar que en el manuscrito se incluye una serie más extensa de resultados, que superan los que fueron incluidos en este trabajo de Tesis. En función de la hipótesis de la tesis, los resultados que se muestran son aquellos exclusivamente vinculados a la evaluación comportamental de los efectos tipo-psicóticos (SCM) inducidos por la administración sistémica de MK-801 y PCP en ratones WT y KO-GluN2C.

- **Manuscrito en preparación:** Mireia Tarrés-Gatius, Lluís Miquel-Rio, **Ximena López-Hill**, Laura Castarlenas, Sara Fabius, Noemí Santana, Francesc Artigas, María Cecilia Scorza, Anna Castañé. Influence of GluN2C subunit in the neurochemical and psychotomimetic-like effects induced by systemic administration of two NMDA-R antagonists, MK-801 and PCP: NR2C knockout vs WT mice. Manuscrito en preparación, *Translational Psychiatry*, 2019.

RESUMEN

Influence of GluN2C subunit in the neurochemical and psychotomimetic-like effects induced by systemic administration of two NMDA-R antagonists, MK-801 and PCP: N2C knockout vs WT mice

Mireia Tarrés-Gatius^{1,2}, Lluís Miquel-Rio^{1,2}, Ximena López-Hill³, Laura Castarlenas^{1,2}, Sara Fabius³, Noemí Santana^{1,2,4}, Francesc Artigas^{1,2,4}, María Cecilia Scorza³, Anna Castañé^{1,2,4}

¹ Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (IIBB-CSIC), Barcelona, Spain;

² Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain;

³ Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay;

⁴ Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), ISCIII, Madrid, Spain

Non-competitive NMDA-R antagonists like ketamine, phencyclidine (PCP) and MK-801 are used as pharmacological models of schizophrenia. Previous studies with PCP indicate that these compounds activate thalamo-cortical circuits after the blockade of NMDA-R in reticular thalamic GABAergic neurons. Since the GluN2C subunit of NMDA-R is densely expressed in reticular nucleus of the thalamus and cerebellum, we study the involvement of this subunit in the behavioral effects induced by NMDA-R antagonists under the working hypothesis that those effects would be partly attenuated in absence of the GluN2C subunit. Male wild-type (WT) and GluN2C receptor subunit knockout (KO-GluN2C) mice were acutely treated with MK-801 (0.25 mg/kg) or PCP (5 mg/kg) and saline (vehicle) and the behavioral effect was evaluated in the open field, rotarod and pre-pulse inhibition paradigms. Also, extracellular dopamine (DA) concentration in the nucleo accumbens (NAc) was measured by in vivo intracerebral microdialysis in a freely moving. Finally, NMDA-R subunits distribution and the effects of NMDA-R antagonists on brain c-fos mRNA expression were examined by in situ hybridization.

Both NMDA-R antagonists induced a disorganized hiperlocomotion in both genotypes. However, stereotyped behaviors (rearings) and ataxia signs (falls and hindlimb abduction) were dramatically attenuated in the KO-GluN2C mice. The administration of MK-801 significantly decreased the latency to fall

(s) 2.5 hours after drug injection in both genotypes, but this effect was significantly attenuated in GluN2CKO mice. In the case of PCP treatment (5 mg/kg), a significant reduction in the time spent on the rotarod was observed only in WT treated animals but not in KO-GluN2C treated mice. Acute treatment with MK-801 and PCP similarly reduced startle reflex in response to the pre-pulse plus pulse trials in both genotypes. The absence of the GluN2C subunit does not affect DA release in NAc neither in basal nor after NMDA-R blockade. NMDA-R antagonists evoked a general pattern of c-fos activation (except in cerebellum, where reductions were noted), with genotype differences in hippocampus, globus pallidus and cerebellum, among other areas.

In sum, our results suggest that GluN2C subunit appears to be strongly involved in the stereotypical, ataxia behaviors and motor coordination but not to sensory gating. The motor effects induced by the systemic administration of both NMDA-R antagonists seem to be independent of DA neurotransmission in ventral striatum. Moreover, our data suggest a role of GluN2C-containing NMDA-R in the cerebellum, a key brain structure for the control of motor coordination. Therefore, further studies are needed to fully understand the role of the cerebellum and the GluN2C subunit in the pathophysiology of schizophrenia.

Los resultados mostraron que la administración sistémica y aguda de MK-801 (0.25 mg/kg) provocó un aumento de la actividad locomotora en ambos genotipos respecto a su grupo control aunque únicamente se alcanzó una significancia estadística en el grupo de KO-GluN2C. Además, el tratamiento con MK-801 indujo un aumento significativo en ésta conducta en los ratones KO-GluN2C en comparación con los ratones WT (Fig. 15A). En contraste, el antagonista de NMDA-R aumentó la sinuosidad del movimiento (o *meander*) siendo el aumento de esta conducta significativamente menor en los ratones KO-GluN2C en relación a los WT (Fig. 15B). En relación al número de *rearings*, MK-801 indujo una disminución significativa tanto en los ratones WT como KO-GluN2C (Fig. 16A). A su vez, se observó un aumento significativo del número de caídas torpes, de la intensidad en la abducción de las extremidades posteriores y en el comportamiento de *circling* en los ratones WT (Fig. 16B-D), mientras que para los ratones KO-GluN2C, únicamente se observó un aumento en la abducción de las patas traseras (Fig. 16C). Todas estas alteraciones conductuales se vieron significativamente reuicidas en los ratones KO-GluN2C (Fig. 16B-D).

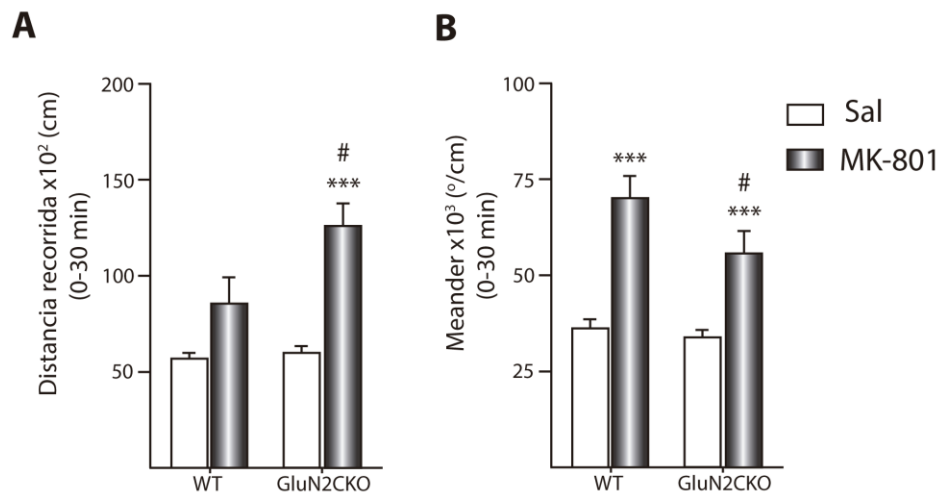


Figura 15 A-B. Efecto de MK-801 (0.25 mg/kg) sobre la Actividad locomotora (A) y el Meandering Sinuosidad o del movimiento (B). Los datos se expresan como la media \pm EEM. ANOVA de una vía seguido del *Test* de Newman-Keuls; * = vs Sal; # = vs WT; # = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$. N = 7-10.

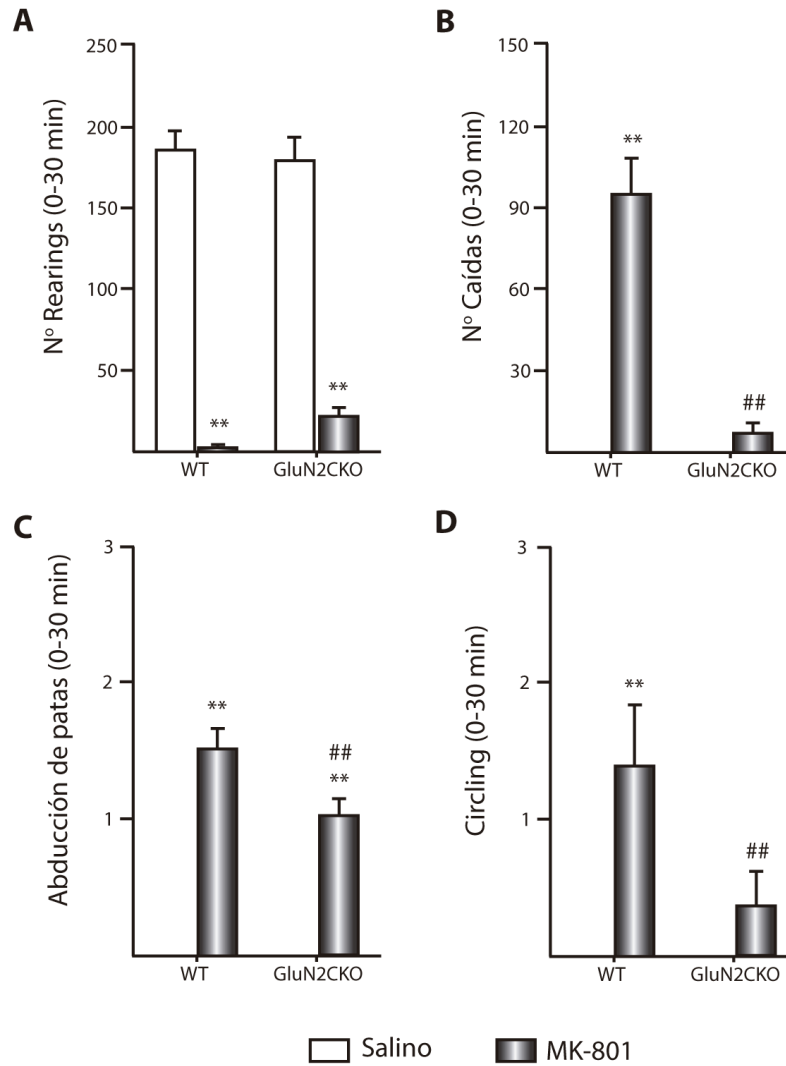


Figura 16 A-D. Efecto de MK-801 (0.25 mg/kg) sobre el N° de *rearing*s (A), N° de Caídas (B), Abducción del miembros posteriores (C) y *Circling* (D). Los datos se expresan como la media \pm EEM. ANOVA de una vía seguido del *Test* de Newman-Keuls; ** $p < 0.01$ vs salino; ## $p < 0.01$ vs WT. N = 7-10.

En relación a la evaluación del SCM utilizando el antagonista del NMDA-R PCP, se observó un perfil comportamental similar al demostrado por MK-801 describiéndose un aumento en la actividad motora y del meander en ambos genotipos. Sin embargo, únicamente se alcanzó una diferencia significativa entre los grupos WT y KO-GluN2C en la actividad motora y no en el parámetro meander (Fig. 17 A-B).

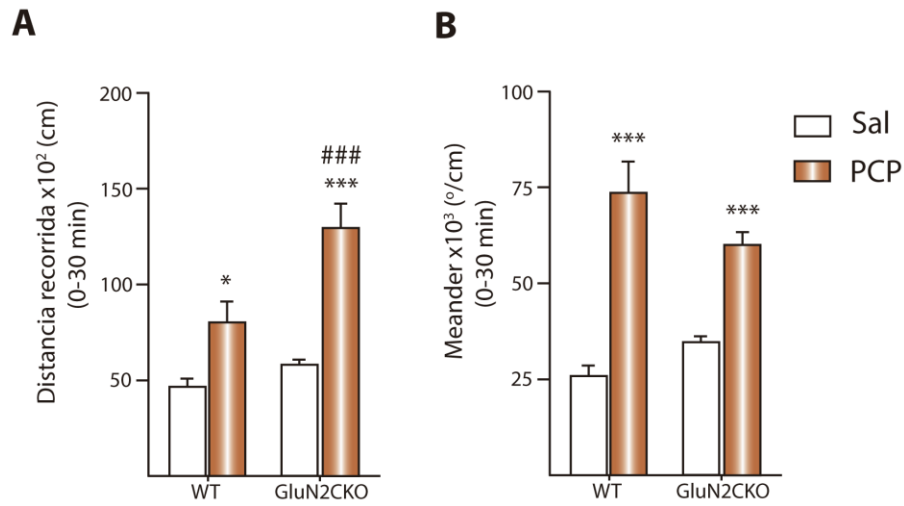


Figura 17 A-B. Efecto de PCP (5 mg/kg) sobre la Actividad locomotora (A) y el Meandering o Sinuosidad del movimiento (B). Los datos se expresan como la media \pm EEM. ANOVA de una vía seguido del *Test* de Newman-Keuls; * = vs salino; # = vs WT; * = $p < 0.05$; ***, ### = $p < 0.001$. N = 7-10.

La disminución en el número de *rearings* también se evidenció en ambos genotipos, sin embargo, esta disminución fue menos evidente en los ratones KO-GluN2C (Fig. 18A). A su vez, el aumento en las caídas torpes, la abducción de las extremidades posteriores y el *circling* inducidos por PCP, se vio significativamente disminuido en los ratones KO-Glu2C (Fig. 18B-D).

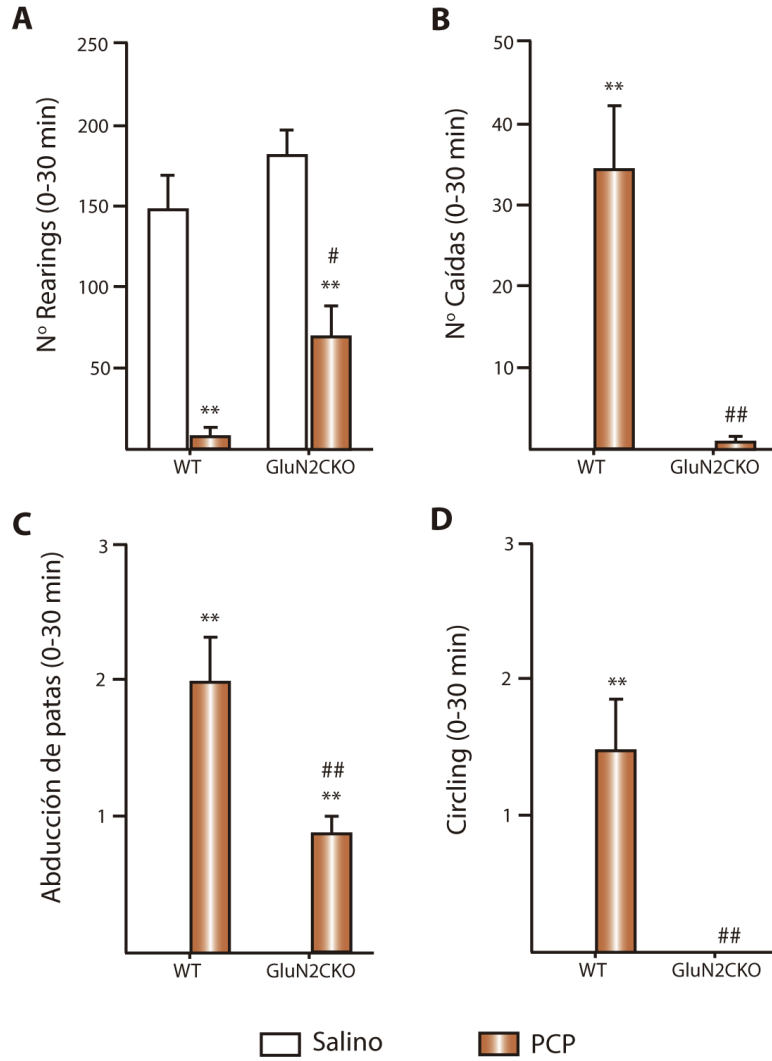


Figura 18 A-B. Efecto de PCP (5 mg/kg) sobre el N° de *rearing*s (A), N° de Caídas (B), Abducción del miembros posteriores (C) y *Circling* (D). Los datos se expresan como la media \pm EEM. ANOVA de una vía seguido del *Test* de Newman-Keuls; ** $p < 0.01$ vs salino; ## $p < 0.01$ vs WT. N = 7-10.

Los resultados obtenidos en este grupo de experimentos indican que la subunidad GluN2C parece estar fuertemente involucrada en la aparición de determinados componentes motores del SCM inducido por la administración sistémica de los antagonistas de NMDA-Rs. En base a la hipótesis planteada en la presente Tesis, se esperaba que, siendo la subunidad NR2C expresada en el RTN el sitio que determinara la acción preferencial de los antagonistas del NMDA-R, su ausencia impediría la inducción del SCM luego de la administración de antagonistas del NMDA-R. Sin embargo, la ausencia de expresión de la subunidad GluN2C dió como resultado una atenuación significativa únicamente de los comportamientos vinculados al patrón locomotor, tales como el *meandering*, el *circling* y los signos de ataxia (caídas y abducción de las extremidades posteriores) mientras que se observó una potenciación de la hiperlocomoción. Es importante considerar que, si bien para el caso de los ratones WT, en el grupo experimental tratado con MK-801, la hiperlocomoción no se diferencio significativamente del grupo control, si se observó una marcada tendencia a aumentar. En este sentido, el síndrome comportamental motor de los antagonistas NMDA-R se constituye por un conjunto de conductas motoras que se ven alteradas por la administración del fármaco por lo que, podemos decir que la inducción del síndrome comportamental motor se observó con ambos antagonistas NMDA-R en los animales WT. Respecto a la potenciación de la locomoción, una posible interpretación podría estar vinculada a que la atenuación observada en las conductas del patrón locomotor, llevara a que los animales tuvieran menos ataxia (menor numero de caídas, y menor abducción de patas traseras) mayor coordinación y mejor desplazamiento. En relación a la mayor coordinación, otra serie de resultados (no incluidos en la tesis) confirmaron que los ratones KO-GluN2C tratados tanto con MK-801 como con PCP, logran pasar más tiempo en el test de rotarod (test para coordinación motora) en comparación con los ratones WT, sugiriendo una mejor performance de los animales KO-GluN2C en relación a los WT. Por otro lado, ambos antagonistas redujeron significativamente la respuesta de sobresalto evidenciado en el modelo de inhibición pre-pulso (PPI) en ambos genotipos, lo que indica que, en ambos casos, existe una alteración sensoriomotora (asociada a el efecto psicotomimético)[Tarrés y cols. 2019]. Ambos datos sugieren que la subunidad GluN2C estaría participando de forma directa sobre comportamientos asociados a la coordinación motora, mientras que la misma no estaría relacionada con procesos que involucran la filtración de inputs sensoriales (efecto psicotomimético de los antagonistas NMDA-R). El hecho de que la ausencia de la subunidad GluN2C haya influenciado únicamente a aquellos componentes del SCM asociados con la coordinación motora sugiere que otra región, particularmente especializada en funciones de coordinación motora, podría estar involucrada en la generación del SCM de

los antagonistas NMDA-R. En este sentido, es de amplio conocimiento que el cerebelo recibe información de los sistemas sensoriales de la médula espinal y de otras partes del cerebro, e integra estas entradas para ajustar la actividad motora contribuyendo a la coordinación, la precisión y la sincronización precisa del movimiento [Coffman y cols. 2011; Zhang 2016]. De hecho, el daño cerebeloso produce trastornos en el movimiento fino, el equilibrio, la postura y el aprendizaje motor [Glickstein 1992; Bastian y cols. 1996; Morton y Bastian 2003]. Además, dado los vínculos anatómicos directos entre algunos núcleos cerebelosos y el sistema límbico, incluidos el hipotálamo, los núcleos septales, el HC, el NAc y la amígdala, durante los últimos años se han realizado varios estudios enfocados en estudiar la relación del cerebelo y funciones no motoras [Hayter y cols. 2007; Timmann y Daum 2007; Sacchetti y cols. 2009; Strick y cols. 2009]. En este sentido, estudios de neuroimágenes revelaron que en humanos, el cerebelo se activa durante la realización de algunos procesos cognitivos como al recordar episodios emocionales personales o durante el aprendizaje de una asociación condicionada o no condicionada que involucra emociones [Strata 2015]. Estudios con animales, mostraron que la región del vermis y el núcleo fastigial del cerebelo, están relacionados con procesos de aprendizaje del miedo a estímulos aversivos, esenciales para la supervivencia, con un impacto emocional muy fuerte [LeDoux 2000] y también, en los mecanismos de memoria relacionados con la expresión de respuestas autónomas y motoras de las emociones [Sacchetti y cols. 2002; Zhang y cols. 2016]. Estos estudios, entre otros, demostraron que el cerebelo también contribuye al desempeño de funciones cognitivas superiores y funciones afectivas no motoras, sin bien, las contribuciones mecanicistas precisas que el cerebelo hace a estas funciones aún no se han dilucidado.

A su vez, el cerebelo es una de las áreas del encéfalo con mayor expresión de GluN2C [Farrant y cols. 1994; Karavanova y cols. 2007], particularmente en las neuronas granulares del cerebelo [Bhattacharya y cols. 2018]. Esta clase de neuronas en particular, mostró una respuesta de activación, evenciada por un aumento en la expresión de Fos, luego de la administración sistémica de PCP y MK-801 a las mismas dosis en que generan las alteraciones motoras del SCM [Nakki y cols. 1996]. Dada la particularidad biofísica que demostraron poseer los NMDA-Rs que se componen de la subunidad GluN2C frente a la acción de los antagonistas del NMDA-R, podemos suponer que, en ausencia de ésta subunidad, la actividad cerebelosa se ve menos afectada por los antagonistas del NMDA-R y esto puede contribuir a una mejor coordinación en los ratones KO-GluN2C. Debido a la participación del cerebelo en muchas actividades corticales diferentes, una disfunción cerebelosa podría conducir a muchos tipos diferentes de disfunción cortical que a su vez, podrían contribuir a la diversidad de síntomas y disfunciones cognitivas observadas en la

esquizofrenia. De manera interesante, una serie de estudios revelaron una asociación de anomalías cerebelosas con diferentes trastornos neuropsiquiátricos, incluida la esquizofrenia [Andreasen y Pierson 2008; Picard y cols. 2008; Hoppenbrouwers y cols. 2008; Kim y cols. 2014]. En este sentido, estudios de neuroimagen revelaron un volumen del vermis cerebeloso disminuido en pacientes con esquizofrenia [Nopoulos y cols. 1999; Ichimiya y cols. 2001].

También se observaron niveles reducidos del metabolito ácido *N*-acetilaspartico en el vermis y la corteza cerebelosa de personas con la enfermedad, un indicativo de que una pérdida o disfunción neuronal en esta región estaría involucrada [Ende y cols. 2005]. Además, estudios más recientes realizados por Kim y cols. mostraron que la arquitectura modular y la integridad del tejido, en particular en la subregión del vermis cerebeloso Crus II, se encontraba alterada en personas con esquizofrenia. Estas anomalías estructurales, a su vez, mostraban estar correlacionadas con los síntomas asociados al trastorno [Kim y cols. 2014].

La anatomía cerebelosa está organizada en un patrón simple pero elegante que le permite realizar una afinada percepción de patrones, detección de errores y una rápida modulación y coordinación. La corteza del cerebelo consta de tres capas y se divide en muchas zonas funcionales. La mayoría de la información llega al córtex cerebeloso a través de las fibras musgosas terminando en la capa granular. Esta información luego se retransmite a la capa de salida formada por las células de Purkinje (células-P). Los axones de células granulares, denominados fibras paralelas, ascienden a la capa molecular y hacen sinapsis en las dendritas de células-P, las cuales poseen una salida inhibitoria (GABAérgica) que se dirigen a los núcleos profundos del cerebelo (por ej., núcleo dentado). Las células-P tienen el importante papel de decidir qué información se devuelve o no a la corteza cerebral mediante la inhibición de los núcleos de salida mientras que, la entrada de las fibras musgosas puede excitar las células-P a través de las células granulares y las fibras paralelas. Por lo tanto, las células inhibitorias de Purkinje y las células granulares excitatorias son especialmente importantes en la función cerebelosa, ayudando a modular o coordinar la actividad proveniente de la corteza cerebral a través del envío de información a los núcleos profundos del cerebelo y a su vez, a discriminar y reconocer condiciones de entrada específicas (como la variación en ubicaciones espaciales o en patrones de entradas auditivas) otorgándole al cerebelo un importante poder para tomar decisiones bien definidas sobre la gran cantidad de información que recibe. Por lo tanto, un deterioro en el tono excitatorio/inhibitorio en el cerebelo podría estar involucrado en la base fisiopatológica de alguno de los síntomas presentes en la esquizofrenia [Andreasen 2008; Yeganeh-Doost y cols. 2011].

Por último, se debe tener en cuenta que el conjunto de resultados obtenidos en este set de experimentos se contraponen a resultados recientes obtenidos por otros grupos de investigación donde también se evaluó el efecto sobre la actividad motora de antagonistas NMDA-R en ausencia de la subunidad GluN2C o GluN2D [Shelkar y cols 2019]. En esos trabajos se observó que la ausencia de la subunidad GluN2C daba como resultado una menor susceptibilidad a la hiperlocomoción inducida por PCP. La razón precisa que explique estas deferencias no esta clara aunque es posible que cambios homeostáticos durante el desarrollo en estos modelos genéticos puedan compensar la pérdida de un subtipo de receptor, como ser a través de NMDA-Rs conformados por otra subunidad con propiedades biofísicas y de distribución anatómica similares a las de la subunidad GluN2C, como por ejemplo la subunidad GluN2D. De manera interesante, se ha reportado que en ausencia de la subunidad 2D no se observó una menor suseptibilidad a la hiperlocomoción inducida por PCP [Monyer 1994; Traynelis 2010; Shelkar y cols 2019]. Experimentos con utilizando estrategia más específica como la utilización de animales *knockouts* región y tiempo específicos ayudaría a minimizar la debilidad del uso de animales *knockout* constitutivos. Si bien los cambios homeostáticos compensatorios no pueden ser subestimados, otro factor a considerar que podría estar explicando las diferencias observadas, es la cepa de raton utilizada en los difrentes trabajos. En este sentido, Shelkar y cols y otros autores reportaron la existencia de diferencias en la respuesta comportamental motora inducida por un mismo antagonista NMDA-R en ratones KO-GluN2D en dos cepas con background diferente [Yamamoto y cols 2016; Shelkar y cols 2019].

Si bien los resultados en la presente Tesis, así como resultados preliminares obtenidos para la evaluación de la expresión de *fos* en el cerebelo, apuntan a proponer a la subunidad GluN2C de los NMDA-Rs que se expresan en esta región como uno de los factores que influyen en la generación de los efectos comportamentales de los antagonistas del NMDA-R, aún se necesitan más estudios para comprender completamente el papel del cerebelo y la subunidad GluN2C en la fisiopatología de la esquizofrenia y los mecanismos celulares que podrían estar implicados.

Capítulo 2

Los resultados que se describirán en esta sección se enmarcan dentro del capítulo II de los objetivos específicos planteados en la presente Tesis.

En primer lugar se presentarán los resultados del objetivo específico 2.1 donde se planteó evaluar la participación, mediante la evaluación de cambios en los niveles de BDNF, de las regiones de proyección del ATN, HC y RSC, en el déficit cognitivo inducido por la administración sistémica de MK-801. Además, se investigó si la atenuación del déficit cognitivo de Clozapina también involucraba un mecanismo asociado a BDNF.

Parte de los resultados obtenidos en el conjunto de éstos experimentos están incluidos como parte de los resultados de dos Publicaciones científicas presentadas en éste capítulo.

- **Publicación científica 2:** Ximena López Hill, Analía Richeri, María Cecilia Scorza. **Measure of anxiety-related behaviors and hippocampal BDNF levels associated to the amnesic effect induced by MK-801 evaluated in the modified elevated plus-maze in rats.** *Physiol Behav.* 147: 359-63, **2015**.
- **Publicación científica 3:** López Hill X, Richeri A, Scorza MC. **Clozapine blockade of MK-801-induced learning/memory impairment in the mEPM: Role of 5-HT1A receptors and hippocampal BDNF levels.** *Physiol Behav.* 179: 346-352, **2017**.

En segundo lugar, se presentarán los resultados enmarcados en el objetivo específico 2.2 de este trabajo de Tesis. En ellos se planteó evaluar el efecto inducido por la desinhibición GABAérgica del ATN sobre la función cognitiva de los animales evaluada en el modelo de LT.



Measure of anxiety-related behaviors and hippocampal BDNF levels associated to the amnesic effect induced by MK-801 evaluated in the modified elevated plus-maze in rats



Ximena López Hill ^a, Analía Richeri ^b, Cecilia Scorza ^{a,*}

^a Department of Experimental Neuropharmacology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay

^b Laboratory of Cell Biology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay

HIGHLIGHTS

- In the present work we investigated the amnesic effect of MK-801 in the mEPM.
- A behavioral and neurochemical approach was performed.
- Anxiety-related behaviors were not related with the amnesic effect.
- A decrease in hippocampal BDNF levels was found in MK-801-treated animals.
- We provide valuable information related to the amnesic effect of MK-801 in the mEPM.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 June 2014

Received in revised form 4 May 2015

Accepted 15 May 2015

Available online 17 May 2015

Keywords:

NMDA receptor antagonist

Amnesia

Plus-maze

Cognition

ELISA

ABSTRACT

Non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA-R) antagonists impair rodent cognition. Specifically, MK-801, the most potent NMDA-R antagonist, induces an amnesic effect on the modified elevated plus maze (mEPM) learning test in rodents, which reflects spatial long-term memory. However, alterations in anxiety-related behaviors could overlap this amnesic effect. Accumulated evidence supports the role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in learning and memory processes and deficits in hippocampal BDNF function, which underlie cognitive impairments, have been extensively reported. Therefore, we investigated if changes in anxiety-related behaviors and hippocampal BDNF levels are related with the amnesic effect induced by MK-801 in the mEPM.

Transfer latency (TL) as an index of spatial memory in the mEPM was used. TL1 was evaluated 30 min after saline/MK-801 injection (day 1, acquisition session) while learning/memory performance was measured 24 h later at TL2 (day 2, retention session). Also at TL2, two other experimental groups were added to measure the anxiety-related behaviors using the classic EPM and BDNF protein levels by ELISA. To evaluate if amnesia endures, an additional session was recorded on day 3 (TL3) and BDNF levels were measured.

While TL1 was not significantly modified by MK-801, TL2 was increased compared to the control group indicating an amnesic effect. This effect was not mimicked by anxiety-related behaviors and it was associated to a significant attenuation of BDNF levels. During the third post-training day, the cognitive performance of MK-801-treated animals was improved and an increased BDNF protein expression in the hippocampus accompanied this change.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

It has been postulated that non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA-R) antagonists such as ketamine and phencyclidine (PCP) elicit or exacerbate schizophrenia-like symptoms in healthy subjects or in schizophrenic patients respectively, including positive and

negative symptoms as well as cognitive impairments [1–4]. Although it is not consumed by humans, the administration in rodents of the most potent NMDA-R antagonist, dizocilpine or MK-801 induces behavioral alterations which resemble those described above for NMDA antagonists [1,2,5]. Cognitive dysfunction is being increasingly studied in schizophrenia since it is considered the most prevalent symptom as well as it can significantly decrease the patient's quality of life [6]. Therefore, it is now accepted that NMDA antagonists are widely used as animal models of cognitive impairments associated to schizophrenia (CIAS) [7,8]. Several evidences have shown memory-impairing effects

* Corresponding author.

E-mail addresses: xlopez@iibce.edu.uy (X.L. Hill), aricheri@iibce.edu.uy (A. Richeri), csorza@iibce.edu.uy, scorzacecilia@gmail.com (C. Scorza).

induced by MK-801 using the modified elevated plus-maze (mEPM) learning test, a non-sophisticated and straightforward paradigm commonly used in rodents [9–15]. Indeed, some of these studies also investigated the antipsychotic action on the impairment of memory function induced by MK-801 [10,15]. As the same paradigm allows the detection of anxiolytic or anxiogenic-like behavioral responses, false positive/negative effects on learning/memory function could be produced and anxiety-related behaviors might mimic or interfere with a cognitive impairment. Besides, it has been reported that systemic or intra-hippocampal injections of MK-801 in rats can induce anxiolytic effects using the EPM [16–18].

The BDNF (brain-derived neurotrophic factor) is a member of the neurotrophin family and has been commonly related to cognitive functions, especially learning and memory processes [19–23]. Strong evidence in humans and knock-out mice suggest that BDNF plays a role in the hippocampal function and hippocampal-dependent memory [22–25]. It has been reported that hippocampal-specific deletion of the BDNF gene impairs novel object recognition as well as spatial learning in the water maze [26]. Moreover, a relationship between cognitive impairments induced by MK-801 and alterations in BDNF mRNA or protein levels in rat hippocampus has been studied [27–29]. However, as far as we are concerned, no relation has been provided between hippocampal BDNF level and the amnesic effect induced by MK-801 evaluated in the mEPM learning test. Additionally, no information about the duration of this cognitive impairment has been provided using this paradigm.

The present paper was designed to investigate whether anxiety-related behaviors and BDNF levels in the hippocampus are related to the learning/memory deficit induced by MK-801 in rats evaluated in the mEPM learning test. The duration of the effect was also analyzed.

2. Material and methods

2.1. Animals

Fifty two adult male Wistar rats weighing 260–320 g, bred in the IIBCE animal facilities (Montevideo) were employed in the study. The animals were housed in groups of 6 in plastic cages (50 × 37.5 × 21 cm) with food and water available ad libitum and kept under controlled conditions (temperature 22 ± 2 °C, 12-h light–dark cycle, lights on at 7:00 A.M.). All procedures were carried out in accordance to the IIBCE Bioethics Committee's requirements and under the current ethical regulations of the national law on animal experimentation N°18.611. Adequate measures were taken to minimize animals' discomfort or stress, and all efforts were made in order to use the minimal number of animals necessary to produce reliable scientific data.

2.2. Drug and dosage

(+)-MK-801 [dizocilpine (5R,10S)-(1)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo [a,d] cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate] was obtained from Sigma RBI. In all the experiments, MK-801 was administered intraperitoneally (i.p.) at 0.05 mg/kg, a dose below the threshold to produce the typical behavioral motor syndrome of NMDA-R antagonists [30,31]. This low dose was chosen on the basis of previous studies showing an amnesic effect of MK-801 at 0.15 mg/kg [11–13].

2.3. Behavioral measures

Rats were taken to the experimental room in their home cages, identified and weighed one day before the behavioral experiments to allow acclimation to the test environment. The experimental room was under controlled temperature (22 ± 2 °C) and the behavioral testing was conducted using the mEPM learning test [9,15], the classical elevated plus-maze paradigm [32,33] and the open field test, as previously described

[34,35]. All injections were done at a volume of 1 ml/kg and all experiments were performed between 8:00 a.m. and 1:00 pm.

2.3.1. mEPM learning test

Learning/memory function assessment was done using the mEPM learning test, which measures spatial long-term memory [9,15]. Transfer latency (TL, the time at which animals move from the open arm to the closed arm) was used as an index of learning and memory processes. The elevated plus-maze was made of wood and consisted of 2 open arms (50 × 10 cm) surrounded by a short (1 cm) wooden edge to avoid falls, and 2 closed arms (50 × 10 × 40 cm) arranged so that the 2 open arms were opposite each other. The arms were connected by a central platform (10 × 10 cm). The maze was elevated to a height of 50 cm above the floor. To avoid confounding olfactory cues, the maze was cleaned with an alcohol–water solution (30%) after each rat. The mEPM procedure was performed accordingly to previous studies [11–13] with some modifications. Animals were randomly assigned to the different experimental and control groups. Briefly, 30 min after saline or MK-801 (0.05 mg/kg) i.p. injection, rats were placed in the open arm and the time to reach the closed arms was counted in day 1 (TL1, acquisition session) and day 2 without drug injection (TL2, retention session). After entering the closed arm, the rat was allowed to freely move in the maze for 10 s and then returned to the home cage. Rats not entering the closed arm within 90 s were excluded from further experiments. Training (repeated exposure of an animal to the open arms) shortens TL variable as a consequence of learning and memory acquisition and retention. Contrastingly, increments in TL2 variable indicate impairments in animal learning/memory function. In order to evaluate if the NMDA-R antagonist induced a long-lasting effect on transfer latency values, an additional session was recorded on day 3 (TL3). This measure was originally included in the present study since it was not provided by Hlinák and collaborators.

2.3.2. Classical EPM anxiety test (cEPM)

According to previous studies, the administration of MK-801 is expected to induce an amnesic effect which is indicated by an increase in TL2 with respect to control group evaluated in the mEPM learning test. However, this response could be mimicked or confused by a putative anxiolytic response represented by an increase in the time spent on the open arm (see Introduction). In order to discard this hypothesis, an additional study was carried out. Another group of animals was i.p. injected with the NMDA-R antagonist (0.05 mg/kg) or saline on day 1 and 24 h later and the effects on experimental anxiety were evaluated 24 h later, using the same elevated plus-maze apparatus described above. This evaluation time was in accordance with that used to evaluate TL2 in the mEPM learning test. Open and closed entries and time spent in both arms were recorded and expressed as percentage [32,33, 36].

2.3.3. Open field test (OFT)

As MK-801 may alter animal locomotion giving false-positive/negative effects in the mEPM learning test, a monitoring of motor activity was carried out during the first day, 5 min before starting the mEPM learning test. Animal motor activity was automatically assessed in an open field chamber without habituation and beginning 25 min after saline or MK-801 (0.05 mg/kg) i.p. injection. The horizontal motor activity, defined as the total distance traveled in meters (m), was recorded during 5 min using a digital camera associated to a video-tracking Ethovision software 7.0 (Noldus, The Netherlands).

2.4. BDNF measurement

Two different groups of animals were used in order to establish an association between the BDNF protein levels and animal behavior recorded during TL2 and TL3. One group of rats was i.p. injected with the MK-801 (0.05 mg/kg) or saline on day 1. Thirty minutes later,

animal performance at TL1 was recorded in the mEPM (acquisition session). Twenty four hours after the injection of saline or MK-801 and immediately before the retention session (TL2), animals were sacrificed by decapitation and the left and right hippocampi were dissected out. This time corresponded to the evaluation of TL2 (retention session) in the mEPM learning test. The other group was i.p. injected with the MK-801 (0.05 mg/kg) or saline on day 1. Animal performance at TL1 and TL2 was recorded in the mEPM as mentioned before and 48 h after the injection of saline or MK-801 and immediately before the TL3, animals were sacrificed by decapitation and the left and right hippocampi were dissected out. This time corresponded to the evaluation of TL3 in the mEPM learning test.

Hippocampal levels of BDNF were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Tissue samples were homogenized in lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH = 8.0, 137 mM NaCl, 10% of glycerol, 1% of NP40) supplemented with protease inhibitor cocktail (#13743200, Roche, Germany, Roche) and centrifuged at 9000 g for 15 min at 4 °C. The supernatant was collected and BDNF was measured with the BDNF Emax® Immuno Assay System (#G7610, Promega, USA), according to the manufacturer instructions. Data were calculated from the standard curves constructed with purified recombinant human BDNF for each plate and expressed as mean pg BDNF per mg of total protein (as determined from parallel samples). Total protein levels used to normalize BDNF results were measured by the Bicinchoninic Acid Protein Assay (#BCA1, Sigma), following the manufacturer instructions. The results were expressed as percentage of values from vehicle-injected rats included in both group of experiments. In all cases optical densities were determined using a Varioskan Flash, Thermo Scientific plate reader.

2.5. Data analysis

Data are reported as the Mean \pm Standard error of the mean (SEM) and were analyzed by two-way (treatment, time and the interaction between factors) analysis of variance (ANOVA) for repeated measures followed by post-hoc Newman-Keuls multiple comparison test and Student-*t* test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

The administration of MK-801 did neither alter the latency time at day 1 (TL1) nor at day 3 (TL3) in comparison with their respective control group at each day. However, TL2 was significantly increased in rats treated with MK-801 respect to control group (Fig. 1). Two-way ANOVA revealed a significant effect of the treatment [$F_{(1,19)} = 5.94, P < 0.05$], time [$F_{(2,38)} = 31.87, P < 0.001$] and the treatment \times time interaction [$F_{(2,38)} = 6.45, P < 0.01$]. Post-hoc Newman-Keuls test revealed that TL2 was significantly shorter than TL1 ($P < 0.001$) indicating an appropriate cognitive performance of saline-injected animals during the

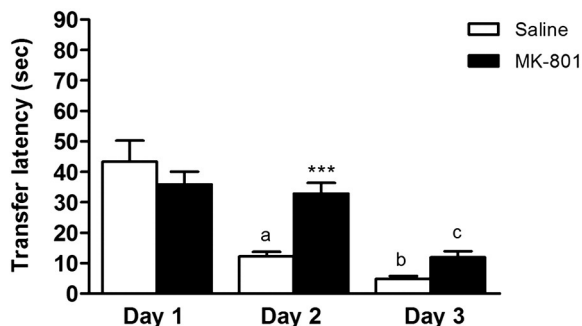


Fig. 1. Effect of MK-801 (0.05 mg/kg) at the TL evaluated in the mEPM during three consecutive days. Control group was injected with saline. Data are expressed as means \pm SEM values. a and b = vs. TL1 of control group; c = vs. TL2 of MK-801-treated group. * = vs. TL2 of control group; a, b *** = $P < 0.001$; c = $P < 0.01$. N = 9–12 per group.

retention session. In contrast, MK-801 administration evoked a significant prolongation of TL2 compared with control group ($P < 0.001$) and even maintained the TL2 value similar to that observed in TL1, indicating an amnesic effect of the NMDA-R antagonist [11–13]. In contrast, MK-801-treated animals seemed to improve its cognitive performance at TL3 since a significant decrease in the transfer latency was observed compared to the respective TL2 ($P < 0.01$). A slight increase in TL3 of MK-801-treated animals was observed compared to the control group, although a statistical significance was not observed. Both results support the idea that MK-801-treated animals recovered their capacity of learning-memory function (Fig. 1).

No significant effect on distance moved was observed in animals treated with MK-801 0.05 mg/kg [$T_{(19)} = 1.99; P = 0.06$] confirming that the selected dose of MK-801 did not alter the locomotion activity of animals (Table 1).

MK-801 did not elicit a significant effect in anxiety-related behaviors evaluated in the cEPM [$T_{(14)} = 0.27; P = 0.79$] and [$T_{(14)} = 0.91; P = 0.38$] for open arm entries and time, respectively; [$T_{(14)} = 0.27; P = 0.79$] and [$T_{(14)} = 0.33; P = 0.74$] for closed arm entries and time, respectively. This result reinforces the amnesic action of the NMDA-R antagonist observed at day 2 in the mEPM learning test (Table 2).

Interestingly, hippocampal BDNF levels of MK-801-treated animals were significantly reduced compared to controls in TL2 [$T_{(13)} = 3.26; P < 0.01$; Fig. 2]. In contrast, a significant increment in comparison with the respective control group [$T_{(12)} = 3.46; P < 0.01$] was observed during TL3 (Fig. 2).

4. Discussion

Our results demonstrated that the systemic administration of MK-801 produced a learning and memory impairment in rats, as judged by the transfer latency in the mEPM learning test. This behavioral alteration was not mimicked by anxiety-related behaviors and it was associated with a decrease in the BDNF levels in the hippocampus, one of the most relevant anatomical regions related to learning and memory functions [19,20]. Moreover, we also showed that the amnesic effect was completely reverted 48 h after the MK-801 injection. This result may explain why a significant recovery of the BDNF protein levels in the hippocampus of MK-801-treated animals at TL3 was observed.

A significant shortening of the transfer latency in saline-treated animals was observed from the acquisition (TL1) to the retention session (TL2) and even to TL3, demonstrating the consolidation of the spatial memory in control animals during the test. However, the administration of MK-801 before the acquisition session prolonged the transfer latency during the retention session (TL2). This prolongation is considered as an index of spatial memory impairment [11–14]. In addition, transfer latencies of MK-801-treated rats did not differ from those of control group measured during the acquisition session, suggesting that short spatial memory was not altered. Instead, the prolongation of TL2 in MK-801-treated animals indicated a disruption in the long-term spatial memory processing. Overall, our results were in accordance with several previous studies that reported a blockage of the recall of memory on the spatial configuration of the maze by MK-801 [9–15] or even using other paradigms [29,37]. Here, a similar amnesic effect was observed after the administration of even a very low dose of MK-801 (0.05 mg/kg). Besides, we demonstrated that this cognitive disability

Table 1
Effects of MK-801 on motor activity in the OFT.

Treatment	Distance moved (m)
Control	18.3 \pm 1.6
Veh + MK-801	22.3 \pm 1.3

Data are expressed as mean values \pm SEM. Locomotion was recorded on the first day of the test (TL1) in saline- or MK-801-treated animals. No significant differences were observed between groups. N = 9–12 per group.

Table 2
Effects of MK-801 on experimental anxiety in the cEPM.

	Open arms		Closed arms	
	% entries	% time	% entries	% time
Control	21.9 ± 3.6	8.7 ± 2.6	78.1 ± 3.6	90.4 ± 2.5
MK-801	20.0 ± 6.5	5.3 ± 2.4	80.0 ± 6.4	91.9 ± 3.5

Data are expressed as mean values ± SEM. Anxiety-related behavior was recorded 24 h after saline or MK-801 injection. No significant differences were observed between groups. N = 7–9 per group.

was not mimicked by an anxiolytic effect induced by MK-801 (evaluated in the second day, TL2) ratifying that mEPM is a suitable paradigm to record learning/memory alterations. Moreover, it could be observed that the assayed treatment did not induce a significant effect on the transfer latency during the first day (TL1) discarding the possibility that any putative anxiolytic effect could alter the animal learning/memory function.

It is well known that NMDA receptors are particularly important in spatial memory [19,38,39] but the accurate mechanism by which NMDA antagonists induce learning/memory impairments remains unknown. A significant decrease in BDNF levels in the hippocampus of MK-801-treated animals was observed at TL2 suggesting a strong interaction between BDNF expression and NMDA receptor blockade, specifically in the hippocampus, which would underlie the amnesic response. Interestingly, this change in BDNF was reversible since a significant increase of BDNF levels was observed during TL3. Our behavioral results showed that the amnesic effect was evident one day but not 2 days post-training (TL2 and TL3 respectively) indicating that the cognitive alteration induced by MK-801 occurs within the first 24 h but not at a longer time (48 h). It can be assumed that this behavioral profile is associated with the observed BDNF protein levels.

It was previously reported that MK-801 is able to reduce the hippocampal expression of BDNF after its systemic administration [27,40] but this biochemical change has not been related before to the amnesic effect evaluated in the mEPM learning test. Our results contradict other studies which did not find any change in BDNF expression in hippocampus after acute administration of NMDA antagonists [29,41]. Technical differences in measuring hippocampal BDNF levels or even in the MK-801 doses used could explain this discrepancy.

Although the molecular events are not entirely unraveled, learning itself has been shown markedly associated with an increase in hippocampal BDNF levels [39,42–44]. Therefore, after the acquisition session, an induction of BDNF expression may initiate a cascade of molecular and cellular events (e.g. modulation of gene expression via the induction of

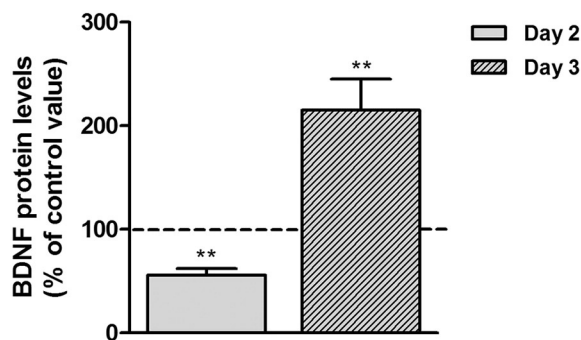


Fig. 2. BDNF levels in the hippocampus of rats treated with MK-801 (0.05 mg/kg) 24 and 48 h after injection. Data are shown as percent change in relation to the respective control group ± SEM. The absolute values (Mean ± SEM) of control and treated animals, respectively, were as follows. BDNF levels corresponding to TL2: 100.2 ± 14.1 vs. 47.8 ± 8.1 of control vs. MK-801, respectively; BDNF levels corresponding to TL3: 99.99 ± 14.47 vs. 215.2 ± 29.95 of control vs. MK-801, respectively. * = denotes MK-801-pretreated groups from TL2 and TL3 that differed significantly from each control group. Student t-test, ** = $P < 0.01$. N = 7–8 per group.

IEGs and late-response genes) that leads to the necessary synaptic remodeling that occurs in a correct learning and memory process as evidenced during the retention session (TL2). It is likely that the NMDA receptor blockade by MK-801 would interfere with these events triggered by BDNF. BDNF expression requires neuronal activity and Ca^{2+} influx through NMDA receptors, a condition that would be blocked by the presence of the NMDA antagonist [39,45–47]. At TL3, when it is highly possible that the NMDA antagonist is cleared, the animal cognitive performance was recovered and the BDNF levels were increased suggesting a restoration of the animal cognitive function. Further experiments should be performed to investigate the mechanisms underlying both phenomena. Since the alteration in BDNF expression has been related with schizophrenia pathology [48–50], it could be interesting to investigate whether this molecular parameter has a role in the atypical antipsychotics action (e.g. Clozapine) as a common mechanism to improve cognitive function.

5. Conclusions

We demonstrated that the systemic administration of MK-801 elicited an amnesic effect in rats evaluated in the mEPM learning test. This behavioral alteration was not mimicked by anxiety-related behaviors and it was associated with a decrease in the BDNF protein levels in the hippocampus. Specifically, the amnesic effect was reversible since it lasted no longer than 24 h. This is the first study that explores the effect of MK-801 on cognitive function in this paradigm establishing a biochemical association with BDNF levels in the hippocampus. Our results support the predictive validity of MK-801-induced memory impairment in the modified elevated plus maze as a preclinical model for CIAS by investigating different compounds that have been tested in humans such as antipsychotic drugs and/or novel antipsychotic drugs and their mechanisms of action.

Acknowledgments

This study was fully supported by Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA-Uruguay) and partially by Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII-Uruguay). We are grateful to Giselle Prunell and Patricia Lagos for the technical support.

References

- [1] D.C. Javitt, S.R. Zukin, Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia, *Am. J. Psychiatry* 148 (1991) 1301–1308.
- [2] J.H. Krystal, D.C. D'Souza, I.L. Petrakis, A. Belger, R.M. Berman, D.S. Charney, et al., NMDA agonists and antagonists as probes of glutamatergic dysfunction and pharmacotherapies in neuropsychiatric disorders, *Harv. Rev. Psychiatry* 7 (1999) 125–143.
- [3] A.C. Lahti, A.W. Martin, T. Michaelidis, A. Parwani, C.A. Tamminga, Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers, *Neuropsychopharmacology* 25 (2001) 455–467.
- [4] J. Frohlich, J.D. Van Horn, Reviewing the ketamine model for schizophrenia, *J. Psychopharmacol.* 28 (2014) 287–302.
- [5] M.A. Geyer, B. Ellenbroek, Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27 (2003) 1071–1079.
- [6] J. Addington, D. Addington, Neurocognitive and social functioning in schizophrenia, *Schizophr. Bull.* 25 (1999) 173–182.
- [7] C. Wass, T. Archer, E. Pålsson, K. Fejgin, A. Alexandersson, D. Klamer, et al., Phencyclidine affects memory in a nitric oxide-dependent manner: working and reference memory, *Behav. Brain Res.* 174 (2006) 49–55.
- [8] M. Didriksen, T. Skarsfeldt, J. Arnt, Reversal of PCP-induced learning and memory deficits in the Morris' water maze by sertindole and other antipsychotics, *Psychopharmacology (Berl)* 193 (2007) 225–233.
- [9] D.S. Reddy, S.K. Kulkarni, Possible role of nitric oxide in the nootropic and anti-amnesic effects of neurosteroids on aging- and dizocilpine-induced learning impairment, *Brain Res.* 799 (1998) 215–229.
- [10] I. Ninan, S.K. Kulkarni, Effect of olanzapine on behavioural changes induced by FG 7142 and dizocilpine on active avoidance and plus maze tasks, *Brain Res.* 830 (1999) 337–344.
- [11] Z. Hlinák, I. Krejčí, Concurrent administration of subeffective doses of scopolamine and MK-801 produces a short-term amnesia for the elevated plus-maze in mice, *Behav. Brain Res.* 91 (1998) 83–89.

- [12] Z. Hlinák, I. Krejčí, Oxiracetam prevents the MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice, *Behav. Brain Res.* 117 (2000) 147–151.
- [13] Z. Hlinák, I. Krejčí, MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice, *Behav. Brain Res.* 131 (2002) 221–225.
- [14] Z. Hlinák, I. Krejčí, N-methyl-D-aspartate prevented memory deficits induced by MK-801 in mice, *Physiol. Res.* 52 (2003) 809–812.
- [15] I.K. Celikyurt, F.Y. Akar, G. Ullak, O. Mutlu, F. Erden, Effects of risperidone on learning and memory in naive and MK-801-treated rats, *Pharmacology* 87 (2011) 187–194.
- [16] M.R. Zarrindast, M. Nasehi, M. Piri, N. Heidari, Effects of cholinergic system of dorsal hippocampus of rats on MK-801 induced anxiolytic-like behavior, *Neurosci. Lett.* 505 (2011) 65–70.
- [17] S. Kocahan, K. Akillioglu, Effects of NMDA receptor blockade during the early development period on the retest performance of adult Wistar rats in the elevated plus maze, *Neurochem. Res.* 38 (2013) 1496–1500.
- [18] M.H. Naseri, S. Hesami-Tackallou, M. Torabi-Nami, M.R. Zarrindast, M. Nasehi, Involvement of the CA1 GABAA receptors in MK-801-induced anxiolytic-like effects: an isobologram analysis, *Behav. Pharmacol.* 25 (2014) 197–205.
- [19] I. Izquierdo, J. Medina, Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures, *Neurobiol. Learn. Mem.* 68 (1997) 285–316.
- [20] W.J. Tyler, M. Alonso, C.R. Bramham, L.D. Pozzo-Miller, From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning, *Learn. Mem.* 9 (2002) 224–237.
- [21] Y. Lu, K. Christian, B. Lu, BDNF: a key regulator of protein synthesis dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol. Learn. Mem.* 89 (2008) 312–323.
- [22] P. Bekinschtein, M. Cammarota, J.H. Medina, BDNF and memory processing, *Neuropharmacology* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.04.024>.
- [23] K. Yamada, T. Nabeshima, Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes, *J. Pharmacol. Sci.* 91 (2003) 267–270.
- [24] M. Korte, P. Carroll, E. Wolf, G. Brem, H. Thoenen, T. Bonhoeffer, Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 8856–8860.
- [25] S.L. Patterson, T. Abel, T.A. Deuel, K.C. Martin, J.C. Rose, E.R. Kandel, Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice, *Neuron* 16 (1996) 1137–1145.
- [26] S.A. Heldt, L. Stanek, J.P. Chhatwal, K.J. Ressler, Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories, *Mol. Psychiatry* 12 (2007) 656–670.
- [27] F. Fumagalli, R. Molteni, M. Roceri, F. Bedogni, R. Santero, C. Fossati, et al., Effect of antipsychotic drugs on brain-derived neurotrophic factor expression under reduced N-methyl-D-aspartate receptor activity, *J. Neurosci. Res.* 72 (2003) 622–628.
- [28] F. Fumagalli, R. Molteni, F. Bedogni, M. Gennarelli, J. Perez, G. Racagni, M.A. Riva, Quetiapine regulates FGF⁻² and BDNF expression in the hippocampus of animals treated with MK-801, *Neuroreport* 15 (2004) 2109–2112.
- [29] A. Ertugrul, H. Ozdemir, A. Vural, T. Dalkara, H.Y. Meltzer, E. Saka, The influence of N-desmethylclozapine and clozapine on recognition memory and BDNF expression in hippocampus, *Brain Res. Bull.* 84 (2011) 144–150.
- [30] P. Andiné, N. Widermark, R. Axelsson, G. Nyberg, U. Olofsson, E. Mårtensson, et al., Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290 (1999) 1393–1408.
- [31] M.C. Scorza, A. Castañé, A. Bortolozzi, F. Artigas, Clozapine does not require 5-HT_{1A} receptors to block the locomotor hyperactivity induced by MK-801: Cl_z and MK-801 in KO_{1A} mice, *Neuropharmacol* 59 (2010) 112–120.
- [32] S. Pellow, P. Chopin, S.E. File, M. Briley, Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat, *J. Neurosci. Methods* 14 (1985) 149–167.
- [33] S.E. File, The biological basis of anxiety, in: H.Y. Meltzer, D. Nerozzi (Eds.), *Current practices and future developments in the pharmacotherapy of mental disorders*, Excerpta Medica, Amsterdam 1991, pp. 159–166.
- [34] M.C. Scorza, M.N. Meikle, X.L. Hill, A. Richeri, D. Lorenzo, F. Artigas, Prefrontal cortex lesions cause only minor effects on the hyperlocomotion induced by MK-801 and its reversal by clozapine, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 11 (2008) 519–532.
- [35] X. López Hill, M.C. Scorza, Role of the anterior thalamic nucleus in the motor hyperactivity induced by systemic MK-801 administration in rats, *Neuropharmacology* 62 (2012) 2440–2446.
- [36] M.C. Scorza, M. Reyes-Parada, R. Silveira, H. Viola, J.H. Medina, M.B. Viana, et al., Behavioral effects of the putative anxiolytic (+/–)-1-(2,5-dimethoxy-4-ethylthiophenyl)-2-aminopropane (ALEPH-2) in rats and mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54 (1996) 355–361.
- [37] J.W. Brown, L.E. Rueter, M. Zhang, Predictive validity of a MK-801-induced cognitive impairment model in mice: implications on the potential limitations and challenges of modeling cognitive impairment associated with schizophrenia preclinically, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 49 (2014) 53–62.
- [38] Morris RGM, Davis M. The role of NMDA receptors in learning and memory. In: Collingridge GL, Watkins JC, editors. *The NMDA receptor*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press 1994; p. 340–375.
- [39] A.L. Carvalho, M.V. Caldeira, S.D. Santos, C.B. Duarte, Role of the brain-derived neurotrophic factor at glutamatergic synapses, *Br. J. Pharmacol.* 153 (2008) S310–S324.
- [40] S. Snigdha, J.C. Neill, S.L. McLean, G.K. Shemar, L. Cruise, M. Shahid, et al., Phencyclidine (PCP)-induced disruption in cognitive performance is gender-specific and associated with a reduction in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in specific regions of the female rat brain, *J. Mol. Neurosci.* 43 (2011) 337–345.
- [41] J. Semba, M. Wakuta, T. Suhara, Different effects of chronic phencyclidine on brain-derived neurotrophic factor in neonatal and adult rat brains, *Addict. Biol.* 11 (2006) 126–130.
- [42] J.P. Kesslak, V. So, J. Choi, C.W. Cotman, F. Gomez-Pinilla, Learning upregulates brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid: a mechanism to facilitate encoding and circuit maintenance? *Behav. Neurosci.* 112 (1998) 1012–1019.
- [43] J. Hall, K.L. Thomas, B.J. Everitt, Rapid and selective induction of BDNF expression in the hippocampus during contextual learning, *Nat. Neurosci.* 3 (2000) 533–535.
- [44] F. Zheng, X. Zhou, C. Moon, H. Wang, Regulation of brain-derived neurotrophic factor expression in neurons, *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 4 (2012) 188–200.
- [45] A.K. McAllister, L.C. Katz, D.C. Lo, Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity, *Neuron* 17 (1996) 1057–1064.
- [46] L.P. Wollmuth, B. Sakmann, Different mechanisms of Ca²⁺ transport in NMDA and Ca²⁺-permeable AMPA glutamate receptor channels, *J. Gen. Physiol.* 112 (1998) 623–636.
- [47] B. Lu, BDNF and activity-dependent synaptic modulation, *Learn. Mem.* 10 (2003) 86–98.
- [48] N. Durany, T. Michel, R. Zochling, K.W. Boissl, F.F. Cruz-Sanchez, P. Riederer, et al., Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 in schizophrenic psychoses, *Schizophr. Res.* 52 (2001) 79–86.
- [49] K. Toyooka, K. Asama, Y. Watanabe, T. Muratake, M. Takahashi, T. Someya, et al., Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients, *Psychiatry Res.* 110 (2002) 249–257.
- [50] J. Kesslak, K. Chuang, N. Berchtolf, Spatial learning is delayed and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression inhibited by administration of MK-801 in rats, *Neurosci. Lett.* 353 (2003) 95–98.



Clozapine blockade of MK-801-induced learning/memory impairment in the mEPM: Role of 5-HT_{1A} receptors and hippocampal BDNF levels



Ximena López Hill^a, Analía Richeri^b, María Cecilia Scorza^{a,*}

^a Department of Experimental Neuropharmacology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay

^b Laboratory of Cell Biology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:

NMDA receptor antagonist
5-HT_{1A} receptor
Cognition
WAY-100635
Clozapine
BDNF

ABSTRACT

Cognitive impairment associated with schizophrenia (CIAS) is highly prevalent and affects the overall functioning of patients. Clozapine (Clz), an atypical antipsychotic drug, significantly improves CIAS although the underlying mechanisms remain under study. The role of the 5-HT_{1A} receptor (5-HT_{1A}-R) in the ability of Clz to prevent the learning/memory impairment induced by MK-801 was investigated using the modified elevated plus-maze (mEPM) considering the Transfer latency (TL) as an index of spatial memory. We also investigated if changes in hippocampal brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels underlie the behavioral prevention induced by Clz.

Clz (0.5 and 1 mg/kg)- or vehicle-pretreated Wistar rats were injected with MK-801 (0.05 mg/kg) or saline. TL was evaluated 35 min later (TL1, acquisition session) while learning/memory performance was measured 24 h (TL2, retention session) and 48 h later (TL3, long-lasting effect). WAY-100635, a 5-HT_{1A}-R antagonist, was pre-injected (0.3 mg/kg) to examine the presumed 5-HT_{1A}-R involvement in Clz action. At TL2, another experimental group treated with Clz and MK-801 and its respective control groups were added to measure BDNF protein levels by ELISA.

TL1 and TL3 were not significantly modified by the different treatments. MK-801 increased TL2 compared to control group leading a disruption of spatial memory processing which was markedly attenuated by Clz. WAY-100635 suppressed this action supporting a relevant role of 5-HT_{1A}-R in the Clz mechanism of action to improve spatial memory dysfunction. Although a significant decrease of hippocampal BDNF levels underlies the learning/memory impairment induced by MK-801, this effect was not significantly prevented by Clz.

1. Introduction

Positive symptoms are considered the primary target in the treatment of schizophrenia. However, schizophrenia is also associated with negative symptoms and cognitive dysfunction, which are very poorly treated by antipsychotic drugs [1,2]. Attention, working memory and long-term memory dysfunctions are the most common cognitive impairments associated with schizophrenia (CIAS) [3]. CIAS can significantly decrease the patient's life quality, so effective treatments may substantially impact the patient's general functioning [4].

Although it is frequently assumed that atypical antipsychotics therapy (e.g. clozapine, ziprasidone, quetiapine and olanzapine) is superior over to classical antipsychotics (e.g. haloperidol) for enhancing cognition [5–8], the neural mechanisms involved have not been fully elucidated yet. Moreover, some clinical studies have not shown significant differences between first- and second-generation psychotropic drugs in the improvement of cognitive deficits [9,10]. Varying effects

on normal cognitive functions have been observed when atypical antipsychotics were used in preclinical cognitive tests. In some cases, antipsychotics disturbed cognitive functions, whereas these agents produced no effect in other studies [11–13]. The necessity of new drugs and pharmacological strategies for treating CIAS is still a major goal.

Several serotonin (5-HT) receptors are targeted by atypical antipsychotic drugs [14–16]. Among the various 5-HT receptors involved in cognitive functions, 5-HT_{1A} receptors (5-HT_{1A}-Rs) are of special interest because they are abundant in brain areas associated with cognitive functions, such as the cerebral cortex, hippocampus and septum [17–19]. Indeed, there are several pieces of evidence proposing these molecular sites therapeutically relevant to improve CIAS [20–23].

Clozapine (Clz), the gold standard among atypical antipsychotics, interacts with multiple receptors showing higher affinity for serotonergic 5-HT_{2A} than for dopaminergic D2 receptors. Additionally, Clz acts as a weak partial agonist at 5-HT_{1A}-Rs [14,16,24]. Even modest 5-HT_{1A}-Rs activation, it was demonstrated that Clz increases prefrontal

* Corresponding author.

E-mail address: cscorza@iibce.edu.uy (M.C. Scorza).

cortex (PFC) dopamine (DA) release, via 5-HT_{1A}-Rs but not 5-HT_{2A}-Rs [25–29]. Indeed, this neurochemical capacity has been attributed to its superior clinical efficacy in the treatment of negative and cognitive symptoms [26,28,30–33]. Interestingly, it was demonstrated that 5-HT_{1A}-Rs, but not 5-HT_{2A}-Rs, are required for the reversal of phencyclidine (non-competitive NMDA-R antagonist) effect by Clz on slow cortical oscillations in PFC [34]. Moreover, Clz was able to inhibit the motor hyperactivity induced by MK-801 equally in wild-type and 5-HT_{1A}-R knock-out mice, indicating that Clz ability to block this behavioral effect (thought to underlie positive symptoms) did not depend on 5-HT_{1A}-R activation [35].

Non-competitive NMDA receptors (NMDA-Rs) antagonists are used as pharmacological models of schizophrenia due to their ability to evoke schizophrenia symptoms as well as cognitive dysfunction [36–38]. NMDA-Rs antagonists also disturb learning and memory functions in animals. Actually, they are widely used as animal models of CIAS [39,40]. In a previous study we demonstrated that the acute administration of MK-801, the most potent non-competitive NMDA-Rs antagonist, induced a learning/memory impairment evaluated in the modified elevated plus maze (mEPM), an effect that was directly associated to a low level of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the hippocampus [41]. Therefore, we proposed the predictive validity of MK-801-induced learning/memory impairment in the mEPM as a preclinical model to study CIAS and putative treatments [41]. Indeed, some studies have already investigated the antipsychotic action on the impairment of cognitive function induced by MK-801 using the mEPM [42–44]. However, the effect of Clz on MK-801-induced learning/memory impairment and the study of its mechanism of action was not investigated so far using the mEPM paradigm.

The present paper was designed to investigate whether 5-HT_{1A}-Rs participate in the ability of Clz to antagonize a learning/memory deficit induced by MK-801 in rats using the mEPM paradigm. Given that the alteration in BDNF expression has been related to learning and memory processes [45–47] and schizophrenia [48], the role of this molecular parameter was also studied underlying the Clz action as a common mechanism to improve cognitive function.

2. Methods and materials

2.1. Animals

One hundred and two adult male Wistar rats weighing 260–320 g, bred in the IIBCE animal facilities (Montevideo) were employed in the study. The animals were housed in groups of 6 in plastic cages (50 × 37.5 × 21 cm) with food and water available ad libitum and kept under controlled conditions (temperature 22 ± 2 °C, 12-h light-dark cycle, lights on at 7:00 A.M.). All procedures were carried out in accordance to the IIBCE Bioethics Committee's requirements (followed the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals; NIH Publications No. 8023, revised 1978) and under the current ethical regulations of the national law on animal experimentation N°18.611. Adequate measures were taken to minimize discomfort or stress of the animals, and all efforts were made to use the minimal number of animals necessary to produce reliable scientific data.

2.2. Drugs

(+)-MK-801 [dizocilpine (5R,10S)-(1)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo [a,d] cyclohepten-5,10-imine hydrogen maleate] and WAY-100635 were obtained from Sigma RBI and Clozapine from Tocris. MK-801 and WAY-100635 were dissolved in saline; clozapine was dissolved in a minimal volume of HCl 0.1 M, and diluted with saline (pH-adjusted to 5–6 with NaOH). Aliquots were prepared and stored at –20 °C. Clozapine vehicle was also stored at –20 °C. Drugs were injected intraperitoneally (i.p.) or subcutaneously (s.c.) and control groups

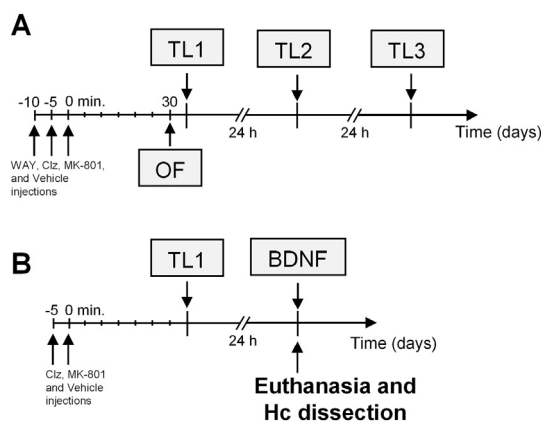


Fig. 1. Experimental protocols: In A learning/memory function was assessed in the mEPM paradigm considering the transfer latency (TL) as an index of spatial memory. Drugs or corresponding vehicles were administrated 40, 35 and 30 min prior to locomotor activity assessment (5 min) in the Open Field (OF). Immediately acquisition session was performed, where TL1 was recorded. Twenty four and 48 h later TL2 and TL3 respectively, were registered. In B an independent group of rats was used to measure BDNF protein levels associated to Clz prevention of the amnesic effect induced by MK-801 evaluated in mEPM. Drugs or corresponding vehicles were administrated 40 and 35 min prior TL1 recording. Twenty four h later animals were euthanatized for hippocampus (Hc) dissection.

received the corresponding saline or vehicle injection.

2.3. Experimental procedures

Rats were brought in their home cages to the experimental room, identified and weighed one day before the behavioral experiments to allow acclimation to the test environment. The experimental room was under controlled temperature (22 ± 2 °C) and the behavioral testing was conducted using the mEPM learning test [41,49] and the open-field (OF) test, as previously described [41,50,51].

2.3.1. mEPM learning test

Learning/memory function assessment was done using the mEPM learning test, which measures spatial long-term memory [41,49]. Transfer Latency (TL, the time at which animals move from the open arm to the closed arm) was used as an index of learning and memory processes (Fig. 1A). The mEPM procedure was performed accordingly to previous studies with modifications [41]. Animals were randomly assigned to the different experimental and control groups. Briefly, rats were placed in the open arm and the time to reach the closed arms was counted in day 1 (TL1, acquisition session), day 2 (TL2, retention session) and day 3 (TL3, long-lasting effect) [41]. After entering the closed arm, the rat was allowed to freely move in the maze for 10 s and then returned to the home cage. Rats not entering the closed arm within 90 s were excluded from further experiments. Training (repeated exposure of an animal to the open arms) shortens TL2 variable as a consequence of learning acquisition and retention or consolidation of memory [44,52].

2.3.2. Open field test

Since the compounds assayed may alter animal locomotion or experimental anxiety and give false-positive/negative effects in the mEPM learning test, a monitoring of locomotor activity and the time spent in center and periphery zones of an open field (OF) chamber was carried out during the first day, 5 min before starting the mEPM learning test. Animal activity was automatically assessed in the OF without habituation and beginning 30 min after saline or the last drug injection in each experimental group (see the following item; Fig. 1A). The horizontal locomotor activity, defined as the total distance travelled in meters (m), and the time spent in center and periphery zones (in seconds) were automatically recorded by a camera connected to a

computer equipped with the video-tracking Ethovision software 7.0 (Noldus, The Netherlands).

2.4. Dosage and experimental groups

MK-801 was administered i.p. at 0.05 mg/kg, a dose below the threshold to produce the typical behavioral syndrome of NMDA antagonists [35,51,53]. This low dose was chosen on the basis of the results obtained in our previous work in which memory deterioration in the retention session of the mEPM (amnesic effect) was induced by this dose of MK-801 [41]. Besides, a cognitive deficit and the lack of a significant effect on rat locomotion induced by MK-801 at 0.1 mg/kg were observed in previous studies [43,49,50]. Clz was injected at 0.5 and 1 mg/kg, s.c., taking into account that the last dose had been used to block the behavioral responses of MK-801 [35,50]. The selective 5-HT_{1A}-R antagonist WAY-100635 [54] was assayed at 0.3 and 1 mg/kg, i.p., which blocks 5-HT_{1A}-Rs and prevents behavioral effects of 5-HT_{1A}-Rs agonists [55–58]. In experiments designed to assess the Clz ability to block MK-801 actions, Clz (0.5 and 1) or vehicle was administered in other two groups of animals 5 min before MK-801 or saline. Another group of animals was used in experiments to study the role of 5-HT_{1A}-Rs in Clz action; the same schedule was used but WAY-100635 (0.3) or saline was injected 5 min before Clz (1) or vehicle. Behavioral assessment started 30 min after MK-801 injection (Fig. 1A).

Drugs were administered at an injection volume of 1 ml/kg. During all experiments the elevated plus maze and of were cleaned with alcohol 30% before placing the following rat. All experiments were performed between 8:00 and 13:00 h.

2.5. BDNF measurement

A different group of animals was used to establish an association between the BDNF protein levels and the prevention by Clz of the amnesic effect induced by MK-801 evaluated in TL2. Rats were i.p. injected with the MK-801 (0.05 mg/kg), Clz (1), Clz (1) + MK-801 (0.05) or saline on day 1. Thirty minutes later, animal performance at TL1 was recorded in the mEPM (acquisition session). Twenty-four hours after the injection of drugs or saline and immediately before the retention session, animals were sacrificed by decapitation and the left and right hippocampi were dissected out (Fig. 1B). This time corresponded to the evaluation of TL2 in the mEPM learning test. Hippocampal levels of BDNF were measured using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as previously reported [41].

2.6. Data analysis

Data are reported as the mean \pm standard error of the mean (SEM) and were analyzed by one (treatment), two-way (treatment, time and the interaction between factors) analysis of variance (ANOVA) for independent or repeated measures, followed by post-hoc Duncan's multiple comparison test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Clozapine antagonism of the amnesic effect induced by MK-801 evaluated in the mEPM

The administration of a very low dose of MK-801 (0.05), Clz (0.5 and 1) or its combination did not alter the latency time at day 1 (TL1) or day 3 (TL3) in comparison with the control group. However, TL2 was significantly increased in rats treated with MK-801 respect the control group and this effect was markedly attenuated by both pre-injected doses of Clz (Fig. 2).

Two-way ANOVA revealed a significant effect of the treatment [$F_{(5,39)} = 3.54$, $P < 0.01$], time [$F_{(2,78)} = 50.73$, $P < 0.001$] and the treatment \times time interaction [$F_{(10,78)} = 2.38$, $P < 0.05$]. Post hoc test

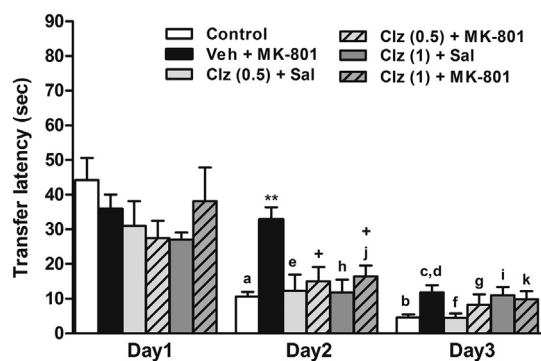


Fig. 2. Effect of MK-801 0.05 mg/kg, Clz 0.5 and 1 mg/kg and each combination of Clz and MK-801 on the transfer latency (TL) evaluated in the mEPM during three consecutive days. Data are expressed as means \pm SEM values. a–k denote comparisons of each experimental group along the three assayed days (TL1, TL2 and TL3). *, + denote the comparison respect to control group and MK-801-treated group, respectively, in the corresponding day. a = TL2 vs. TL1 of control group; b = TL3 vs. TL1 of control group; c = TL3 vs. TL1 of MK-801-treated group; d = TL3 vs. TL2 of MK-801-treated group; e = TL2 vs. TL1 of Clz (0.5)-treated group; f = TL3 vs. TL1 of Clz (0.5)-treated group; g = TL3 vs. TL1 of Clz (0.5) + MK-801-treated group; h = TL2 vs. TL1 of Clz (1)-treated group; i = TL3 vs. TL1 of Clz (1)-treated group; j = TL2 vs. TL1 Clz (1) + MK-801-treated group; k = TL3 vs. TL1 Clz (1) + MK-801-treated group. No statistical significances were observed between TL2 vs. TL3 of control group and TL1 vs. TL2 of MK-801-treated animals. ** = $P < 0.01$. + = $P < 0.05$. a, b, f, k = $P < 0.001$; c, d, e, j = $P < 0.01$; g, h, i = $P < 0.05$. N = 5–12 per group.

revealed that TL2 and TL3 of the control group were significantly shorter than TL1 ($P < 0.001$; Fig. 2) indicating an appropriate cognitive performance of control animals during the retention session. Contrastingly, MK-801 administration evoked a significant prolongation of TL2 compared with the control group ($P < 0.01$) and even maintained the TL2 value similar to that observed in TL1. This behavioral response matches with an amnesic effect described for MK-801 [41,43,49] which did not exceed 24 h since the MK-801-treated animals showed a significant reduction in TL3 compared to TL2 and also to TL1 ($P < 0.01$ in both cases). A correct learning performance was reached by Clz (0.5 and 1)-treated animals since the TL2 was significantly decreased in both groups respect to TL1 ($P < 0.01$ for Clz 0.5 and $P < 0.05$ for Clz 1). Moreover, no statistical significance was observed between both Clz-treated groups and the respective control group of each day. Interestingly, both doses of the antipsychotic significantly prevented the increase in TL2 elicited by MK-801 ($P < 0.05$ for Clz 0.5 and 1; Fig. 2). Only Clz (1) + MK-801-treated group has demonstrated a correct learning performance since a significant decrease has been observed between TL2 and TL1 ($P < 0.01$). Consequently, we selected the high dose of Clz to continue studying the underlying mechanism of action. This strategy could compensate for the weak affinity of Clz to 5-HT_{1A}-Rs.

3.2. Effect of WAY-10635 pre-treatment on the Clz antagonism of the amnesic effect induced by MK-801 evaluated in the mEPM

Table 1 shows the results obtained after a dose-response curve of the effect of WAY-100635 on TL1 to TL3. WAY-100635 did not alter the transfer latency during day 1. However, the high dose of the antagonist seemed to induce an impairment on the cognitive function during TL2 while no effect was evidenced after the administration of a low dose. Two-way ANOVA revealed only a significant effect of time [$F_{(2,42)} = 36.18$, $P < 0.001$]. Post-hoc analysis showed that the control group showed a significant difference in TL2 and TL3 ($P < 0.001$ each) vs. TL1, indicating a correct task learning of saline-injected animals. Rats treated with the low dose of WAY-100635 (0.3 mg/kg) showed a significant reduction of TL2 and TL3 respect to TL1 and ($P < 0.01$ each) suggesting that the low dose of WAY-100635 did not induce any cognitive impairment in animals. Although the high dose of

Table 1
Effect of WAY-100635 on the transfer latency (TL) in the mEPM test.

Treatment	Transfer latency (s)		
	Day 1	Day 2	Day 3
Control	44.2 ± 6.4	10.7 ± 1.3 ^a	4.6 ± 0.8 ^b
WAY-100635 (0.3)	33.0 ± 7.0	11.8 ± 2.5 ^c	7.2 ± 1.6 ^d
WAY-100635 (1)	42.4 ± 8.1	26.8 ± 6.2 ^c	10.3 ± 2.8 ^{e,f}

Data are expressed as mean values ± SEM. a–g denote comparisons of each experimental group along the three assayed days (TL1, TL2 and TL3). a, b, f = P < 0.001; c, d = P < 0.01; e, g = P < 0.05. N = 7–9 per group.

^a TL2 vs. TL1 of control group.

^b TL3 vs. TL1 of control group.

^c TL2 vs. TL1 WAY (0.3)-treated group.

^d TL3 vs. TL1 WAY (0.3)-treated group.

^e TL2 vs. TL1 WAY (1)-treated group.

^f TL3 vs. TL1 of WAY (1)-treated group.

^g TL3 vs. TL2 of WAY (1)-treated group.

WAY-100635 induced a temporal reduction from TL1 to TL2 and TL3 (P < 0.05 and P < 0.001, respectively), it seemed to impair the animal cognitive function since TL2 was greater than that in control rats (Table 1). We therefore selected the low dose of WAY-100635 (0.3) to examine the putative involvement of 5-HT_{1A}-Rs in the mechanism of action of Clz to block the amnesic effect induced by MK-801.

Fig. 3 shows the prevention induced by the presence of WAY-100635 (0.3) of the behavioral response in Clz plus MK-801-pretreated animals on the transfer latency along the three experimental days. As it was previously observed, MK-801 induced a significantly increase in TL2 respect to control group indicating an amnesic effect (P < 0.001). Interestingly, WAY-100635 (0.3) fully hampered the blockade of this effect by Clz (1). Two-way ANOVA revealed a significant effect for treatment [F_(2,28) = 3.71, P < 0.05], for time [F_(2,56) = 39.10, P < 0.001] and the interaction [F_(4,56) = 5.83, P < 0.01]. Post-hoc analysis revealed that neither treatment altered the transfer latency on day 1 (Fig. 3). The control group showed a significant reduction in TL2 and TL3 values vs. TL1 (P < 0.001 for both cases) whereas TL2 of rats treated with WAY (0.3) + Clz (1) + MK-801 was significantly higher than in controls (P < 0.001) and similar to the value in the MK-801-treated group. Both MK-801 and WAY (0.3) + Clz (1) + MK-801-treated animals showed a significant reduction in TL3 compared with the respective TL2 (P < 0.001 for MK-801 and P < 0.05 for WAY + Clz + MK-801).

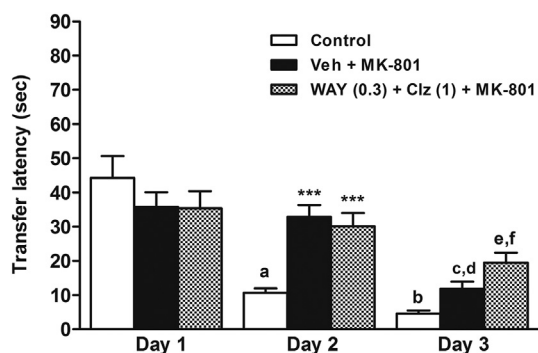


Fig. 3. Effect of co-administration of WAY-100635 (0.3 mg/kg), MK-801 (0.05 mg/kg) and Clz (1 mg/kg) on the transfer latency (TL) evaluated in the mEPM during three consecutive days. Data are expressed as means ± SEM values. a–f denote comparisons of each experimental group along the three assayed days (TL1, TL2 and TL3). * = denote the comparison respect to control group in the corresponding day. a = TL2 vs. TL1 of control group; b = TL3 vs. TL1 of control group; c = TL3 vs. TL1 of MK-801 treated-group; d = TL3 vs. TL2 of MK-801 treated-group; e = TL3 vs. TL1 of WAY + Clz + MK-801-treated group; f = TL3 vs. TL2 of WAY + Clz + MK-801-treated group. *** = P < 0.001; a–d = P < 0.001; e = P < 0.01; f = P < 0.001. N = 9–12 per group.

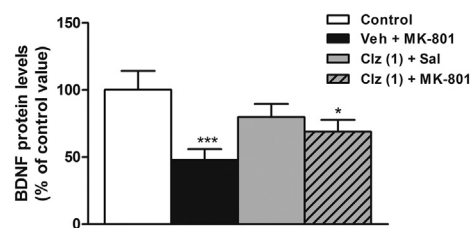


Fig. 4. BDNF levels in the hippocampus of rats treated with MK-801 (0.05 mg/kg) 24 h after injection. Data are shown as percent change in relation to control group ± SEM. The absolute values (mean ± SEM) of control and treated animals were as follows: 100.2 ± 14.1 control; 79.9 ± 9.8 Clz; 47.8 ± 8.1 MK-801; 68.9 ± 8.7 Clz + MK-801. * = denotes MK-801-pretreated group from LT2 that differed significantly from control group. * = P < 0.05; *** = P < 0.001. N = 7–9 per group.

3.3. Hippocampal BDNF levels on the Clz antagonism of the amnesic effect induced by MK-801 evaluated during TL2

One-way ANOVA revealed a significant effect of treatment [F_(3,28) = 4.39, P < 0.05], while the post-hoc comparison showed that, as expected according with our previous work [41], hippocampal BDNF levels of MK-801-treated animals were significantly reduced compared to controls (P < 0.001). In contrast, Clz treatment did not per se modify BDNF levels. Although BDNF levels in Clz (1) + MK-801-treated animals tended to increase in comparison with MK-801-treated animals this change did not reach control values (P < 0.05; Fig. 4). It is worth mentioning that no changes were observed in TL1 from the experimental group used to measure BDNF (data not shown) ensuring that the cognitive performance during acquisition session was similar to that in the former experiment (TL1; Fig. 2).

3.4. Effect of the different drugs on animal motor activity and anxiety behavior evaluated in the OF test

To analyze the motor activity and anxiety behavior in the open field, a one-way ANOVA followed by Duncan post-hoc was conducted on day 1. For distance moved, significant differences between groups occurred [F_(8,59) = 4.39, P < 0.001] while the post-hoc analysis showed that none of the treatments significantly changed the motor activity compared to the control group. One-way ANOVA analysis of anxiety parameters revealed significant differences between experimental groups for time spent in periphery [F_(8,59) = 3.18, P < 0.01] but not for time spent in center zone [F_(8,59) = 1.82, P = 0.09]. Moreover, post-hoc analysis for the time spent in periphery zone did not show significant differences between treated animals and the control group suggesting no alteration of anxiety behavior (Table 2). All these data indicate that animal behavioral performance was not affected

Table 2
Effects of different treatments on motor activity and anxiety behavior in the open field test on the first day of the test.

Treatment	Distance moved (m)	Time spent center (sec)	Time spent periphery (sec)
Control	18.3 ± 1.6	4.9 ± 2.1	236.2 ± 10.4
MK-801	22.3 ± 1.3	8.0 ± 1.6	211.2 ± 11.6
Clz (0.5) + Veh	13.6 ± 2.0	1.7 ± 1.1	276.0 ± 6.2
Clz (1) + Veh	14.8 ± 1.3	0.5 ± 0.3	263.3 ± 10.1
Clz (0.5) + MK-801	19.2 ± 1.2	1.9 ± 0.8	269.2 ± 5.7
Clz (1) + MK-801	16.2 ± 1.6	6.7 ± 3.5	233.3 ± 21.1
WAY-100635 (0.3)	22.0 ± 1.4	5.6 ± 2.1	229.4 ± 19.3
WAY-100635 (1)	15.0 ± 0.8	5.1 ± 2.5	252.9 ± 12.0
WAY + Clz (1) + MK-801	17.9 ± 4.6	1.4 ± 0.6	269.2 ± 7.1

Data are expressed as mean values ± SEM. No significant differences were observed compared to control group. N = 5–12 per group.

during the acquisition session.

4. Discussion

The present results indicate that a very low dose of MK-801 produced learning/memory impairment in rats, as judged by the transfer latency paradigm in the modified elevated plus-maze [49,59]. This effect was attenuated by Clz pretreatment which involved the activation of 5-HT_{1A}-Rs since Clz effect was markedly prevented by a selective 5-HT_{1A} antagonist. However, changes in hippocampal BDNF levels seem not to underlie the Clz mechanism of action needed to prevent the learning/memory impairment induced by MK-801 and measured in mEPM. Overall, these results describe the influence of non-competitive NMDA receptor antagonists on cognitive behavioral alterations [59–61] and support a major role of 5-HT_{1A}-Rs activation in the action of Clz, and possibly other second generation antipsychotic drugs [16,26,28,29,34,62].

A significant shortening of the transfer latency in saline-treated animals was observed from the acquisition (TL1) to the retention session (TL2) and even to TL3, demonstrating a correct learning-memory process in control animals during the test. In contrast, the administration of MK-801 before the acquisition session prolonged the transfer latency during the retention session. This prolongation is taken as an index of impairment of spatial memory [41–44,49]. In fact, transfer latencies of MK-801-treated rats did not differ from those measured during the acquisition session. Thus, prolongation of the transfer latency in MK-801-treated animals indicated a disruption in the long-term spatial memory processing. Overall, these results are in agreement with previous reports showing that MK-801 blocked the recall of memory on the spatial configuration of the maze [41,44,59]. A similar amnesic effect was observed after the administration of a very low dose of MK-801 (0.05 mg/kg). Besides, we demonstrated that this cognitive disability was not mimicked by an anxiolytic effect induced by MK-801 (evaluated in the second day, TL2) ratifying the modified elevated plus maze as a suitable paradigm to record learning/memory alterations [41]. Although there are several pieces of evidence showing that Clz and WAY 100635 possess a certain degree of anxiolytic efficacy in the elevated plus-maze and other paradigms [63–65], in our study it could be observed that all the assayed treatments had no significant effect on transfer latencies during the first and second day (TL1 and TL2, respectively) compared to the control group. This observation rules out the possibility that a putative anxiolytic/anxiogenic effect could interfere with the animal learning/memory function. Moreover, we did not find significant alterations on time spent in open field center and periphery zones of treated-animals (vs. control group) suggesting no signs of anxiety. Also, no changes in animal locomotor activity were observed confirming that the overall behavioral performance was not altered during the acquisition session (TL1).

Here we found that Clz antagonized the MK-801-elicited amnesic effect, indicating a positive effect on spatial learning/memory. This result confirms previous evidence showing the reversal of non-competitive NMDA-R antagonist-induced behavioral abnormalities by classical and atypical antipsychotics [35,44]. Considering that there are a few available studies and even contradictory data focused on the reversal of cognitive abnormalities by Clz using behavioral approaches [66–69], our results provide novel and relevant insights on this issue.

WAY-100635 (0.3 mg/kg) prevented the pro-cognitive effect induced by Clz in MK-801-treated animals without inducing a per se effect. This result is consistent with previous observations indicating that Clz exerts some like-therapeutic actions via 5-HT_{1A}-R activation [26,28,29,70] and supports a key role for 5-HT_{1A}-R in the treatment of schizophrenia as suggested [22,23,71].

The complete mechanism that explains the Clz prevention of MK-801-induced amnesia cannot be determined by the present data. However, some hypotheses are provided. The activation of postsynaptic inhibitory 5-HT_{1A}-R by Clz may counteract the excessive activation of

prefrontal cortex pyramidal neurons produced by MK-801. Hence, NMDA-R blockade with MK-801 [72] or phencyclidine [73] markedly increases the discharge rate of prefrontal cortex pyramidal neurons, an effect reversed by Clz [73]. Likewise, given the wide distribution of 5-HT_{1A}-Rs in mammalian brain [18] other areas may be involved. It is possible that specific long-term changes in 5-HT receptors in critical brain areas involved in spatial learning/memory (e.g. hippocampus, retrosplenial cortex) underlies the actions of MK-801 and Clz. Future experiments should be done to clarify if 5-HT_{1A}-Rs in these areas participate in the reversion of the MK-801 amnesic effect by Clz. Although it was not determined, an interaction between 5-HT_{1A}-Rs and 5-HT_{2A}-Rs in the mechanism of action of Clz to suppress the spatial memory affection induced by MK-801 cannot be excluded [26]. This association should be studied testing atypical antipsychotics which do not substantially activate 5-HT_{1A}-Rs (e.g. olanzapine) [16].

The neurobiological bases of this amnesic effect are presently unknown. Alterations in the prefrontal cortex function are likely involved, since MK-801 and other non-competitive NMDA-R antagonists markedly disrupt the function of this cortical area, increasing the activity of pyramidal neurons [69,70]. Also, the hippocampus might be involved. MK-801 reduces hippocampal BDNF expression, a neurotrophin which plays an important role in synaptic plasticity and cognitive functions [74,75]. Additionally, BDNF has been related with the physiopathology of schizophrenia [76,77] and we have already shown that changes in BDNF underlie the delayed cognitive deficit induced by a low dose of MK-801 associated to the mEPM [41].

Typical and atypical antipsychotic drugs differentially regulate BDNF mRNA expression in rat hippocampus and other brain regions [78,79]. Moreover, it has been shown that the reduction of hippocampal BDNF expression induced by MK-801 was potentiated by haloperidol and normalized by some atypical antipsychotics compounds [74,80]. Clozapine modulates gene expression in pathways associated with neuronal growth and differentiation, including BDNF [78,81]. Indeed, Clz reverses the decrease of BDNF levels in prefrontal cortex induced by the NMDA antagonist ketamine [82]. In contrast, in the present study Clz did not substantially prevent the reduction of hippocampal BDNF associated to the MK-801-induced amnesic effect. This result could be on line with the reported down-regulation of BDNF mRNA induced by Clz [79] where it was strongly suggested that the therapeutic properties of antipsychotics are not mediated by stimulation of this neurotrophin, although a considerably higher dose of Clz was used [79]. However, the involvement of BDNF signaling in the action mechanism of Clz should not be completely disregarded. In the hippocampus, Clz modulates TrkB expression, a component of the BDNF receptor complex [83,84]. Interestingly, Clz is also able to reduce the expression of p75 neurotrophin receptor, the other component of the receptor complex that mediates BDNF biological effects [85]. Besides, it has been reported that MK-801 also alters TrkB expression [83,86]. These data support the idea that Clz could modulate neuronal responsiveness to BDNF and favor positive neurobiological changes (eg. neuroprotection, neurogenesis) that could account for the reversal of the observed amnesic effect. A putative alteration in BDNF signaling in other brain regions associated with learning and memory processes should also be considered. Accordingly, it was demonstrated that ketamine and MK-801 induced alterations in BDNF expression in prefrontal cortex and entorhinal cortex (the major cortical input to hippocampus) which were attenuated by Clz [83,84]. Consequently, future experiments should be done to determine the BDNF and TrkB/p75 levels in response to MK-801 and Clz in the hippocampus and related regions in association with the mEPM. Along these lines, it should be mentioned that spatial memory seems to depend mainly on dorsal but not on ventral hippocampus [87,88]. In our study BDNF measures were performed using the complete hippocampus, which could be an important limitation, taking into account these considerations.

Another possibility is that Clz promotes cortical neuroprotection and neurogenic processes through BDNF-independent mechanisms

[89,90]. It has been recently suggested that Clz could exert such effects via the inhibition of the glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), where 5-HT_{1A}-Rs stimulation, together with 5-HT_{2A}-Rs blockade seems to be required and this mechanism would be independent of BDNF [85]. Still, we cannot rule out a BDNF-dependent mechanism of modulation of GSK-3 β [91,92].

Finally, our current results strongly support the predictive validity of MK-801-induced memory impairment in the modified elevated plus maze, through the index TL, as a preclinical model for CIAS for investigating different compounds that have been tested in humans such as antipsychotic drugs.

5. Conclusions

Taken together, our results indicate that 5-HT_{1A}-Rs play a relevant role in Clz action to improve cognitive impairment induced by a low dose of MK-801, although the involvement of BDNF could not be clearly revealed. This study further supports the view that partial or full activation of 5-HT_{1A}-R may be a target for the treatment of cognitive impairment in schizophrenia. Our results also contribute to validate the mEPM behavioral assay for the testing of novel antipsychotic drugs and their mechanisms of action.

Conflicts of interest statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

This study was fully supported by Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas (PEDECIBA-Uruguay) and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC-Uruguay). We are grateful for the support given by Jessika Urbanavicius, José Pedro Prieto, Giselle Prunell and Miguel Reyes-Parada. We are also grateful to Ron Benner for his help in language revision.

References

- G.D. Tollefson, Cognitive function in schizophrenic patients, *J. Clin. Psychiatry* 57 (1996) 31–39.
- M.F. Green, R.S. Kern, D.L. Braff, J. Mintz, Neurocognitive deficits and functional outcome in schizophrenia: are we measuring the “right stuff”? *Schizophr. Bull.* 26 (2000) 119–136.
- P.D. Harvey, M.F. Green, R.S. Keefe, D.I. Velligan, Cognitive functioning in schizophrenia: a consensus statement on its role in the definition and evaluation of effective treatments for the illness, *J. Clin. Psychiatry* 65 (2004) 361–372.
- J. Addington, D. Addington, Neurocognitive and social functioning in schizophrenia, *Schizophr. Bull.* 25 (1999) 173–182.
- P.D. Harvey, R.S. Keefe, Studies of cognitive change in patients with schizophrenia following novel antipsychotic treatment, *Am. J. Psychiatry* 158 (2001) 176–184.
- S.E. Purdon, A. Malla, A. Labelle, W. Lit, Neuropsychological change in patients with schizophrenia after treatment with quetiapine or haloperidol, *J. Psychiatry Neurosci.* 26 (2001) 137–149.
- R.M. Bilder, R.S. Goldman, J. Volavka, P. Czobor, M. Hoptman, B. Sheitman, et al., Neurocognitive effects of colzapine, olanzapine, risperidone and haloperidol in patients with chronic schizophrenia or schizoaffective disorder, *Am. J. Psychiatry* 159 (2002) 1018–1028.
- T. Sumiyoshi, Y. Higuchi, T. Uehara, Neural basis for the ability of atypical antipsychotic drugs to improve cognition in schizophrenia, *Front. Behav. Neurosci.* 16 (2013) 140–148.
- J.P. McEvoy, J.A. Lieberman, T.S. Stroup, S.M. Davis, H.Y. Meltzer, R.A. Rosenheck, et al., Effectiveness of clozapine versus olanzapine, quetiapine, and risperidone in patients with chronic schizophrenia who did not respond to prior atypical antipsychotic treatment, *Am. J. Psychiatry* 163 (2006) 600–610.
- N. Thakurathi, B. Vincenzi, D.C. Henderson, Assessing the prospect of donepezil in improving cognitive impairment in patients with schizophrenia, *Expert Opin. Investig. Drugs* 22 (2013) 259–265.
- M. Didriksen, Effects of antipsychotics on cognitive behaviour in rats using the delayed non-match to position paradigm, *Eur. J. Pharmacol.* 281 (1995) 241–250.
- T. Skarsfeldt, Differential effect of antipsychotics on place navigation of rats in the Morris water maze, *Psychopharmacology* 124 (1996) 126–133.
- M. Didriksen, M. Kreilgaard, J. Arnt, Sertindole, in contrast to clozapine and olanzapine, does not disrupt water maze performance after acute or chronic treatment, *Eur. J. Pharmacol.* 542 (2006) 108–115.
- H.Y. Meltzer, The role of serotonin in antipsychotic drug action, *Neuropsychopharmacology* 21 (1999) S106–S115.
- B.L. Roth, D. Sheffler, S.G. Potkin, Atypical antipsychotic drug actions: unitary or multiple mechanisms for atypicality, *Clin. Neurosci. Res.* 3 (2003) 108–117.
- A. Newman-Tancredi, M.S. Kleven, Comparative pharmacology of antipsychotics possessing combined dopamine D2 and serotonin 5-HT_{1A} receptor properties, *Psychopharmacology* 216 (2011) 451–473.
- D.T. Chalmers, S.J. Watson, Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain—a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study, *Brain Res.* 561 (1991) 51–60.
- M. Pompeiano, J.M. Palacios, G. Mengod, Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding, *J. Neurosci.* 12 (1992) 440–453.
- A. Newman-Tancredi, S. Gavaudan, C. Conte, C. Chaput, M. Touzard, L. Verrielle, et al., Agonist and antagonist actions of antipsychotic agents at 5-HT_{1A} receptors: a [35S]GTPgammaS binding study, *Eur. J. Pharmacol.* 355 (1998) 245–256.
- T. Sumiyoshi, M. Matsui, S. Nohara, I. Yamashita, M. Kurachi, C. Sumiyoshi, et al., Enhancement of cognitive performance in schizophrenia by addition of tandospirone to neuroleptic treatment, *Am. J. Psychiatry* 158 (2001) 1722–1725.
- T. Sumiyoshi, M. Matsui, I. Yamashita, S. Nohara, M. Kurachi, U. Uehara, et al., The effect of tandospirone, a serotonin(1A) agonist, on memory function in schizophrenia, *Biol. Psychiatry* 49 (2001) 861–868.
- A. Newman-Tancredi, The importance of 5-HT_{1A} receptor agonism in antipsychotic drug action: rationale and perspectives, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 11 (2010) 802–812.
- T. Sumiyoshi, Y. Higuchi, T. Uehara, Neural basis for the ability of atypical antipsychotic drugs to improve cognition in schizophrenia, *Front. Behav. Neurosci.* 7 (2013) 1–8.
- D. Cussac, J.C. Martel, M.B. Assié, P. Heusler, I. Rauly-Lestienne, M.C. Ailhaud, et al., Distinctive affinity profile of novel antipsychotics possessing combined D2 and 5-HT_{1A} receptor properties compared with conventional and atypical antipsychotics, Society for Neuroscience-38th Annual Meeting, 9 2008, p. 155 (Washington DC).
- H. Rollema, Y. Lu, A.W. Schmidt, S.H. Zorn, Clozapine increases dopamine release in prefrontal cortex by 5-HT_{1A} receptor activation, *Eur. J. Pharmacol.* 338 (1997) R3–R5.
- J. Ichikawa, H. Ishii, S. Bonaccorso, W.L. Fowler, I.A. O’Laughlin, H.Y. Meltzer, 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 (2001) 1521–1531.
- A. Bortolozzi, L. Díaz-Mataix, M.C. Scorza, P. Celada, F. Artigas, The activation of 5-HT_{2A} receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity, *J. Neurochem.* 95 (2005) 1597–1607.
- L. Díaz-Mataix, M.C. Scorza, A. Bortolozzi, M. Toth, P. Celada, F. Artigas, Involvement of 5-HT_{1A} receptors in Prefrontal Cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action, *J. Neurosci.* 25 (2005) 10831–10843.
- A. Bortolozzi, M. Masana, L. Díaz-Mataix, R. Cortés, M.C. Scorza, J.A. Gingrich, et al., Dopamine release induced by atypical antipsychotics in prefrontal cortex requires 5-HT(1A) receptors but not 5-HT(2A) receptors, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13 (2010) 1299–1314.
- T. Kuroki, H.Y. Meltzer, J. Ichikawa, Effects of antipsychotic drugs on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 288 (1999) 774–781.
- S. Leucht, C. Corves, D. Arber, R.R. Engel, C. Li, J.M. Davis, Second-generation versus first generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis, *Lancet* 373 (2009) 31–41.
- S. Leucht, K. Komossa, C. Rummel-Kluge, C. Corves, H. Hunger, F. Schmid, et al., A meta-analysis of head-to-head comparisons of second-generation antipsychotics in the treatment of schizophrenia, *Am. J. Psychiatry* 166 (2009) 152–163.
- Z. Li, A.J. Prus, J. Dai, H.Y. Meltzer, Differential effects of M1 and 5-HT_{1A} receptors on atypical antipsychotics drug-induced dopamine efflux in the medial prefrontal cortex, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330 (2009) 948–955.
- L. Kargieman, M.S. Riga, F. Artigas, P. Celada, Phencyclidine-induced desynchronization of prefrontal cortex through a 5-HT(1A) receptor-dependent mechanism, *Neuropsychopharmacology* 37 (2012) 723–733.
- M.C. Scorza, A. Castañé, A. Bortolozzi, F. Artigas, Clozapine does not require 5-HT_{1A} receptors to block the locomotor hyperactivity induced by MK-801, *Neuropharmacology* 59 (2010) 112–120.
- D.C. Javitt, S.R. Zukin, Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia, *Am. J. Psychiatry* 148 (1991) 1301–1308.
- J.H. Krystal, D.C. D’Souza, I.L. Petrakis, A. Belger, R.M. Berman, D.S. Charney, et al., NMDA agonists and antagonists as probes of glutamatergic dysfunction and pharmacotherapies in neuropsychiatric disorders, *Harv. Rev. Psychiatry* 7 (1999) 125–143.
- J. Frohlich, J.D. Van Horn, Reviewing the ketamine model for schizophrenia, *J. Psychopharmacol.* 28 (2014) 287–302.
- C. Wass, T. Archer, E. Pålsson, K. Fejgin, A. Alexandersson, D. Klamer, et al., Phencyclidine affects memory in a nitric oxide-dependent manner: working and reference memory, *Behav. Brain Res.* 174 (2006) 49–55.
- M. Didriksen, T. Skarsfeldt, J. Arnt, Reversal of PCP-induced learning and memory deficits in the Morris’ water maze by sertindole and other antipsychotics, *Psychopharmacology* 193 (2007) 225–233.
- X.L. Hill, A. Richeri, C. Scorza, Measure of anxiety-related behaviors and hippocampal BDNF levels associated to the amnesic effect induced by MK-801 evaluated in the modified elevated plus-maze in rats, *Physiol. Behav.* 147 (2015) 359–363.

- [42] I. Ninan, S.K. Kulkarni, Effect of olanzapine on behavioural changes induced by FG 7142 and dizocilpine on active avoidance and plus maze tasks, *Brain Res.* 830 (1999) 337–344.
- [43] Z. Hlinák, I. Krejčí, Oxiracetam prevents the MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice, *Behav. Brain Res.* 117 (2000) 147–151.
- [44] I.K. Celikyurt, F.Y. Akar, G. Ulak, O. Mutlu, F. Erden, Effects of risperidone on learning and memory in naive and MK-801-treated rats, *Pharmacology* 87 (2011) 187–194.
- [45] K. Yamada, T. Nabeshima, Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes, *J. Pharmacol. Sci.* 91 (2003) 267–270.
- [46] B. Lu, K. Martinowich, Cell biology of BDNF and its relevance to schizophrenia, *Novartis Found. Symp.* 289 (2008) 119–195.
- [47] P. Bekinschtein, M. Cammarota, J.H. Medina, BDNF and memory processing, *Neuropharmacology* 76 (2014) 677–683.
- [48] G. Favalli, J. Li, P. Belmonte-de-Abreu, A. Wong, A.J. Daskalakis, The role of BDNF in the pathophysiology and treatment of schizophrenia, *J. Psychiatr. Res.* 46 (2012) 1–11.
- [49] Z. Hlinák, I. Krejčí, MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice, *Behav. Brain Res.* 131 (2002) 221–225.
- [50] M.C. Scorza, M.N. Meikle, X.L. Hill, Richeri A. XL, D. Lorenzo, F. Artigas, Prefrontal cortex lesions cause only minor effects on the hyperlocomotion induced by MK-801 and its reversal by clozapine, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 11 (2008) 519–532.
- [51] X. López Hill, M.C. Scorza, Role of the anterior thalamic nucleus in the motor hyperactivity induced by systemic MK-801 administration in rats, *Neuropharmacology* 62 (2012) 2440–2446.
- [52] J. Itoh, T. Nabeshima, T. Kameyama, Utility of an elevated plus-maze for dissociation of amnesic and behavioral effects of drugs in mice, *Eur. J. Pharmacol.* 194 (1991) 71–76.
- [53] P. Andine, N. Widermark, R. Axelsson, G. Nyberg, U. Ofsson, E. Martensson, et al., Characterization of MK-801-induced behaviour as a putative rat model of psychosis, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290 (1999) 1393–1408.
- [54] A. Fletcher, E.A. Forster, D.J. Bill, G. Brown, I.A. Cliffe, J.E. Hartley, et al., Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioral studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, *Behav. Brain Res.* 73 (1996) 337–353.
- [55] C. Boast, A.C. Bartolomeo, H. Morris, J.A. Moyer, 5-HT antagonists attenuate MK801-impaired radial arm maze performance in rats, *Neurobiol. Learn. Mem.* 71 (1999) 259–271.
- [56] O. Stiedl, I. Misane, J. Spiess, S.O. Ogren, Involvement of 5-HT_{1A} receptors in classical fear conditioning in C57BL/6J mice, *J. Neurosci.* 20 (2000) 8515–8527.
- [57] I.S. Ebenezer, A. Surujbally, The effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin (8-OH-DPAT) on food intake in non-deprived C57BL6 mice, *Eur. J. Pharmacol.* 559 (2007) 184–188.
- [58] J. Youn, I. Misane, T.M. Eriksson, M.J. Millan, S.O. Ogren, M. Verhage, et al., Bidirectional modulation of classical fear conditioning in mice by 5-HT_{1A} receptor ligands with contrasting intrinsic activities, *Neuropharmacology* 57 (5–6) (2009) 567–576.
- [59] Z. Hlinák, I. Krejčí, N-Methyl-D-aspartate prevented memory deficits induced by MK-801 in mice, *Physiol. Res.* 52 (2003) 809–812.
- [60] M.A. Geyer, B. Ellenbroek, Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27 (2003) 1071–1079.
- [61] B. Moghaddam, Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia, *Neuron* 40 (2003) 881–884.
- [62] S. Łukasiewicz, E. Błasiak, K. Szafran-Pilch, M. Dziedzicka-Wasylewska, Dopamine D₂ and serotonin 5-HT_{1A} receptor interaction in the context of the effects of antipsychotics in vitro studies, *J. Neurochem.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1111/jnc.13582>.
- [63] B.J. Cao, R.J. Rodgers, Dopamine D₄ receptor and anxiety: behavioural profiles of clozapine, L-745,870 and L-741,742 in the mouse plus-maze, *Eur. J. Pharmacol.* 335 (1997) 117–125.
- [64] G. Griebel, R.J. Rodgers, G. Perrault, D.J. Sanger, Behavioural profiles in the mouse defence test battery suggest anxiolytic potential of 5-HT_{1A} receptor antagonists, *Psychopharmacology* 144 (1999) 121–130.
- [65] N. Pınar, K. Killioglu, F. Sefil, H. Alp, M. Sagir, A. Acet, Effect of clozapine on locomotor activity and anxiety-related behavior in the neonatal mice administered MK-801, *Bosn J. Basic Med. Sci.* 15 (2015) 74–79.
- [66] J.W. Brown, L.E. Rueter, M. Zhang, Predictive validity of a MK-801-induced cognitive impairment model in mice: implications on the potential limitations and challenges of modeling cognitive impairment associated with schizophrenia pre-clinically, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 49 (2014) 53–62.
- [67] A. Ertugrul, H. Ozdemir, A. Vural, T. Dalkara, H.Y. Meltzer, E. Saka, The influence of N-desmethylclozapine and clozapine on recognition memory and BDNF expression in hippocampus, *Brain Res. Bull.* 84 (2011) 144–150.
- [68] O. Mutlu, G. Ulak, I.K. Celikyurt, P. Tanyeri, F.Y. Akar, F. Erden, Effects of olanzapine and clozapine on memory acquisition, consolidation and retrieval in mice using the elevated plus maze test, *Neurosci. Lett.* 501 (2011) 143–147.
- [69] O. Mutlu, I.K. Celikyurt, G. Ulak, P. Tanyeri, F.Y. Akar, F. Erden, Effects of olanzapine and clozapine on radial maze performance in naive and MK-801-treated mice, *Arzneimittelforschung* 62 (2012) 4–8.
- [70] Y.H. Chou, C. Halldin, L. Farde, Occupancy of 5-HT_{1A} receptors by clozapine in the primate brain: a PET study, *Psychopharmacology* 166 (2003) 234–240.
- [71] R. Schreiber, A. Newman-Tancredi, Improving cognition in schizophrenia with antipsychotics that elicit neurogenesis through 5-HT_{1A} receptor activation, *Neurobiol. Learn. Mem.* 110C (2014) 72–80.
- [72] H. Homayoun, B. Moghaddam, NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neuron, *J. Neurosci.* 27 (2007) 11496–11500.
- [73] L. Kargieman, N. Santana, G. Mengod, P. Celada, F. Artigas, Antipsychotic drugs reverse the disruption in prefrontal cortex function produced by NMDA receptor blockade with phencyclidine, *PNAS* 104 (2007) 14843–14848.
- [74] F. Fumagalli, R. Molteni, M. Roceri, F. Bedogni, R. Santero, C. Fossati, et al., Effect of antipsychotic drugs on brain-derived neurotrophic factor expression under reduced N-methyl-D-aspartate receptor activity, *J. Neurosci.* Res. 72 (2003) 622–628.
- [75] B. Lu, BDNF and activity-dependent synaptic modulation, *Learn. Mem.* 10 (2003) 86–98.
- [76] M. Nurjono, J. Lee, S. Chong, A review of brain-derived neurotrophic factor as a candidate biomarker in schizophrenia, *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.* 10 (2012) 61–70.
- [77] A. Shrivastava, A. De Sousa, G.P. Rao, Brain-derived neurotrophic factor and suicide in schizophrenia: critical role of neuroprotective mechanisms as an emerging hypothesis, *Indian J. Psychol. Med.* 38 (2016) 499–504.
- [78] O. Bai, J. Chlan-Fourney, R. Bowen, D. Keegan, X.M. Li, Expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus after treatment with antipsychotic drugs, *J. Neurosci. Res.* 71 (2003) 127–131.
- [79] B.K. Lipska, Z.Z. Khaing, C.S. Weickert, D.R. Weinberger, BDNF mRNA expression in rat hippocampus and prefrontal cortex: effects of neonatal ventral hippocampal damage and antipsychotic drugs, *Eur. J. Neurosci.* 14 (2001) 135–144.
- [80] F. Fumagalli, R. Molteni, F. Bedogni, M. Gennarelli, J. Perez, G. Racagni, M.A. Riva, Quetiapine regulates FGF-2 and BDNF expression in the hippocampus of animals treated with MK-801, *Mol. Neurosci.* 15 (2004) 2109–2112.
- [81] M.A. Rizing, A. McQuillin, A. Ng, M. Robinson, A. Harrison, M. Zvelebil, S. Hunt, H. Gurling, A gene expression and systems pathway analysis of the effects of clozapine compared to haloperidol in the mouse brain implicates susceptibility genes for schizophrenia, *J. Psychopharmacol.* 26 (2013) 1218–1230.
- [82] G.S. Vasconcelos, N.C. Ximenes, C.N. Soares de Sousa, T.Q. De Oliveira, L.L. Lima, et al., Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: participation of antioxidant, nitric oxide and neurotrophic mechanisms, *Schizophr. Res.* 165 (2015) 163–170.
- [83] A.M. Linden, J. Väisänen, M. Lakso, H. Nawa, G. Wong, E. Castrén, Expression of neurotrophins BDNF and NT-3, and their receptors in rat brain after administration of antipsychotic and psychotropic agents, *J. Mol. Neurosci.* 14 (2000) 27–37.
- [84] Y. Choi, H. Jeong, Q. Feng Liu, S. Tack Oh, B.S. Koo, Y. Kim, I.W. Chung, Y. Kim, S. Jeon, Clozapine improves memory impairment and reduces A β level in the Tg-APPsw/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's Disease, *Mol. Neurobiol.* (2016), <http://dx.doi.org/10.1007/s12035-015-9636-x>.
- [85] O. Bai, H. Xu, X.M. Li, Haloperidol and atypical antipsychotics share a same action of decreasing P75(NTR) mRNA levels in PC12 cells, *Life Sci.* 79 (2006) 570–574.
- [86] Y.J. Yang, Y.K. Li, W. Wang, J.G. Wan, Y.B. Yua, M.Z. Wang, B. Hu, Small-molecule TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone reverses cognitive and synaptic plasticity deficits in a rat model of schizophrenia, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 122 (2014) 30–36.
- [87] R. Morris, Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat, *J. Neurosci. Methods* 11 (1984) 47–60.
- [88] M.S. Fanselow, H.W. Dong, Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* 65 (2010) 7–19.
- [89] M.A. Riva, R. Molteni, F. Tascadda, A. Massironi, G. Racagni, Selective modulation of fibroblast growth factor-2 expression in the rat brain by the atypical antipsychotic clozapine, *Neuropharmacology* 38 (1999) 1075–1082.
- [90] S. Ovalle, D. Zamanillo, F. Andreu, A.J. Farré, X. Guitart, Fibroblast growth factor-2 is selectively modulated in the rat brain by E-5842, a preferential sigma-1 receptor ligand and putative atypical antipsychotic, *Eur. J. Neurosci.* 13 (2001) 909–915.
- [91] I. Kusumi, Sh. Boku, Y. Takahashi, Psychopharmacology of atypical antipsychotic drugs: from the receptor binding profile to neuroprotection and neurogenesis, *Psychiatry Clin. Neurosci.* 69 (2015) 243–258.
- [92] J.M. Beaulieu, R. Gainetdinov, M. Caron, Akt/gsk3 signaling in the action of psychotropic drugs, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49 (2009) 327–347.

En relación a la primera serie de experimentos incluidos en la publicación Lopez Hill y cols. 2015, se muestra que MK-801 indujo un efecto amnésico el cual estuvo mediado por una disminución significativa de los niveles de expresión de BDNF en la región del HC. Sin embargo, en el trabajo no se incluyó el estudio sobre la participación de la RSC. Dichos resultados se muestran en la Figura 19. Como se puede apreciar, el efecto amnésico de MK-801 no se correspondió con una disminución del BDNF en la región RSC. Por el contrario, los niveles de expresión de BDNF no fueron modificados, sugiriendo que dicha región no estaría siendo reclutada para la acción amnésica del antagonista del NMDA-R.

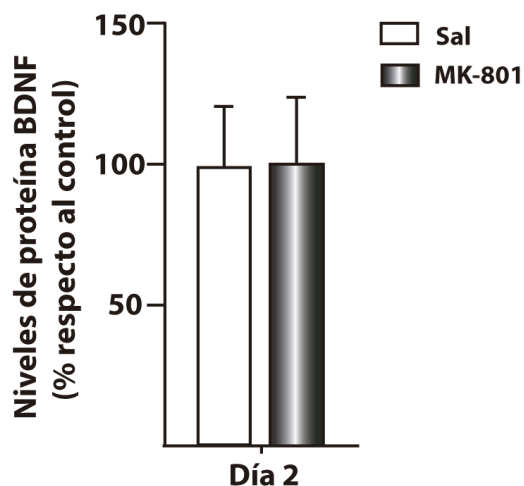


Figura 19. Efecto de la administración de MK-801 (0.05 mg/kg i.p.) sobre los niveles de expresión de BDNF en la RSC 24 h post-inyección. Los datos se expresan como la media del porcentaje respecto al grupo control \pm EEM. Test de Student. Valores absolutos de cada grupo experimental expresados en pg/mg: 1.34 para el grupo control y 1.11 para el grupo tratados con MK-801. N= 5-6.

Objetivo Específico 2.2. Evaluar los efectos comportamentales sobre la memoria espacial evaluada en el modelo LT, inducidos por la desinhibición GABAérgica del ATN.

Estos experimentos parten de la base de resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio. Habíamos demostrado que la administración sistémica de MK-801, a una dosis baja (0.05 mg/kg, la cual no desencadena alteraciones comportamentales características del SCM), generaba un efecto amnésico en el modelo de memoria LT. El efecto amnésico se evidenciaba en los animales tratados con MK-801 debido al aumento significativo de LT2, respecto al grupo control. Restaba investigar si el ATN, a través de un mecanismo de desinhibición GABAérgica, era sustrato clave en la inducción de este déficit cognitivo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 20. La curva dosis-respuesta mostrada en la Fig. 12 (Estrategia Experimental), permitió definir la dosis de bicuculina a utilizar para ser microinyectada en el ATN.

Se puede observar que bicuculina intra-ATN no modificó la performance de los animales durante la adquisición de la tarea (LT1) mientras que provocó una disminución significativa de LT2 respecto al valor de LT1, similar al grupo de animales control (Fig. 20). Este resultado indica que los animales son capaces de evocar la tarea aprendida en la sesión LT1.

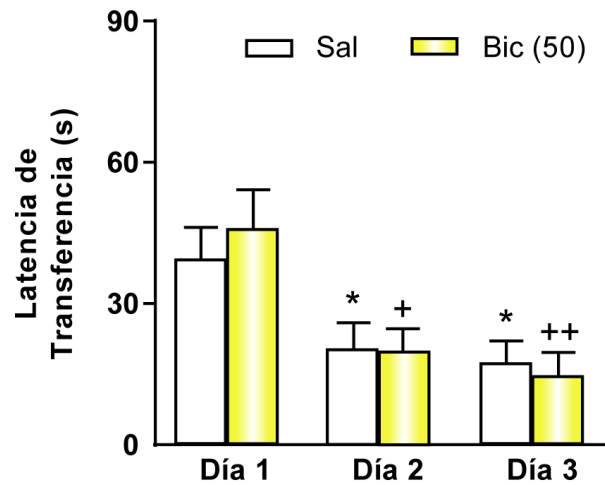


Figura 20. Efecto de la administración local Bic (50 ng) intra-ATN sobre la función cognitiva a través de la evaluación de LT registrada a las 0 (LT 1), 24 (LT 2) y 48 hs (LT 3). Los datos se expresan como la media \pm EEM de animales inyectados con bicuculina (Bic) o salino (Sal) intra-ATN. ANOVA de dos vías seguido del *Test* de Duncan entre los tres días consecutivos para ambos tratamientos. + = vs LT1 Bic intra-ATn. + = $p < 0.05$. N= 6-7.

El rol del circuito ATN-HC-RSC en los procesos de memoria y aprendizaje espacial está ampliamente descrito en la literatura [Aggleton 2010; Jankowski y cols. 2013; Dalrymple-Alford y cols. 2015], aunque los mecanismos celulares subyacentes aún no están claros. Uno de los mecanismos que ha sido asociado es la alteración en los niveles de expresión de BDNF. Los resultados obtenidos en este sentido, incluidos en la publicación científica Lopez Hill y cols. 2015, demostraron que el déficit cognitivo inducido por MK-801 involucra un cambio de expresión de BDNF en el HC, confirmando la participación de ésta región como un sustrato neural clave en la acción del antagonismo del NMDA-R. La recuperación de la tarea cognitiva así como los niveles de BDNF en el tiempo correspondiente al LT3, refuerza su participación. En contraste, la observación de que los procesos cognitivos evaluados no se asociaron a cambios de BDNF en la RSC, sugieren que esta región no estaría siendo reclutada por el antagonista NMDA-R para inducir las alteraciones cognitivas evaluadas. Sin embargo, no podemos desconocer que otras vías que también juegan un rol en las diferentes funciones cognitivas, podrían demostrar lo contrario. En este sentido, se sabe que las neuronas de la RSC poseen una variedad de moléculas intracelulares que se han asociado con la plasticidad sináptica y la formación de memorias, incluidos diversos factores de transcripción (por ejemplo, CREB, Fos, Zif268, Arc) y la alteración en la expresión de algunos de ellos en esta región se ha

relacionado con el proceso de formación y almacenamiento de memoria remotas [Gusev y Gubin 2010; Todd y Bucci 2015].

Por otro lado, los resultados obtenidos en los experimentos que evalúan el efecto de la desinhibición del ATN sobre la función cognitiva sugieren que una exacerbación en la salida del ATN no sería un mecanismo subyacente al efecto amnésico que genera MK-801 en el modelo LT. Sin embargo, debido a que no fueron testeadas otras dosis de bicuculina (por ejemplo, 75 ng), no podemos descartar completamente que las alteraciones cognitivas inducidas por el antagonista del NMDA-R no puedan ser, al menos en parte, producidos por un desbalance en el grado de activación del ATN. Existen en la literatura algunas evidencias que muestran que la estimulación eléctrica del ATN indujo una disfunción subjetiva de la memoria transitoria en un subgrupo de pacientes epilépticos así como en ratas [Fisher y cols. 2010; Hamani y cols. 2010]. En contraste, Hamani y cols. demostraron que la estimulación eléctrica prolongada de alta frecuencia en el ATN generó una mejora cognitiva en animales que demostraron tener déficit cognitivo luego de un tratamiento con corticosterona. Los autores proponen que el mecanismo sea presumiblemente vía un aumento en la proliferación y la supervivencia a largo plazo de células granulares de la circunvolución dentada del HC [Hamani y cols. 2011]. En conjunto, los resultados sugieren que el sitio de acción de MK-801 para provocar el efecto amnésico, podría ser local sobre el HC y distal al ATN y a la RSC.

Por otro lado, en relación a la segunda serie de experimentos incluidos en la publicación Lopez Hill y cols. 2017, demostramos que, si bien el efecto amnésico inducido por MK-801 y su recuperación se acompañaron de cambios en la expresión de BDNF en el Hc, el tratamiento con Clz únicamente previno el efecto amnésico y no la disminución en los niveles de BDNF hipocampales. Si bien se observa una tendencia a alcanzar los valores controles, el grupo pre-tratado con Clz no alcanza la significancia estadística. Este resultado sugiere que BDNF no sería el mecanismo molecular por el que Clz mejora la función cognitiva alterada por el bloqueo del NMDA-R. Este efecto se contrapone con algunas evidencias de la literatura en las que se ha reportado que Clz restaura la disminución de BDNF y las alteraciones cognitivas inducidas por un tratamiento prolongado de ketamina. Sin embargo, en estos estudios se utilizan dosis más altas de Clz y su administración se realiza en forma crónica [Favalli y cols. 2012; Silva y cols. 2015]. Futuros experimentos modificando la dosis de Clz o su régimen de inyección podrían determinar si cambios en BDNF subyacen al mecanismo de acción por el cual Clz induce la mejora cognitiva luego del bloqueo NMDA.

Por otro lado, se ha demostrado que Clz administrada de manera repetida modula positivamente la expresión de Trk-B en el HC, un componente del complejo-receptor para BDNF [Linden y cols. 2000; Choi y cols. 2016]. De manera interesante, los niveles de Trk-B se ven alterados bajo la influencia de MK-801 en esta misma región [Linden y cols. 2000; Yang y cols. 2014]. Estos hallazgos demuestran que otros componentes que integran la vía de señalización de BDNF también son afectados tanto por MK-801 como por Clz dejando en evidencia que no puede ser descartada por completo la implicancia de ésta vía de señalización a nivel del HC en el mecanismo de acción de Clz. Finalmente, también debe ser considerada una posible alteración en la señalización de BDNF en otras regiones del cerebro asociadas con los procesos de aprendizaje y memoria como por ejemplo la corteza prefrontal y la corteza entorrinal [Linden y cols. 2000; Choi y cols. 2016].

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

- Hemos confirmado que el ATN es un sustrato neural que participa en los efectos tipo-psicóticos inducidos por la administración sistémica de MK-801, y que una desinhibición GABAérgica, posiblemente vía RTN mediaría, al menos en parte, su acción. La inducción de estos efectos involucra un circuito neural que incluye una activación del ATN y las regiones de corteza PrL y NAc,Sh aunque no se detectaron cambios en la actividad de las regiones de proyección, HC y la RSC. La desinhibición GABAérgica resultó en la actividad de otras regiones.
- La respuesta comportamental tipo-psicótica inducida por MK801 se atenúa parcialmente en los ratones KO-GluN2C, sugiriendo que la subunidad GluN2C está fuertemente involucrada en los comportamientos de ataxia y estereotípias inducidas por MK-801 y no en el componente de hiperlocomotor. La disminución de los signos atáxicos observada en animales KO-GluN2C tratados con MK-801 indica que la ausencia de expresión de la subunidad en el cerebelo mejoraría la performance de los animales. Siendo MK801 el antagonista del NMDA-R más potente, podría generar un perfil diferencial con PCP. Sin embargo, a pesar de no usar dosis equimolares, PCP indujo un perfil comportamental similar al MK-801.
- La inducción parcial de los efectos tipo-psicóticos de MK-801 y PCP en ratones KO-GluN2C refleja que la hipótesis de acción preferencial de la subunidad en el RTN, debe ser revisada.
- ATN no demostró ser un sustrato neural en la acción antipsicótica de Clz. Sin embargo, la potenciación en algunos componentes del SCM que indujo la combinación de ambos fármacos (Clz + MK801) sugieren una alteración en el balance excitatorio/inhibitorio posiblemente provocado por el agonismo o antagonismo de Clz sobre alguno de los receptores que posee afinidad.
- El efecto amnésico inducido por la administración sistémica de MK-801 observado en estudios previos no fue reproducido con la estrategia farmacológica de desinhibición GABAérgica del ATN, sugiriendo que el circuito RTN-ATN no subyacería a la alteración cognitiva. En contraste, los datos de BDNF sugieren que el déficit cognitivo observado luego del tratamiento con MK-801 estaría dado por una acción directa de MK-801 en el HC.

- Por otro lado, el déficit cognitivo reportado para MK-801 en el modelo LT mostró una asociación temporal con una reducción en los niveles de BDNF únicamente en el HC y no en la RSC, sugiriendo que este efecto amnésico se explica por una disminución específica del BDNF en el HC. La mejora cognitiva que se logra con el tratamiento de Clozapina no parece ser vía aumento de los niveles de la proteína BDNF en el HC. Aunque un papel del ATN no puede ser totalmente descartado, nuestros datos sugieren que el déficit cognitivo observado en el LT estaría dado por una acción directa de MK-801 en el HC.

IX. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en la presente Tesis permitieron generar una serie de perspectivas, algunas de las cuales se resumen a continuación:

- Dado que los experimentos de desinhibición del ATN dejaron en evidencia que otras regiones cerebrales, parecerían estar participando en la inducción de algunos componentes del SCM de los antagonistas NMDA-Rs, se preveen realizar experimentos para evaluar la participación de otros circuitos y regiones del SNC que pudieran estar involucrados en su manifestación. En este sentido, también sería interesante evaluar los tipos celulares que se activan en las diferentes regiones cerebrales.
- Por otro lado, a partir de los experimentos comportamentales realizados para evaluar la participación de la subunidad GluN2C en la inducción del SCM surge la necesidad de evaluar el efecto a nivel de activación celular en las diferentes regiones cerebrales relacionadas a dicho síndrome así como del cerebelo en los ratones KO-GluN2C tratados con antagonistas del NMDA-R. Cabe mencionar que estos experimentos ya están siendo llevados adelante en colaboración con el grupo del IIBB.
- Dado que la estrategia de desinhibición GABAérgica del ATN utilizada, la cual no logró reproducir una alteración cognitiva en el modelo LT, no permite evaluar el efecto de dosis mayores de bicuculina, se prevee realizar experimentos utilizando otra estrategia farmacológica que consiste en la co-administración de MK-801 de forma sistémica y un agonista GABAA-R (muscimol) de forma local en el ATN.
- Los experimentos realizados para evaluar las regiones neurales involucradas en la alteración cognitiva inducida por MK-801 en el LT, fortalecieron su validación como un modelo para evaluar memoria. Por lo tanto, se prevee evaluar la capacidad de otros AAT y AT para bloquear el déficit inducido por MK-801 y profundizar en las regiones, circuitos, receptores vinculados al déficit cognitivo inducido por MK-801 y al mecanismo de acción de los diferentes antipsicóticos.
- Con el fin de profundizar en el mecanismo de acción subyacente al efecto terapéutico de Clozapina sobre el déficit cognitivo inducido por MK-801 en el LT, pensamos que sería interesante investigar si cambios en la expresión de otros componentes de la vía de señalización de BDNF (por ejemplo, el receptor Trk-B) estarían involucrados.

- El conocimiento generado en esta Tesis permitirá en un futuro, abordar el estudio del perfil terapéutico de compuestos cannabinoides, sin acción psicotomimética, en particular, sobre los déficit cognitivos de la esquizofrenia dado que son los síntomas más invalidantes para el paciente afectando el desempeño del paciente a nivel laboral y social, sin haberse encontrado aún hoy, terapias farmacológicas exitosas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

A

Abdelbaky NA. Glutamate receptors; from basic pharmacology to clinical applications. *International Journal of life science and pharma research*. 1:32-80, 2012.

Abdul-Monim Z, Reynolds GP, Neill JC. Sub-chronic psychotomimetic phencyclidine induces deficits in reversal learning and alteration in parvalbumin immunoreactive expression in the rat. *J. Psychopharmacol* 21: 198–205, 2007.

Abi-Dargham A, Gil R, Krystal J, Baldwin R, Seibyl J, Bowers M, Van Dyck C, Charney D, Innis R, Laruelle M. Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: Confirmation in a second cohort. *Am. J. Psychiatry* 155: 761–767, 1998.

Abi-Dargham A, Mawlawi O, Lombardo I, Gil R, Martinez D, Huang Y, Hwang DR, Keilp J, Kochan L, Van Heertum R, Gorman JM, Laruelle M. Prefrontal dopamine D1 receptors and working memory in schizophrenia. *J. Neurosci*. 22: 3708–3719, 2002.

Abraham R, Nirogi R, Shinde A, Irupannanavar S. Low-dose prazosin in combination with 5-HT6 antagonist PRX-07034 has antipsychotic effects. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 93: 13–21, 2015.

Adams BW, Moghaddam B. Effect of clozapine, haloperidol, or M100907 on phencyclidine-activated glutamate efflux in the prefrontal cortex. *Biological Psychiatry* 50: 750–757, 2001.

Aggleton JP, Sahgal A. The contribution of the anterior thalamic nuclei to anterograde amnesia. *Neuropsychol*. 31: 1001-1019, 1993.

Aggleton JP, Brown MW. Episodic memory, amnesia, and the hippocampal-anterior thalamic axis. *Behav Brain Sci*. 22(3): 425-44, 1999.

Aggleton JP. Understanding retrosplenial amnesia: insights from animal studies. *Neuropsychol.* 48(8): 2328-38, 2010.

Allardice J, y Boydell J. Review: The Wider Social Environment and Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin* 32: 592–598, 2006.

Amargos-Bosch M, Lopez-Gil X, Artigas F, Adell A. Clozapine and olanzapine, but not haloperidol, suppress serotonin efflux in the medial prefrontal cortex elicited by phencyclidine and ketamine. *Int J Neuropsychopharmacol* 9:565–573, 2006.

Amitai N, Kuczenski R, Behrens MM, Markou A. Repeated phencyclidine administration alters glutamate release and decreases GABA markers in the prefrontal cortex of rats. *Neuropharmacology* 62: 1422-1431, 2012.

Andiné P, Widermark N, Axelsson R, Nyberg G, Olofsson U, Mårtensson E, Sandberg M. Characterization of MK-801-Induced Behavior as a Putative Rat Model of Psychosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290(3): 1393-1408, 1999.

Andreasen NC, Arndt S, Swayze V2nd, Cizadlo T, Flaum M, O’Leary D, Ehrhardt JC, Yuh WT. Thalamic abnormalities in schizophrenia visualized through magnetic resonance image averaging. *Science* 266:294–298, 1994.

Andreasen NC, O’Leary DS, Cizadlo T, Arndt S, Rezai K, Ponto LL, Watkins GL, Hichwa RD. Schizophrenia and cognitive dysmetria: a positron-emission tomography study of dysfunctional prefrontalthalamic-cerebellar circuitry. *PNAS* 93(18): 9985–9990, 1996.

Andreasen NC. The role of the thalamus in schizophrenia. *Can J Psychiatry.* 42(1): 27-33, 1997

Andreasen NC, O’Leary DS, Flaum M, Nopoulos P, Watkins GL, Boles Ponto LL, Hichwa RD. Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naive patients. *Lancet.* 349:1730–1734, 1997.

Andreasen NC, Pierson R. The Role of the Cerebellum in Schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 64(2): 81–88, 2008.

Andreasen NC, Nopoulos P, Magnotta V, et al. Progressive brain change in schizophrenia: A prospective longitudinal study of first episode schizophrenia. *Biological Psychiatry* 70: 672–679, 2011.

Anticevic A, Cole MW, Repovs G, Murray JD, Brumbaugh MS, Winkler AM, Krystal JH, Pearlson GD, Glahn DC. Characterizing Thalamo-Cortical Disturbances in Schizophrenia and Bipolar Illness. *Cerebral Cortex*. 24:3116–3130, 2014.

Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*. 22:208-215, 1999.

Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Beh*. 21(2): 205-35, 1973.

Arnt J, Skarsfeldt T. Do novel antipsychotics have similar pharmacological characteristics? A review of the evidence. *Neuropsychopharmacol*. 18: 63-101, 1998.

B

Balu DT. The NMDA Receptor and Schizophrenia: From Pathophysiology to Treatment. *Advances in Pharmacology*, 76: 351-382, 2016.

Barch DM, Ceaser A. Cognition in schizophrenia: core psychological and neural mechanisms. *Trends Cogn. Sci*. 16(1):27-34, 2012.

Barnes TRE, Mutsatsa SH, Hutton SB, Watt HC, Joice EM. Comorbid substance abuse and age of onset of schizophrenia. *Br. J. Psychiatry* 188: 237–242, 2006.

Bastian AJ, Martin TA, Keating JG, Thach WT. Cerebellar ataxia: abnormal control of interaction torques across multiple joints. *J. Neurophysiol*. 76:492–509, 1996.

Bekinschtein P, Cammarota M, Medina J. BDNF and memory processing. *Neuropharmacol.*76:677-83, 2014.

Bhattacharya S, Khatri A, Swanger SA, DiRaddo JO, Yi F, Hansen KB, Yuan H, Traynelis SF. Triheteromeric GluN1/GluN2A/ GluN2C NMDARs with unique single-channel properties are the dominant receptor population in cerebellar granule cells. *Neuron.* 99(2): 315–328, 2018.

Bleakman D, Lodge D. Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology* 37, 1187-1204, 1998.

Bota RG, Munro S, Nguyen Ch, Preda A. Chapter 11: Course of Schizophrenia: What Has Been Learned from Longitudinal Studies? Ritsner MS (ed.), *Handbook of Schizophrenia Spectrum Disorders*, Vol. II. pp 281-300, 2011.

Braun I, GeniusGrunze H, Bender A, Möller HJ, Rujescu D. Alterations of hippocampal and prefrontal GABAergic interneurons in an animal model of psychosis induced by NMDA receptor antagonism. *Schizophr. Res.* 97(1–3): 254–263, 2007.

Bresink I, Danysz W, Parsons CG, Mutschler E. Different Binding Affinities of NMDA Receptor Channel Blockers in Various Brain Regions-Indication of NMDA Receptor Heterogeneity. *Neuropharmacol.* 34(5): 533-540, 1995.

Brown S. Excess mortality of schizophrenia. A meta-analysis. *Br. J. Psychiatry* 171:02-508, 1997.

Brown JW, Rueter LE, Zhang M. Predictive validity of a MK-801-induced cognitive impairment model in mice: Implications on the potential limitations and challenges of modeling cognitive impairment associated with schizophrenia preclinically. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. & Biol. Psych.* 49: 53–62, 2014.

Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *An. Biochem.* 180: 136-139, 1989.

Bruijnzeel D, Suryadevara U, Tandon R. Antipsychotic treatment of schizophrenia: An update. *Asian J. Psychiatry*, 1–5, 2014.

Bubeníková-Valesová V, Stuchlik A, Svoboda J, Bures J, Vales K. Risperidone and ritanserin but not haloperidol block effect of dizocilpine on the active allothetic place avoidance task. *PNAS* 105(3): 1061–1066, 2008.

Buchsbaum MS, Someya T, Teng CY, Abel L, Chin S, Najafi A, Haier RJ, Wu J, Bunney Jr WE. PET and MRI of the thalamus in never medicated patients with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 153: 191-199, 1996.

Butelman ER. The effect of NMDA antagonists in the radial arm maze task with an interposed delay. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 35(3): 533-6, 1990.

Bymaster FP, Calligaro DO, Falcone JF, Marsh RD, Moore NA, Tye NC, Seeman P, Wong DT. Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacol.* 14: 87-96, 1996.

Byne W, Hazlett EA, Buchsbaum MS, Kemether E. The thalamus and schizophrenia: current status of research. *Acta Neuropathol.* 117(4):347-68, 2008.

C

Carletti F, Woolley JB, Bhattacharyya S, et al. Alterations in white matter evident before the onset of psychosis. *Sch. Bull.* 38: 1170–1179, 2012.

Carlsson A. Does dopamine have a role in schizophrenia? *Biol.Psychiatry* 13: 3-21, 1978.

Carlsson A., Waters N., Holm-Waters S., Tedroff J., Nilsson M., Carlsson M.L. Interactions between monoamines, Glutamate, and GABA in schizophrenia: New evidence. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41:237-60, 2001.

Celikyurt IK, Akar FY, Ulak G, Mutlu O, Erden F. Effects of Risperidone on Learning and Memory in Naive and MK-801-Treated Rats. *Pharmacol.* 87: 187-194, 2011.

Chesney E, Goodwin GM, Fazel S. Risks of all-cause and suicide mortality in mental disorders: a meta-review. *World Psychiatry* 13:153–160, 2014.

Choi Y, Jeong H, Feng Liu Q, Tack Oh S, Koo BS, Kim Y, Chung IW, Kim Y, Jeon S. Clozapine improves memory impairment and reduces A β level in the Tg-APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol*, 54(1):450-460, 2016.

Chong HY, Teoh SL, Wu DB, Kotirum S, Chiou Ch, Chaiyakunapruk N. Global economic burden of schizophrenia: a systematic review. *Neuropsychiatric Disease and Treatment* 12: 357–373, 2016.

Clinton SM, Ibrahim HM, Frey KA, Davis KL, Haroutunian V, Meador-Woodruff JH. Dopaminergic abnormalities in select thalamic nuclei in schizophrenia: involvement of the intracellular signal integrating proteins calcyon and spinophilin. *Am. J. Psychiatry* 162:1859–1871, 2005.

Coffman KA, Dum RP, Strik PL. Cerebellar vermis is a target of projections from the motor areas in the cerebral cortex. *PNAS*, 108(38): 16068–16073, 2011.

Cortés R, Probst A, Tobler HJ, Palacios JM. Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the human brain. II. Quantitative autoradiographic studies. *Brain Res* 362:239–523, 1986.

Coyle JT. NMDA Receptor and Schizophrenia: A Brief History. *Schizophrenia Bull.* 38:(5): 920–926, 2012.

Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE.* (255):16, 2004.

D

Da Cunha IC, José RF, Orlandi Pereira L, Pimenta JA, Oliveira de Souza IA, Reiser R, Moreno Jr H, Marino Neto J, Paschoalini MA, Faria MS. The role of nitric oxide in the emotional learning of rats in the plus-maze. *Physiol. & Behav.* 84: 351-358, 2005.

Dalrymple-Alford JC, Harland B, Loukavenko EA, Perry B, Mercer S, Collings DA, Ulrich K, Abraham WC, McNaughton N, Wolff M. Anterior thalamic nuclei lesions and to recovery of function: Relevance cognitive thalamus. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 54: 145–160, 2015.

Danysz W, Wroblewski JT, Costa E. Learning impairment in rats by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *Neuropharmacol*. 27(6): 653-6, 1988.

Darvesh S, Hopkins DA. Differential distribution of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase in the human thalamus. *J Comp Neurol* 463:25–43, 2003.

Davis KL, Buchsbaum MS, Shihabuddin L, Spiegel-Cohen J, Metzger M, Frecska E, Keefe RS, Powchik P. Ventricular enlargement in poor-outcome schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 43: 783-793, 1998.

Day Heidi EW, Campeau S, Watson Jr SG, Akil H. Distribution of α 1a-, α 1b- and α 1d-adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 13: 115–139, 1997.

De Leonibus E, Mele A, Oliverio A, Pert A. Distinct pattern of c-fos mRNA expression after systemic and intra-accumbens amphetamine and MK-801. *Neuroscience* 115(1): 67-78, 2002.

DeLisi LE, Szulc KU, Bertisch HC, Majcher M, Brown K. Understanding structural brain changes in schizophrenia. *Dialogues in Clinical Neuroscience* – 8(1): 71-78, 2006.

Degenhardt L, Hall W. Is cannabis use a contributory cause of psychosis? *Can. J. Psychiatry* 51, 566–574, 2006.

Diaz-Mataix L, Scorza MC, Bortolozzi A, Toth M, Celada P, Artigas F. Involvement of 5-HT_{1A} Receptors in Prefrontal Cortex in the Modulation of Dopaminergic Activity: Role in Atypical Antipsychotic Action. *J. Neurosc.* 25(46): 10831–10843, 2005.

Dietsche B, Kircher T, Falkenberg I. Structural brain changes in schizophrenia at different stages of the illness: A selective review of longitudinal magnetic resonance imaging studies. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry*. 51(5):500-508, 2017.

Dix S, Gilmour G, Potts S, Smith JW, Tricklebank M. A within-subject cognitive battery in the rat: differential effects of NMDA receptor antagonists. *Psychopharmacol.* 212:227–242, 2010.

Dravid Sh, Prakash A., Traynelis S.F. Activation of recombinant NR1/NR2C NMDA receptors. *J Physiol* 586(18): 4425–4439, 2008.

E

Ellison-Wright I, Glahn DC, Laird AR, Thelen S.M., Bullmore E. The anatomy of first-episode and chronic schizophrenia: an anatomical likelihood estimation meta-analysis. *Am J Psychiatry.* 165:1015–1023, 2008.

Ende G, Hubrich P, Walter S, Weber-Fahr W, Kämmerer N, Braus DF, Henn FA . Further evidence for altered cerebellar neuronal integrity in schizophrenia. *Am. J Psychiatry.* 162:790–792, 2005.

Enomoto T, Ishibashi T, Tokuda K, Ishiyama T, Toma S, Ito A. Lurasidone reverses MK-801-induced impairment of learning and memory in the Morris water maze and radial-arm maze tests in rats. *Behav Brain Res.* 186(2):197-207, 2008.

Erlj D, Escartín-Perez E, Acosta-García J, Rojas-Márquez M, González-Hernández B, Aceves J, Florán B. Dopamine D4 receptor stimulation in GABAergic projections of the globus pallidus to the reticular thalamic nucleus and the substantia nigra reticulata of the rat decreases locomotor activity. *Neuropharmacol.* 62: 1111-1118, 2012.

F

Farber NB, Kim SH, Dikranian K, Jiang XP, Heinkel C. Receptor mechanisms and circuitry underlying NMDA antagonist neurotoxicity. *Molecular Psychiatry.* 7: 32-43, 2002.

Farber NB. The NMDA receptor hypofunction model of psychosis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1003: 119-130, 2003.

Farde L, Nordström AL, Wiesel FA, Pauli S, Halldin C, Sedvall G. Positron emission tomographic analysis of central D1 and D2 dopamine receptor occupancy in patients treated with classical neuroleptics and clozapine. Relation to extrapyramidal side effects. *Arch Gen Psychiatry*. 49(7): 538-44, 1992.

Farde L, Mack RJ, Nyberg S, Halldin C. D2 occupancy, extrapyramidal side effects and antipsychotic drug treatment: a pilot study with sertindole in healthy subjects. *Int. Clin. Psychopharmacol*. 12(1): 3-7, 1997.

Farrant M, Feldmeyer D, Takahashi T, Cull-Candy SG. NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature*. 368: 335–339, 1994.

Favalli G, Li J, Belmonte-de-Abreu P, Wong A, Daskalakis ZJ. The role of BDNF in the pathophysiology and treatment of schizophrenia. *J. Psych. Res*. 46: 1-11, 2012.

File SE. The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *J. Neurosci. Methods* 2 (3): 219 – 238, 1980.

File SE, Seth P. A review of 25 years of the social interaction test. *Eur. J. Pharmacol*. 463 (1 – 3): 35 – 53, 2003.

Fish B. The detection of schizophrenia in infancy. A preliminary report. *J. of Nervous and Mental Disease*, 125: 1-24, 1957.

Fish B, Marcus J, Hans SL, Auerbach JG, Perdue S. Infants at Risk for Schizophrenia: Sequelae of a Genetic Neurointegrative Defect. *Arch. Gen. Psychiatry*. 49: 221-235, 1992.

Fisher R, Salanova V, Witt T, Worth R, Henry T, Gross R, Oommen K, Osorio I, Nazzaro J, Labar D, Kaplitt M, Sperling M, Sandok E, Neal J, Handforth A, Stern J, DeSalles A, Chung S, Shetter A, Bergen D, Bakay R, Henderson J, French J, Baltuch G, Rosenfeld W, Youkilis A, Marks W, Garcia P, Barbaro N, Fountain N, Bazil C, Goodman R, McKhann G, Babu Krishnamurthy K, Papavassiliou S, Epstein C, Pollard J, Tonder L, Grebin J, Coffey R, Graves N. Electrical stimulation of the anterior nucleus of thalamus for treatment of refractory epilepsy. *Epilepsia* 51: 899–908, 2010.

Fitzgerald PJ. The NMDA receptor may participate neural in widespread suppression of circuit level activity,

in addition to a similarly prominent role in circuit level activation. *Behav. Brain Res.* 230: 291–298, 2012.

Fornito A, Yucel M, Patti J, Wood SJ, Pantelis C. Mapping grey matter reductions in schizophrenia: an anatomical likelihood estimation analysis of voxel-based morphometry studies. *Schizophr Res.* 108:104–113, 2009.

Furth KE, Mastwal S, Wang KH, Buonanno A, Vullhorst D. Dopamine, cognitive function, and gamma oscillations: role of D4 receptors. *Front in Neuroscienc.* 7 (102):1-19, 2013.

Fusar-Poli P. Voxelwise meta-analysis of fMRI studies in patients at clinical high risk for psychosis. *J Psychiatry Neurosci.* 37: 106–112, 2012.

G

Gao X, Sakai K, Roberts RC, Conley RR, Dean B, Tamminga CA. Ionotropic Glutamate Receptors and Expression of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Subunits in Subregions of Human Hippocampus: Effects of Schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 157:1141–1149, 2001.

Garcia-Cabezas MA, Rico B, Sanchez-Gonzalez MA, Cavada C. Distribution of the dopamine innervation in the macaque and human thalamus. *Neuroimage* 34: 965–984, 2007.

Gasparotti R, Valsecchi P, Carletti F, Galluzzo A, Liserre R, Cesana B, Sacchetti E. Reduced fractional anisotropy of corpus callosum in first-contact, antipsychotic drug-naïve patients with schizophrenia. *Sch. Res.* 108: 41–4 2009.

Geyer MA, Ellenbroek R. Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psy.* 27: 1071 – 1079. 2003.

Geyer MA, Vollenweider FX. Serotonin research: contributions to understanding psychoses. *Trends in Pharmacological Sciences* 29(9): 445-453, 2008.

Gennari SP, Millman RE, Hymers M, Mattys SL. Anterior paracingulate and cingulate cortex mediates the effects of cognitive load on speech sound discrimination. *NeuroImage* 178:735-743, 2018.

Gilmour G, Steckler Th, Dix S, Fellini L, Gastambide F, Plath N, Talpos J, Tricklebank M. NMDA receptors, cognition and schizophrenia e Testing the validity of the NMDA receptor hypofunction hypothesis. *Neuropharmacology* 62: 1401-412, 2012.

Glickstein M. The cerebellum and motor learning. *Curr Opin Neurobiol.* 2: 802–806, 1992.

Global Health Metrics. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016-*Lancet* 390: 1211–59, 2016.

Gonzalo-Ruiz A, Lieberman AR. GABAergic projections from the thalamic reticular nucleus to the anteroventral and anterodorsal thalamic nuclei of the rat. *J Chem Neuroanat* 9: 165–174, 1995.

Gonzalo-Ruiz A, Sanz-Anquela MJ, Lieberman AR. Cholinergic projections to the anterior thalamic nuclei in the rat: a combined retrograde tracing and choline acetyl transferase immunohistochemical study. *Anat Embryol (Berl)* 192: 335–349, 1995a.

Gonzalo-Ruiz A, Lieberman AR, Sanz-Anquela JM. Organization of serotonergic projections from the raphe nuclei to the anterior thalamic nuclei in the rat: a combined retrograde tracing and 5-HT immunohistochemical study. *J Chem Neuroanat* 8: 103–115, 1995b.

Gonzalo-Ruiz A, Sanz JM, Lieberman AR. Immunohistochemical studies of localization and colocalization of glutamate, aspartate and GABA in the anterior thalamic nuclei, retrosplenial granular cortex, thalamic reticular nucleus and mammillary nuclei of the rat. *J Chem Neuroanat* 12: 77–84, 1996.

Gonzalo-Ruiz A, Morte L, Lieberman AR . Evidence for collateral projections to the retrosplenial granular cortex and thalamic reticular nucleus from glutamate and/or aspartate-containing neurons of the anterior thalamic nuclei in the rat. *Exp Brain Res.* 116:63-72, 1997.

Gonzalo-Ruiz A, Sanz JM, Morte L, Lieberman AR. Glutamate and aspartate immunoreactivity in the reciprocal projections between the anterior thalamic nuclei and the retrosplenial granular cortex in the rat. *Brain Res Bull* 42: 309–321, 1997.

Govindaiah G, Wang T, Gillette MU, Crandall ShR, Cox ChL. Regulation of Inhibitory Synapses by Presynaptic D4 Dopamine Receptors in Thalamus. *J Neurophysiol* 104: 2757–2765, 2010.

Gowen E, Miall R. The cerebellum and motor dysfunction in neuropsychiatric disorders. *Cerebellum* 6: 268–279, 2007.

Greene R. Circuit analysis of NMDAR hypofunction in the hippocampus, in vitro, and psychosis of schizophrenia. *Hippocampus*. 11(5):569-77, 2001.

Grunze HC, Rainnie DG, Hasselmo ME, Barkai E, Hearn EF, McCarley RW, Greene RW. NMDA dependent modulation of CA1 local circuit inhibition. *J Neurosci*. 16: 2034–2043, 1996.

Gusev PA, Gubin AN. *Arc/Arg3.1* mRNA global expression patterns elicited by memory recall in cerebral cortex differ for remote versus recent spatial memories. *Front. Integr. Neurosci*. 4(15): 1-20, 2010.

H

Hamani C, Dubiela FP, Soares JC, Shin D, Bittencourt S, Covolan L, Carlen PL, Laxton AW, Hodaie M, Stone SS, Ha Y, Hutchison WD, Lozano AM, Mello LE, Oliveira MG. Anterior thalamus deep brain stimulation at high current impairs memory in rats. *Exp. Neurol*. 225: 154–162, 2010.

Hamani C, Stone SS, Garten A, Lozano AM, Winocur G. Memory rescue and enhanced neurogenesis following electrical stimulation of the anterior thalamus in rats treated with corticosterone. *Exp. Neurology* 232: 100–104, 2011.

Hargreaves EL, Rao G, Lee I, Knierim JJ. Major dissociation between medial and lateral entorhinal input to dorsal hippocampus. *Science* 308:1792–1794, 2005.

Harrison PJ, Weinberger DR. Schizophrenia genes, gene expression, and neuropathology: on the matter of their convergence. *Mol Psychiatry* 10: 40 – 68, 2005.

Harvey P. Cognitive impairment in schizophrenia: profile, course, and neurobiological determinants. Capitulo 25, *Handbook of Clinical Neurology*, Vol. 106 (3rd series) *Neurobiology of Psychiatric Disorders*, pp 433- 445, 2012.

Harvey PD, Rosenthal JB. Treatment resistant schizophrenia: Course of brain structure and function. *Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2016.

Hashimoto K, Minabe Y, Iyo M. Expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA in rat retrosplenial cortex following administration of PCP. *Addiction Biol.* 3: 79–83, 1998.

Hashimoto T, Volk DW, Eggan SM, Mirnics K, Pierri JN, Sun Z, Sampson AR, Lewis DA. Gene Expression Deficits in a Subclass of GABA Neurons in the Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. *J. Neurosci.* 23(15): 6315– 6326, 2003.

Hayter AL, Langdon DW, Ramnani N. Cerebellar contributions to working memory. *Neuroimage.* 36: 943–954, 2007.

Hervig ME, Thomsen MS, Kallo I, Mikkelsen JD. Acute phencyclidine administration induces c-fos-immunoreactivity in interneurons in cortical and subcortical regions. *Neurosci.* 334: 13–25, 2016.

Hillman BG, Dravid SM, Gupta SC, Stairs DJ, Buonanno A, Dravid SM. Behavioral analysis of NR2C knockout mouse reveals deficit in working memory and acquisition of conditioned fear. *Neurobiol Learn Mem.* 95(4): 404–414, 2011.

Hlinák Z, Krejčí I. Concurrent administration of subeffective doses of scopolamine and MK-801 produces a short-term amnesia for the elevated plus-maze in mice, *Behav. Brain Res.* 91: 83–89, 1998.

Hlinák Z, Krejčí I. MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice. *Behav. Brain Res.* 131: 221–

225, 2002.

Hoffman GE, Le WW, Sita LV. The Importance of Titrating Antibodies for Immunocytochemical Methods. *Curr. Prot. Neurosc.* 2.12.1-2.12.26, 2008.

Holder SD, Wayhs A. Schizophrenia. *American Family Physician.* 90(11): 775-82, 2014.

Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 17: 31-108, 1994.

Homayoun H, Moghaddam B. NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *J Neurosci*; 27:11496–500, 2007.

Hoppenbrouwers SS, Schutter DJ, Fitzgerald PB, Chen R, Daskalakis ZJ. The role of the cerebellum in the pathophysiology and treatment of neuropsychiatric disorders: a review. *Brain Res Rev.* 59: 185–200, 2008.

Hornbeck, P. In: *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, Coico, R., ed., John Wiley & Sons, Inc., NY, Unit 2.1, 1994.

Horvath ZC, Czopf J, Buzsaki G. MK-801-induced neuronal damage in rats. *Brain Res.* 753: 181–195, 1997.

Hoxha E, Balbo I, Mlniaci M, Tempia F. Purkinje cell signaling deficits in animal models of ataxia. *Front. Synapsis Neurosc.* 10: 6, 2018.

Humphries MD, Prescott TJ. The ventral basal ganglia, a selection mechanism at the crossroads of space, strategy, and reward. *Prog. Neurobiol.* 90: 385–417, 2010.

I

Ibrahim HM, Hogg Jr AJ, Healy DJ, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH. Ionotropic Glutamate Receptor Binding and Subunit mRNA Expression in thalamic Nuclei in Schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157: 1811–1823, 2000.

Ichimiya T, Okubo Y, Suhara T, Sudo Y. Reduced volume of the cerebellar vermis in neuroleptic-naive

schizophrenia. *Biol*

Psychiatry. 49:20–27, 2001.

Itoh J, Nabeshima T, Kameyama T. Utility of an elevated plus-maze for dissociation of amnesic and behavioral effects of drugs in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 194:71-76, 1991.

Izquierdo I, Medina JH. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.* 68(3): 285-16, 1997.

J

Jackson ME, Homayoun H, Moghaddam B. NMDA receptor hypofunction produces concomitant firing rate potentiation and burst activity reduction in the prefrontal cortex. *Proc. National Acad. Sc. USA* 101: 8467–8472, 2004.

Jankowski MM, Ronnqvist KC, Tsanov M, Vann SD, Wright NF, Erichsen JT, Aggleton JP, O’Mara ShM. The anterior thalamus provides a subcortical circuit supporting memory and spatial navigation. *Front. Systems Neurosc.* 7(45): 1-12, 2013.

Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 148: 1301-8, 1991.

Javitt DC, Balla A, Sershen H, Lajtha A. Reversal of Phencyclidine-Induced Effects by Glycine and Glycine Transport Inhibitors. *Biol. Psychiatry* 45: 668 – 679, 1999.

Javitt DC. Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr. J. Psychiatry relat Sci.* 47(1): 1-16, 2010.

Jodo E, Suzuki Y, Katayama T, Hoshino KY, Takeuchi S, Niwa S, Kayama Y. Activation of medial prefrontal cortex by phencyclidine is mediated via a hippocampo-prefrontal pathway. *Cereb. Cortex* 15, 663–669, 2005.

Kaiser S, Foltz LA, George CA, Kirkwood SC, Bemis KG, Lin X, Gelbert LM, Nisenbaum LK. Phencyclidine-induced changes in rat cortical gene expression identified by microarray analysis: implications for schizophrenia. *Neurobiology of Disease* 16: 220 – 235, 2004.

Kalkman HO, Neumann V, Hoyer D, Tricklebank MD. The role of α_2 -adrenoceptor antagonism in the anti-cataleptic properties of the atypical neuroleptic agent, clozapine, in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 124, 1550-1556, 1998.

Kantrowitz JT, Javitt DC. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor dysfunction or dysregulation: the final common pathway on the road to schizophrenia? *Brain Res Bull.* 83(3-4): 108–121, 2010.

Kapur S, Remington G. Atypical antipsychotics: New Directions and New Challenges in the Treatment of Schizophrenia. *Annu. Rev. Med.* 52:503-517, 2001.

Karavanova I, Vasudevan K, Cheng J, Buonanno A. Novel regional and developmental NMDA receptor expression patterns uncovered in NR2C subunit-beta-galactosidase knock-in mice. *Mol Cell Neurosci* 34:468–480, 2007.

Kargieman L, Santana N, Mengod G, Celada P, Artigas F. Antipsychotic drugs reverse the disruption in prefrontal cortex function produced by NMDA receptor blockade with phencyclidine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104: 14843-14848, 2007.

Kehrer C, Maziashvili N, Dugladze T, Gloveli T. Altered excitatory-inhibitory balance in the NMDA-hypofunction model of schizophrenia. *Fron. Mol. Neurosci.* 1(6): 1-7, 2008.

Keilhoff G, Becker A, Grecksch G, Wolf G, Bernstein HG. Repeated application of ketamine to rats induces changes in the hippocampal expression of parvalbumin, neuronal nitric oxide synthase and cfos similar to those found in human schizophrenia. *Neuroscience* 126: 591–598, 2004.

Kesslak J, Chuang K, Berchtolf, N. Spatial learning is delayed and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression inhibited by administration of MK-801 in rats. *Neurosci. Letters* 353: 95-8, 2003.

Kew JNC, Kemp JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*. 179:4–29, 2005.

Khlestova Elizaveta, Jon W. Johnson, John H. Krystal, John Lisman. The Role of GluN2C-Containing NMDA Receptors in Ketamine's Psychotogenic Action and in Schizophrenia Models. *The Journal of Neuroscience*, 36(44):11151–11157, 2016.

Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia. *Neurosci Lett*. 20:379–382, 1980.

Kim SH, Price MT, Olney JW, Farber NB. Excessive cerebrocortical release of acetylcholine induced by NMDA antagonists is reduced by GABAergic and alpha2-adrenergic agonists. *Mol Psychiatry*. 4(4): 344-52, 1999.

Kim DJ, Kent JS, Bolbecker AR, Sporns O, Cheng H, Newman SD, Puce A, O'Donnell BF, Hetrick WP. Disrupted Modular Architecture of Cerebellum in Schizophrenia: A Graph Theoretic Analysis. *Schizophr. Bull*. 40(6): 1216–1226, 2014.

Kinsey AM, Wainwright A, Heavens R, Sirinathsinghji DJ, Oliver KR. Distribution of 5-HT(5A), 5-HT(5B), 5-HT(6) and 5HT(7) receptor mRNAs in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 88:194–198, 2001.

Kintzinger H, Arnold DG. A preliminary study of the effects of glutamic acid on catatonic schizophrenics. *Rorschach Res Exch J Proj Tech*. 13:210–8, 1949.

Kittelberger K, Hur E, Sazegar S, Keshavan V, Kocsis B. Comparison of the effects of acute and chronic administration of ketamine on hippocampal oscillations. Relevance for the NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *Brain Struct Funct*. 217(2): 395-409, 2012.

Klingner CM, Langbein K, Dietzek M, Smesny S, Witte OW, Sauer H, Nenadic I. Thalamocortical connectivity

during resting state in schizophrenia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 264(2):111-9, 2013..

Konick LC y Friedman L. Meta-Analysis of Thalamic Size in Schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 49(1):28-38, 2001.

Köster LS, Carbon M, Correl Ch. Emerging drugs for schizophrenia: an update. *Expert Opin Emerg Drugs.* 19:1-21, 2014.

Korpi ER, Kaufmann CA, Marnela KM, Weinberger DR. Cerebrospinal fluid amino acid concentrations in chronic schizophrenia. *Psychiatry Res.* 20:337–345, 1987.

Kotermanski SE, Woos JT, Johnson JW. Memantine binding to a superficial site on NMDA receptors contributes to partial trapping. *J Physiol.* 587(19): 4589–4603, 2009.

Kovács KJ. Measurement of Immediate-Early Gene Activation- c-fos and Beyond. *J. Neuroendocrinol.* 20: 665–672, 2008.

Krystal JH, D'Souza DC, Mathalon D, Perry E, Belger A, Hoffman R. NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacol. (Berl).* 169:215-33, 2003.

Krystal JH, Perry EB Jr, Gueorgulieva R, Belger A, Madonick SH, Abi-Dargham A, Cooper TB, Macdougall L, Abi-Saab W, D'Souza DC. Comparative and interactive human psychopharmacologic effects of ketamine and amphetamine: implications for glutamatergic and dopaminergic model psychoses and cognitive function. *Arch. Gen. Psy.* 62(9):985–994, 2005.

Kurumaji A, McCulloch J. Effects of MK-801 Upon Local Cerebral Glucose utilisation in Conscious Rats and in Rats Anaesthetised with Halothane. *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism* 9:786-794, 1989.

Lahti AC, Weiler MA, Michaelidis T, Parwani A, Tamminga CA. Effects of Ketamine in Normal and Schizophrenic Volunteers. *Neuropsychopharmacol.* 25(4): 456-67, 2001.

LeDoux JE. Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 23:155–184, 2000.

Lamprea MR, Cardenas FP, Setem J, Morato S. Thigmotactic responses in an open-field. *J Med Biol Res.* 41(2): 135-140, 2008.

Lavoie B, Parent A. Serotonergic innervation of the thalamus in the primate: an immunohistochemical study. *J Comp Neurol* 312:1–18, 1991.

Leucht S, Corves C, Arbter D, Engel RR, Li Ch, Davis JM. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet.* 373(9657): 31-41, 2009

Lewis DA. Development of the prefrontal cortex during adolescence: Insights into vulnerable neural circuits in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 16: 358–398, 1997.

Lewis DA y Lieberman JA. Catching Up on Schizophrenia: Natural History and Neurobiology. *Neuron*, 28, 325-334, 2000

Lieberman JA Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA, Perkins DO, Keefe RS, Davis SM, Davis CE, Lebowitz BD, Severe J, Hsiao JK. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N. Engl. J. Med.* 353:1209–1223, 2005.

Linden AM, Väisänen J, Lakso M, Nawa H, Wong G, Castrén E. Expression of neurotrophins BDNF and NT-3, and their receptors in rat brain after administration of antipsychotic and psychotropic agents. *J. Mol. Neurosci.* 14: 27–37, 2000.

Lisman JE, Coyle JT, Green RW, Javitt DC, Benes FM, Heckers S, Grace AA. Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci.* 31(5): 234–242, 2008.

Liu Y, Liang M, Zhou Y, He Y, Hao Y, Song M, Yu C, Liu H, Liu Z, Jiang T. Disrupted small-world networks in schizophrenia. *Brain* 131(4): 945–961, 2008.

Liu W, Wang D, Hong W. Psychotomimetic effects of different doses of MK801 and the underlying mechanisms in a selective memory impairment model. *Behav. Brain Res.* 320:517-525, 2016.

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

López Hill X y Scorza MC. Role of the anterior thalamic nucleus in the motor hyperactivity induced by systemic MK-801 administration in rats. *Neuropharmacol.* 62: 2439-45, 2012.

López Hill X, Richeri A, Scorza MC. Measure of anxiety-related behaviors and hippocampal BDNF levels associated to the amnesic effect induced by MK-801 evaluated in the modified elevated plus-maze in rats. *Physiol. & Behav.* 147: 359–363, 2015.

López Hill X, Richeri A, Scorza MC. Clozapine blockade of MK-801-induced learning/memory impairment in the mEPM: Role of 5-HT1A receptors and hippocampal BDNF levels. *Physiol. & Behav.* 179: 346–352, 2017.

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

Lu Y, Christian K, Lu B. BDNF: a key regulator of protein synthesis dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol. Learn. Mem.* 89: 312–323, 2008.

M

Machon RA, Mednick SA, Huttunen MO. Adult Major Affective Disorder After Prenatal Exposure to an Influenza Epidemic. *Arch. Gen. Psychiatry.* 54: 322-328, 1997.

Maddock RJ. The retrosplenial cortex and emotion: new insights from functional neuroimaging of the human brain. *Trends Neurosci.* 22: 310-316, 1999.

Maguire EA. The retrosplenial contribution to human navigation: a review of lesion and neuroimaging findings. *Scand J Psychol.* 42(3):225-38, 2001.

Mäki P, Veijola J, Jones PB, Murray GK, Koponen H, Tienari P, Miettunen J, Tanskanen P, Wahlberg K-E, Koskinen J, Lauronen E, Isohanni M. Predictors of schizophrenia - a review. *Br. Med. Bull.* 73(74): 1–15, 2005.

Malhotra AK, Adler CM, Kennison SD, Elman I, Pickar D, Breier A. Clozapine blunts N-methyl-D-aspartate antagonist-induced psychosis: a study with ketamine. *Biol Psychiatry.* 42(8): 664-8, 1997.

Marcus MM, Jardemark KE, Wadenberg ML, Langlois X, Hertel P, Svensson TH. Combined alpha2 and D2/3 receptor blockade enhances cortical glutamatergic transmission and reverses cognitive impairment in the rat. *Int J Neuropsychopharmacol.* 8(3):315-27, 2005.

Marenco S, Weinberger DR. The neurodevelopmental hypothesis of schizophrenia: Following a trail of evidence from cradle to grave. *Development and Psychopathology.* 12: 501–527, 2000.

Marenco S, Stein JL, Savostyanova AA, Sambataro F, Tan HY, Goldman AL, Verchinski BA, Barnett AS, Dickinson D, Apud JA, Callicott JH, Meyer-Lindenberg A, Weinberger DR. Investigation of anatomical thalamo-cortical connectivity and fMRI activation in schizophrenia. *Neuropsychopharmacol.* 37(2):499-507, 2012.

Matsuki H, Shirayama Y, Hashimoto K, Tanaka A, Minabe Y. Effects of Age and Gender on the Expression of Brain-Derived Neurotrophic Factor mRNA in Rat Retrosplenial Cortex Following Administration of Dizocilpine. *Neuropsychopharmacol.* 25 (2): 258-266, 2001.

McGorry PD, Hickie IB, Yung AR, Pantelis C, Jackson HJ. Clinical staging of psychiatric disorders: a heuristic

framework for choosing earlier, safer and more effective interventions. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* 40, 616–622, 2006.

McGrath JJ, Susser ES. New directions in the epidemiology of schizophrenia. *MJA* 190: 7–9, 2009.

Melancon BJ, Tarr JC, Panarese JD, Wood MR, Lindsley CW. Allosteric modulation of the M1 muscarinic acetylcholine receptor: improving cognition and a potential treatment for schizophrenia and Alzheimer's disease. *Drug Discov Today*. 18(0): 18(23-24):1185-99, 2013.

Meltzer HY, Massey BW. The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs. *Curr. Op. Pharmacol.* 11: 59-67, 2011.

Merritt K, Egerton A, Kempton MJ, Taylor MJ, McGuire PhK. Nature of Glutamate Alterations in Schizophrenia A Meta-analysis of Proton Magnetic Resonance Spectroscopy Studies. *JAMA Psychiatry*, 2016.

Michal P, Lysikova M, El-Fakahany E, Tucek S. Clozapine interaction with the M and M subtypes of muscarinic 2 y 4 receptors. *Eu. J. Pharmacol* 376: 119–125, 1999.

Miyamoto S, Miyake N, Jarskog LF, Fleischhacker WW, Lieberman JA. Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents. *Molecular Psychiatry* 17: 1206-1227, 2012.

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

Moghaddam B, Jackson ME. Glutamatergic animals models of schizophrenia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1003: 131-137, 2003.

Montgomery KC, Monkman JC. The relation between fear and exploratory behavior, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 48: 132-136, 1955.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12:529–540, 1994.

Morgan CJ, Mofeez A, Brandner B, Bromley L, Curran HV. Acute effects of ketamine on memory systems and psychotic symptoms in healthy volunteers. *Neuropsychopharmacology* 29: 208-218, 2004.

Morgan CJ, Muetzelfeldt L, Curran HV. Consequences of chronic ketamine self-administration upon neurocognitive function and psychological wellbeing: a 1-year longitudinal study. *Addiction*. 105(1):121-33, 2010.

Morton SM, Bastian AJ. Relative contributions of balance and voluntary leg-coordination deficits to cerebellar gait ataxia. *J Neurophysiol*. 89:1844–1856, 2003.

N

Nakki R, Sharp FR, Sagar SM. FOS Expression in the Brainstem and Cerebellum Following Phencyclidine and MK801. *J. Neurosc. Res.* 43:203-212, 1996.

Nasrallah H, Tandon R, Keshavan M. Beyond the facts in schizophrenia: closing the gaps in diagnosis, pathophysiology, and treatment. *Epidemiology and Psychiatric Sciences* 20: 317–327, 2011.

Neill JC, Samuel Barnes, Samantha Cook, Ben Grayson, Nagi F. Idris, Samantha L. McLean, Shikha Snigdha, Lakshmi Rajagopal, Michael K. Harte. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: Focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacology & Therapeutics* 128; 419–432, 2010.

Ni Y, Malarkey E B, Parpura V. Vesicular release of glutamate mediates bidirectional signaling between astrocytes and neurons. *J. Neurochem.* 103: 1273-1284, 2007.

Nikiforuk A, Tomasz Kos, Katarzyna Fijał, Małgorzata Hołuj, Dominik Rafa, Piotr Popik. Effects of the Selective 5-HT₇ Receptor Antagonist SB-269970 and Amisulpride on Ketamine-Induced schizophrenia-like

Deficits in Rats. PlosOne. 8 (6): 1-12, 2013.

Nopoulos PC, Ceilley JW, Gailis EA, Andreasen NC. MRI study of cerebellar vermis morphology in patients with schizophrenia: evidence in support of the cognitive dysmetria concept. Biol Psychiatry. 46:703–711, 1999.

Nowak K, Meyza K, Nikolaev E, Hunt MJ, Kasicki S. Local blockade of NMDA receptors in the rat prefrontal cortex increases c-Fos expression in multiple subcortical regions. Acta Neurobiol Exp (Wars). 72(3):207-18, 2012.

Nutt DJ, Need AC. Where now for schizophrenia research? Eur Neuropsychopharmacol. 24(8):1181-7, 2014.

O

Olney JW, Labruyere J, Price MT. Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs. Science 244: 1360-1362. 1989.

Owen MJ, Sawa A, Mortensen PB. Schizophrenia. Lancet 388 (10039):86-97, 2016.

P

Pachernegg S, Strutz-Seebohm N, Hollmann M. GluN3 subunit-containing NMDA receptors: not just one-trick ponies. Trends in Neurosc. 35(4): 240-49, 2012.

Palmer BA, Pankratz VS, Bostwick JM. The lifetime risk of suicide in schizophrenia-a reexamination. Arch. Gen. Psychiatry 62: 247-253, 2005.

Paoletti P, Neyton J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. Curr. Op. Pharmacol. 7:39–47, 2007.

Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER. Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16: 1137–1145, 1996.

Park J, Kile BM, Wightman RM. In vivo voltammetric monitoring of norepinephrine release in the rat ventral bed nucleus of the stria terminalis and anteroventral thalamic nucleus. *European Journal of Neurosc.* 30: 2121–2133, 2009.

Perez-Neri I, Rami J, Ramirez-Bermudez J, Montes S, Rios C. Possible Mechanisms of Neurodegeneration in Schizophrenia. *Neurochem. Res.* 31:1279–1294, 2006.

Pettersson-Yeo W, Allen P, Benetti S, McGuire P, Mechelli A. Dysconnectivity in schizophrenia: where are we now? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 35(5): 1110–1124, 2011.

Paxinos G. Talamus. *The rat Nervous System*, 3th edn. Academic Press, San Diego, 407-441, 2004.

Perry TL. Normal cerebrospinal fluid and brain glutamate levels in schizophrenia do not support the hypothesis of glutamatergic neuronal dysfunction. *Neurosci Lett.* 28:81–85, 1982.

Picard H, Amado I, Mouchet-Mages S, Olié JP, Krebs MO. The role of the cerebellum in schizophrenia: an update of clinical, cognitive, and functional evidences. *Schizophr Bull.* 34:155–172, 2008.

Pilowsky LS, Bressan RA, Stone JM, Erlandsson K, Mulligan RS, Krystal JH, Ell PJ. First in vivo evidence of an NMDA receptor deficit in medication-free schizophrenic patients. *Mol Psychiatry.* 11(2):118-9, 2006.

Pratt JA, Morris BJ. The thalamic reticular nucleus: A functional hub for thalamocortical network dysfunction in schizophrenia and a target for drug discovery. *Journal of Psychopharmacology.* 29(2):127-37, 2015.

Purohit DP, Perl DP, Haroutunian V, Powchik P, Davidson M, Davies KL. Alzheimer disease and related neurodegenerative diseases in elderly patients with schizophrenia—a postmortem neuropathologic study of 100 cases. *Arch. Gen. Psychiatry* 55: 205–211, 1998.

R

Reynolds GP, Neill JC. Modelling the cognitive and neuropathological features of schizophrenia with phencyclidine. *J Psychopharmacol* 30, 1141-1144, 2016.

Richeri A, Bianchimano P, Mármol NM, Viettro L, Cowen T, Brauer M. Plasticity in rat uterine sympathetic nerves: the role of TrkA and p75 nerve growth factor receptors. *J. Anat.* 207: 125–134, 2005.

Richeri A, Bianchimano P, Crutcher KA, Brauer M. Reduced sympathetic neurite outgrowth on uterine tissue sections from rats treated with estrogen. *Cell Tissue Res.* 340. 287–301, 2010.

Rieck RW, Ansari MS, Whetsell WO Jr, Deutch AY, Kessler RM. Distribution of dopamine D2-like receptors in the human thalamus: autoradiographic and PET studies. *Neuropsychopharmacology* 29:362–372, 2004.

Rodriguez JJ, Harun N. Noristani, Walter B. Hoover, Stephanie B. Linley, Robert P. Vertes. Serotonergic projections and serotonin receptor expression in the reticular nucleus of the thalamus in the rat. *Synapse.* 65(9):919-28, 2011.

Rubio MD, Drummond JB, Meador-Woodruff JH. Glutamate Receptor Abnormalities in Schizophrenia: Implications for Innovative Treatments. *Biomol. Ther.* 20(1): 1-18, 2012.

Rujescu D, Bender A, Keck M, Hartmann AM, Ohi F, Raeder H, Giegling I, Genius J, McCarley RW, Möller H, Grunze H. A Pharmacological Model for Psychosis Based on N-methyl-D-aspartate Receptor Hypofunction: Molecular, Cellular, Functional and Behavioral Abnormalities. *Biol. Psych.* 59:721–729, 2006.

Rung JP, Carlsson A, Ryden Markinhuhta K, Carlsson ML. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psy.* 29: 827 – 832, 2005.

S

Salt TE, Eaton SA. Functions of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in sensory transmission in the mammalian thalamus. *Prog. Neurobiol.* 48: 55 – 72, 1996.

Santana N, Troyano-Rodriguez E, Mengod G, Celada P, Artigas F. Activation of Thalamocortical Networks by the N-methyl-D-aspartate Receptor Antagonist Phencyclidine: Reversal by Clozapine. *Biol. Psychiatry* 69: 918-927, 2011.

Sanz-Clemente A, Nicoll RA, Roche KW. Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neuroscientist.* 19(1): 62–75, 2013.

Sacchetti B, Baldi E, Lorenzini CA, Bucherelli C. Cerebellar role in fear-conditioning consolidation. *PNAS.* 99(12): 8406-11, 2002.

Sacchetti B, Scelefo B, Strata P. Cerebellum and emotional behavior. *Neuroscience* 162: 756 –762, 2009.

Schmitt A, Zink M, Petroianu G, May B, Braus DF, Henn FA. Decreased gene expression of glial and neuronal glutamate transporters after chronic anti-psychotic treatment in rat brain. *Neurosci Lett.* 347:81–84, 2003.

Schneider JS, Wade T, Lidsky TI. Chronic neuroleptic treatment alters expression of glial glutamate transporter GLT-1 mRNA in the striatum. *Neuroreport.* 9:133–136, 1998.

Schneider TP, Dwork AJ. Searching for Neuropathology: Gliosis in Schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* 69(2): 134–139, 2011.

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

Scorza MC, Castañé A, Bortolozzi A, Artigas F. Clozapine does not require 5-HT1A receptors to block the locomotor hyperactivity induced by MK-801 Clz and MK-801 in KO1A mice. *Neuropharmacol.* 59: 112-120,

2010.

Sharp JW, Williams DS. Effects of sigma ligands on the ability of rimcazole to inhibit PCP hsp70 induction. *Brain Res. Bull.* 39: 359–366, 1997.

Sharp F, Tomitaka M, Bernaudin M, Tomitaka S. Psychosis: pathological activation of limbic thalamocortical circuits by psychomimetics and schizophrenia? *Trends in Neurosci.* 24: 330-4, 2001.

Shenton ME, Dickey ChC, Frumin M, McCarley RW. A review of MRI findings in schizophrenia. *Schizophr Res.* 49(1-2): 1–52, 2001.

Shepherd AM, Laurens KR, Matheson SL, Carr VJ, Green MJ. Systematic meta-review and quality assessment of the structural brain alterations in schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev.* 2012; 36:1342–1356.

Sherman SM, Guillery RW. The role of the thalamus in the flow of information to the cortex. *Phil. Trans.R.Soc.Lond.B* 357: 1695–1708, 2002.

Shibata H. Organization of projections of rat retrosplenial cortex to the anterior thalamic nuclei. *Eur J Neurosci.* (10): 3210-9, 1998.

Shibata H, Naito J. Organization of anterior cingulate and frontal cortical projections to the anterior and laterodorsal thalamic nuclei in the rat. *Brain Res* 1059:93–103, 2005.

Sikes RW, Vogt BA. Afferent connections of anterior thalamus in rats: sources and association with Muscarinic Acetylcholine receptors. *J. Comparative neurology* 256: 538-551, 1987.

Silva G, Coelho N, Soares de Sousa C, de Queiroz T, lopes L, Freitas D, Severino C, Macedo D, Mendes S. Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: Participation of antioxidant, nitrenergic and neurotrophic mechanisms. *Sch. Res.* 165: 163-170, 2015.

Smith JW, Gastambide F, Gilmour G, Dix S, Foss J, Lloyd K, Malik N, Tricklebank M. A comparison of the effects of ketamine and phencyclidine with other antagonists of the NMDA receptor in rodent assays of attention and working memory. *Psychopharmacol.* 217(2): 255–269, 2011.

Snigdha Sh, Neill JC, McLean SL, Shemar GK, Cruise L, Shahid M, Henry B. Phencyclidine (PCP)-Induced disruption in cognitive performance is gender-specific and associated with a reduction in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in specific regions of the female rat brain. *J. Mol. Neurosci.* 43:337-345, 2011.

Strata P. The Emotional Cerebellum. *Cerebellum.* 14(5):570-7, 2015.

Sullivan PF, Kendler KS, Neale MC. Schizophrenia as a complex trait. Evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch. Gen. Psychiatry.* 60:1187-1192, 2003.

Sullivan PF. The Genetics of Schizophrenia. *PLoS Med.* 2(7): 212, 2005.

Suryavanshi PS, Ugale RR, Yilmazer-Hanke D, Stairs DJ, Dravid M. GluN2C/GluN2D subunit-selective NMDA receptor potentiator CIQ reverses MK-801-induced impairment in prepulse inhibition and working memory in Y-maze test in mice. *Br. J. Pharmacol.* 171: 799–809, 2014.

Suzuki Y, Jodo E, Takeuchi S, Niwa S, Kayama Y. Acute administration of phencyclidine induces tonic activation of medial prefrontal cortex neurons in freely moving rats. *Neurosci.* 114(3): 769-779, 2002.

T

Tanahashi Sh, Yamamura S, Nakagawa M, Motomura E, Okada M. Clozapine, but not haloperidol, enhances glial D-serine and L-glutamate release in rat frontal cortex and primary cultured astrocytes, *Br. J. Pharmacol.* 165: 1543–1555, 2012.

Tandon R, Nasrallah HA, Keshavan MS. Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophrenia Res.* 110: 1–23, 2009.

Timmann D, Daum I. Cerebellar contributions to cognitive functions: a progress report after two decades of research. *Cerebellum*. 6:159–162, 2007.

Todd TP, Bucci DJ. Retrosplenial Cortex and Long-Term Memory: Molecules to Behavior. *Neural Plasticity* 2015 (414173): 1-9, 2015.

Tomitaka S, Tomitaka M, Tolliver BK, Sharp FR. Bilateral blockade of NMDA receptors in anterior thalamus by dizocilpine (MK-801) injures pyramidal neurons in rat retrosplenial cortex. *European J. Neurosci*. 12: 142030, 2000.

Totterdell S, Meredith GE. Topographical organization of projections from the entorhinal cortex to the striatum of the rat. *Neuroscience* 78: 715–729, 1997.

Traynelis S. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 62: 405-496, 2010.

Troyano-Rodriguez E, Lladó-Pelfort L, Santana N, Teruel-Martí V, Celada P, Artigas F. Phencyclidine Inhibits the Activity of Thalamic Reticular Gamma-Aminobutyric Acidergic Neurons in Rat Brain. *Biol. Psychiatry*. 76 (12): 937-945, 2014.

Tricklebank MD, Forler C, Fozard JR. The involvement of subtypes of the 5-HT₁ receptor and of catecholaminergic systems in the behavioural response to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the rat. *Eu. J. Pharmacol.* 106: 271–282, 1985.

Tsanov M, Wright N, Vann SD, Erichsen JT, Aggleton P, O'mara SM. Hippocampal inputs mediate theta-related plasticity in Anterior thalamus. *Neuroscience* 187: 52-62, 2011.

Tsuang M. Schizophrenia: Genes and Environment. *Biol Psychiatry* 47:210 –220, 2000.

Turner JP, Salt TE. Characterization of sensory and corticothalamic excitatory inputs to rat thalamocortical neurones in vitro. *J. Physiol.* 510 (3): 829—843, 1998.

Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning, *Learn. Mem.* 9: 224–237, 2002.

V

Vallejo-Illarramendi A, Torres-Ramos M, Melone M, Conti F, Matute C. Clozapine reduces GLT-1 expression and glutamate uptake in astrocyte cultures. *Glia.* 50:276–279, 2005.

Väisänen J, Ihalainen J, Tanila H, Castren E. Effects of NMDA-Receptor Antagonist Treatment on c-fos Expression in Rat Brain Areas Implicated in Schizophrenia. *Cell. Mol. Neurobiol.* 24(6):769-80, 2004.

Van den Heuvel MP, Fornito A. Brain Networks in Schizophrenia. *Neuropsychol. Rev.* 24:32–48, 2014.

Van Groen T, Kadish I, Wyss JM. Efferent connections of the anteromedial nucleus of the thalamus of the rat. *Brain Res. Rev.* 30: 1–26, 1999.

Van Groen T, Kadish I, Wyss JM. Retrosplenial cortex lesions of area Rgb (but not of area Rga) impair spatial learning and memory in the rat. *Behavioural Brain Research* 154: 483–491, 2004.

Vann SD, Brown MW, Aggleton JP. Fos expression in the rostral thalamic nuclei and associated cortical regions in response to different spatial memory tests. *Neuroscience.* 101(4): 983-91, 2000.

Vann SD, Aggleton J.P. Testing the importance of the retrosplenial guidance system: effects of different sized retrosplenial cortex lesions on heading direction and spatial working memory. *Behav. Brain Res.* 155: 97–108, 2004.

Vann SD, Saunders RC, Aggleton JP. Distinct, parallel pathways link the medial mammillary bodies to the anterior thalamus in macaque monkeys. *Eur J Neurosci* 26:1575–1586, 2007.

Varnäs K, Thomas DR, Tupala E, Tiihonen J, Hall H. Distribution of 5-HT₇ receptors in the human brain: a preliminary autoradiographic study using [3H]SB-269970. *Neurosci Lett* 367: 313–316, 2004.

Vollenweider FX, Leenders KL, Scharfetter C, Antoninib A, Maguireb P, MissimerbJ, Angsta J. Metabolic hyperfrontality and psychopathology in the ketamine model of psychosis using positron emission tomography (PET) and 18F]fluorodeoxyglucose (FDG). *Eur Neuropsychopharmacol* 7:9-24, 1997.

W

Watis L, Chen SH, Chua HC, Chong SA, Sim K. Glutamatergic abnormalities of the thalamus in schizophrenia: a systematic review. *J Neural Transm* 115: 493-11, 2008.

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

Wenzel A, Fritschy MJ, Mohler H, BenkeD. NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J.Neurochem* 68(2):469-78, 1997.

Wiechelman KJ, Braun RD, Fitzpatrick JD. Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay: Identification of the Groups Responsible for Color Formation. *An. Biochem.* 175: 231-237, 1988.

Wozniak DF, Olney JW, Kettinger L, Price M, Miller JP. Behavioral effects of MK-801 in the rat. *Psychopharmacol. (Berl)* 101(1): 47-56, 1990.

Wright NF, Erichsen JT, Vann SD, O'Mara SM, Aggleton JP. Parallel but separate inputs from limbic cortices to the mammillary bodies and anterior thalamic nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 518:2334–2354, 2010.

Wray NR, Vissche PM. Narrowing the Boundaries of the Genetic Architecture of Schizophrenia. *Sch. Bull.* 36(1): 14–23, 2010.

Woo TW, Kim AM, Viscidi E. Disease-specific alterations in glutamatergic Neurotransmission on inhibitory interneurons in the Prefrontal cortex in schizophrenia. *Brain Res.* 1218: 267–277, 2008.

Y

Yamamoto H, Kamegaya E, Sawada W, Hasegawa R, Yamamoto T, Hagino Y, Takamatsu Y, Imai K, Koga H, Mishina M, Ikeda K. Involvement of the N-methyl-D-aspartate receptor GluN2D subunit in phencyclidine-induced motor impairment, gene expression, and increased Fos immunoreactivity. *Mol. Brain*, 6: 56, 2013.

Yang SY, Hong CJ, Huang YH, Tsai SH. The effects of glycine transporter I inhibitor, N-methylglycine (sarcosine), on ketamine-induced alterations in sensorimotor gating and regional brain c-Fos expression in rats. *Neurosc. Lett.* 469: 127–130, 2010.

Yang YJ, Li YK, Wang W, Wan JG, Yua YB, Wang MZ, Hu B. Small-molecule TrkB agonist 7,8-dihydroxyflavone reverses cognitive and synaptic plasticity deficits in a rat model of schizophrenia, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 122: 30–36, 2014.

Yeganeh-Doost P, Gruber O, Falkai P, Schmitt A. The role of the cerebellum in schizophrenia: from cognition to molecular pathways. *Clinics* 66:71-77, 2011.

Yohn SE, Conn PJ. Positive allosteric modulation of M1 and M4 muscarinic receptors as potential therapeutic treatments for schizophrenia. *Neuropharmacol.* 136: 438–448, 2018.

Young K.A., Manaye K.F., Liang C., Hicks P.B., German D.C. Reduced number of mediodorsal and anterior thalamic neurons in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 47 (11), 944-953, 2000.

Yun S, Reynolds R P, Petrof I, White A, Rivera PhD, Segev A, Gibson AD, Suarez M, DeSalle MJ, Ito N, Mukherjee Sh, Richardson DR, Kang CE, Ahrens-Nicklas RC, Soler I, Chetkovich DM, Kourrich S, Coulter DA, Eisch AJ. Stimulation of entorhinal cortex–dentate gyrus circuitry is antidepressive. *Nature Med.* 24: 658–666, 2018.

Z

Zakowski W. Neurochemistry of the Anterior Thalamic Nuclei. *Mol Neurobiol.* 54:5248–5263 DOI

10.1007/s12035-016-0077-y, 2017.

Zhang Y, Llinas R, Lisman J. Inhibition of NMDARs in the nucleus reticularis of the thalamus produces delta frequency bursting. *F Neural Circ* 3(20): 1-9, 2009.

Zhang Y, Buonanno A, Vertes RP, Hoover WB, Lisman JE. NR2C in the Thalamic Reticular Nucleus; Effects of the NR2C Knockout. *PlosOne* 7 (7): e41908, 2012a.

Zhang D, Guo L, Hu X, Li K, Zhao Q, Liu T. Increased cortico-subcortical functional connectivity in schizophrenia. *Brain Imaging Behav* 6(1):27–35, 2012b.

Zhang XY, Wang JJ, Zhu JN. Cerebellar fastigial nucleus: from anatomic construction to physiological functions. *Cerebellum & Ataxias* 3:9, 2016.

Zikopoulos B, Barbas H. Prefrontal Projections to the Thalamic Reticular Nucleus form a Unique Circuit for Attentional Mechanisms. *J. Neurosc.* 26(28):7348 –7361, 2006.

