

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA Biología
Subárea Neurociencias

**APORTES AL ESTUDIO DE LAS BASES NEURALES DE LA SINTOMATOLOGÍA
POSITIVA DE LA ESQUIZOFRENIA Y DE LA ACCIÓN TERAPÉUTICA DE
CLOZAPINA SOBRE LOS TRASTORNOS COGNITIVOS DE LA ENFERMEDAD**

Lic. Ximena López Hill

Orientadora: Dra. Cecilia Scorza

Laboratorio de Biología Celular
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Diciembre 2012

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	4
<i>Patología de la esquizofrenia.....</i>	<i>4</i>
<i>Características generales.....</i>	<i>4</i>
<i>Hipótesis neuroquímicas asociadas a la sintomatología de la esquizofrenia.....</i>	<i>5</i>
<i>Tratamiento de la Esquizofrenia: fármacos antipsicóticos.....</i>	<i>9</i>
<i>Problemática con el tratamiento de la esquizofrenia.....</i>	<i>10</i>
<i>Clozapina: antipsicótico atípico prototípico.....</i>	<i>12</i>
<i>Trastornos cognitivos en esquizofrenia y Clozapina.....</i>	<i>13</i>
<i>Aportes pre-clínicos al estudio de la Esquizofrenia.....</i>	<i>14</i>
<i>Modelos animales para el estudio de la esquizofrenia.....</i>	<i>14</i>
<i>Características generales de los receptores NMDA.....</i>	<i>15</i>
<i>Antagonistas del receptor NMDA y su relación con los síntomas positivos.....</i>	<i>16</i>
<i>Antagonistas del receptor NMDA y déficit cognitivo.....</i>	<i>17</i>
<i>Antagonistas del receptor NMDA, deterioro del valor de procesamiento sensorial y trastornos afectivos.....</i>	<i>18</i>
<i>Mecanismo de acción propuesto para los efectos inducidos por los antagonistas del receptor NMDA.....</i>	<i>18</i>
<i>Áreas y circuitos vinculados a las acciones de los antagonistas NMDA asociadas a la sintomatología positiva.....</i>	<i>19</i>
II. HIPOTESIS DE TRABAJO.....	23
III. OBJETIVO GENERAL.....	23
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
1. Caracterización del papel del núcleo anterior del tálamo en el síndrome comportamental motor inducido por la administración sistémica de MK- 801.....	23

1.1. Caracterización del síndrome conductual motor inducido por la administración sistémica de MK-801.....	23
1.2. Estudio de la participación del núcleo anterior del tálamo en las conductas motoras inducidas por MK-801 a través de la desinhibición GABAérgica de dicho núcleo.....	23
2. Estudio del efecto de Clozapina sobre las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801.....	23
2.1. Caracterización de las alteraciones conductuales inducidas por la administración sistémica de MK-801 en el modelo de memoria Latencia de transferencia.....	23
2.2. Determinación del bloqueo por Clozapina de las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801.....	23
2.3. Estudio del papel del subtipo de receptor serotoninérgico 5-HT _{1A} en la acción de Clozapina sobre las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801.....	23
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
VI. RESULTADOS I.....	35
1.1. Caracterización del síndrome conductual motor inducido por la administración sistémica de MK-801.....	35
1.2. Estudio de la participación del núcleo anterior del tálamo en las conductas motoras inducidas por MK-801 a través de la inhibición GABAérgica de dicho núcleo.....	37
1.3. Discusión de resultados I.....	41
PUBLICACIÓN CIENTÍFICA.....	46
VII. RESULTADOS II.....	47
2.1. Caracterización de las alteraciones conductuales inducidas por la administración sistémica de MK-801 en el modelo de memoria Latencia de transferencia.....	47
2.2. Determinación del bloqueo por Clozapina de las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801.....	50
2.3. Estudio del papel del subtipo de receptor serotoninérgico 5-HT _{1A} en la acción de Clozapina sobre las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801.....	51
2.4. Discusión de resultados II.....	54
ABSTRACT MANUSCRITO EN PREPARACIÓN.....	57

VIII. CONCLUSIONES GENERALES.....	58
IX. PERSPECTIVAS.....	59
X. CONTRIBUCIONES.....	61
XI. REFERENCIAS.....	62

AGRADECIMIENTOS

A los integrantes del tribunal por sus aportes y correcciones.

A Cecilia por recibirme en el Laboratorio, por la paciencia y dedicación con la que me enseñó y apoyó en cada etapa de este trabajo.

Al grupo del Laboratorio de Biología Celular, María, Jess, José, Martín, Analía, Pao, Gaby, Pato y Mónica, por todo lo compartido y por estar siempre dispuestos a darme una mano.

A Héctor, Carmen y Martín por su trabajo y cuidado con los animales.

A mi familia por su apoyo y especialmente a Peti, Ana, Mainé, Stellita, Ma. del Carmen y Gustavo porque en este tiempo me brindaron una ayuda incalculable lo que me permitió estar hoy acá.

A mi grupo de amigas, incondicionales en todo momento.

A mis padres y hermanas, porque siempre están ahí, porque siempre me apoyan y me animan a seguir adelante.

A Pancho, porque este fue y es un trabajo de a dos y soy feliz porque él quiera acompañarme.

A mis hijos, Mili, Jóse y Lucas porque los quiero y porque hacen que cada día de mi vida sea especial.

ABREVIATURAS

AT: Antipsicótico típico

AAT: Antipsicótico atípico

ATN: Núcleo anterior del tálamo

ATV: Area tegmental ventral

CA: Campo abierto

Clz: Clozapina

CPF: Corteza prefrontal

DAérgica: Dopaminérgica

DA: Dopamina

D2: Receptores dopaminérgico subtipo D2

GLUérgica: Glutamatérgica

LT: Latencia de transferencia

NAc: Núcleo Accumbens

NMDA: N-Metil-D-Aspartato

MDT: Núcleo medio dorsal del tálamo

PCP: Fenciclidina

RT: Núcleo reticular del tálamo

RSC: Corteza retrosplenial

SNC: Sistema Nervioso Central

5-HT: Serotonina

5-HT_{1A}: Receptor Serotoninérgico subtipo 1A

5-HT_{2A}: Receptor Serotoninérgico subtipo 2A

5-HTérgica: Serotoninérgica

RESUMEN

La esquizofrenia es una patología neuropsiquiátrica crónica y grave, de etiología aún desconocida. Se caracteriza por la presencia de síntomas positivos (psicosis), negativos (asilamiento social), trastornos afectivos y cognitivos. Los mismos persisten en la mayoría de los individuos afectados a lo largo de su vida. Comprender la neurobiología de base en esta patología así como mejorar su terapéutica continúa siendo un gran desafío clínico y preclínico.

Una de las principales hipótesis propuestas en la literatura postula que alteraciones en la transmisión glutamatérgica (GLUérgica) estarían en la base fisiopatológica de la enfermedad. La misma se basa en que, en humanos, el consumo de antagonistas de receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA), tales como fenciclidina y ketamina, generan síntomas similares a los observados en la enfermedad. Específicamente, una hipofunción GLUérgica mediada por el receptor NMDA estaría involucrada en la esquizofrenia. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a esta disfunción aún continúan bajo estudio.

Los antagonistas NMDA son drogas ampliamente utilizadas como herramientas farmacológicas para estudiar las bases neurales de la sintomatología de la esquizofrenia y del mecanismo de acción de los fármacos antipsicóticos. La administración sistémica en roedores de dizocilpina (MK-801), el antagonista NMDA más potente, induce un síndrome conductual motor caracterizado por hiperlocomoción, estereotipias y signos de ataxia el cual se utiliza como modelo preclínico para estudiar la sintomatología positiva presente en la patología. A su vez, MK-801 produce alteraciones en el aprendizaje y la memoria que modelan alguno de los trastornos cognitivos de la patología. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales los antagonistas NMDA ejercen sus acciones aún no se han elucidado completamente. En particular, en relación a la sintomatología positiva, en la literatura se plantea una desinhibición GABAérgica como principal mecanismo involucrado, aunque los circuitos subyacentes continúan bajo estudio. Determinar aquellos circuitos neurales mediados por una transmisión GLUérgica NMDA y que impliquen un control GABAérgico, aportaría información valiosa al estudio de las bases neurales alteradas en la patología de la esquizofrenia.

El antipsicótico atípico Clozapina (Clz), es efectivo en el tratamiento de la sintomatología positiva y, a diferencia de los antipsicóticos típicos, mejora sustancialmente las alteraciones cognitivas que padecen los pacientes. Su perfil de atipicidad se explicaría por su mayor afinidad por el receptor serotoninérgico 5-HT_{2A} comparado con el dopaminérgico D₂. Sin embargo, Clz también posee afinidad por otros receptores aminérgicos, entre los que el subtipo de receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} parece ser un candidato mediando la mejoría cognitiva inducida por Clz. Sin embargo, es necesario aportar más información sobre este mecanismo de acción.

En el primer objetivo de la Tesis se estudió la participación del núcleo anterior del tálamo (ATN) en las bases neurales de la sintomatología positiva de la esquizofrenia. La actividad del ATN está determinada mayormente por aferencias GABAérgicas provenientes del núcleo reticular del tálamo (RT). Nos basamos en la hipótesis de que la inyección sistémica de MK-801 bloquea receptores NMDA principalmente expresados en las neuronas GABAérgicas del RT, disminuyendo así la inhibición sobre las neuronas del ATN y promoviendo la aparición del síndrome conductual motor. Animales implantados con cánulas bilaterales en el ATN fueron microinyectados con muscimol (agonista GABA_A) o salino y MK-801 intraperitonealmente. Luego, mediante el uso del modelo de campo abierto se evaluaron los parámetros de actividad locomotora, patrón motor, estereotipias y signos de ataxia. MK-801 indujo el síndrome conductual motor en animales microinyectados con salino en el ATN mientras que muscimol intra-ATN bloqueó la mayoría de las conductas inducidas por MK-801 demostrando la participación del ATN en el síndrome comportamental del antagonista NMDA. A su vez, se demostró que la desinhibición del ATN (posiblemente vía RT), mediada por receptores GABA_A, subyace a las acciones motoras de MK-801 confirmando la hipótesis de la desinhibición GABAérgica en el mecanismo de acción del antagonista NMDA.

En el segundo objetivo se estudió la participación del receptor 5-HT_{1A} en la capacidad de Clz de bloquear las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801 utilizando el modelo de aprendizaje y memoria Latencia de Transferencia. Un grupo de animales fue tratado con Clz y MK-801 o sus respectivos vehículos (grupo control) para luego registrar el parámetro de latencia de transferencia (seg) en el laberinto en cruz elevado, durante tres días consecutivos (LT1, LT2, LT3). Se demostró que MK-801 indujo un efecto amnésico el cual fue antagonizado por la administración previa de Clz. La participación del receptor 5-HT_{1A} se evaluó mediante el co-tratamiento de WAY-100635, un antagonista selectivo 5-HT_{1A}, seguido de Clz y finalmente de MK-801. Los resultados mostraron que WAY-100635 previno el bloqueo por Clz del efecto amnésico inducido por MK-801, confirmando el papel del receptor 5-HT_{1A} en el mecanismo de acción de Clz.

Las evidencias obtenidas en el presente trabajo de tesis aportan valiosa información en la comprensión de las bases neurales alteradas en sintomatología positiva de la esquizofrenia, así como en la búsqueda de nuevos tratamientos dirigidos a mejorar los trastornos cognitivos de la patología.

I. INTRODUCCIÓN

PATOLOGÍA DE LA ESQUIZOFRENIA

Características generales

La esquizofrenia es un desorden mental crónico y severo que afecta los atributos humanos más fundamentales tales como la percepción de la realidad, el sentido de sí mismo, otras funciones cognitivas y el afecto.

La prevalencia de la enfermedad en la población mundial es de aproximadamente un 1 % [Saha S 2005]. Según un informe de la Organización Mundial de la Salud 2001, si se tiene en cuenta la tasa de discapacidad a causa de los trastornos mentales, la esquizofrenia es la séptima causa de años vividos con discapacidad, alcanzando un porcentaje de 2,8 % en el total de enfermedades psiquiátricas. Hasta nuestro conocimiento no existen datos epidemiológicos publicados indicando la incidencia y/o prevalencia de la esquizofrenia en el Uruguay. Sin embargo, un informe de la Organización Panamericana de la Salud publicado por Kohn y Rodríguez (2009) reporta que Uruguay en el año 2002 tuvo una carga de morbilidad causada por la esquizofrenia del 1,5 % de AVAD (Años de vida ajustados en función de la discapacidad; un AVAD representa un año de vida sana perdido).

La esquizofrenia es una patología de etiología aún desconocida, aunque se considera que, una alta predisposición genética, trastornos en el desarrollo así como la exposición a ciertos factores ambientales podrían contribuir en el desarrollo de la enfermedad [Tsuang M 2000].

Las primeras manifestaciones clínicas de la enfermedad aparecen en la segunda o tercera década de vida de los individuos afectados. Estas manifestaciones se presentan como un conjunto de síntomas que se clasifican en cuatro categorías: síntomas positivos, negativos, afectivos y trastornos cognitivos. Los **síntomas positivos**, también denominados síntomas psicóticos, incluyen alucinaciones (visuales y auditivas) o falsas percepciones, delirios y paranoia. Los **síntomas negativos** reflejan el aspecto más complejo de la esquizofrenia, los cuales a menudo preceden el comienzo de la sintomatología positiva. Se caracterizan por la presencia de apatía, pérdida de motivación y un grave aislamiento social el cual dificulta una correcta integración en la sociedad del individuo. La depresión, es uno de los **trastornos afectivos** más comunes en la esquizofrenia. Por su similitud, tanto los síntomas negativos como los afectivos son difíciles de distinguir o diagnosticar en la patología. Los **trastornos cognitivos** implican alteraciones en alguna de las funciones cognitivas básicas tales como la atención/vigilancia, memoria (en su incapacidad por aprender nueva información o en la evocación de tareas o información aprendida previamente) y en las funciones ejecutivas (especialmente en la memoria de trabajo, en la capacidad de planificar, iniciar y regular las conductas dirigidas a objetivos) [Lewis DA 2004]. Estos trastornos

son un tema de estudio de creciente interés a nivel clínico y pre-clínico debido al gran deterioro funcional que generan en los pacientes y a la baja eficacia alcanzada por los tratamientos actuales. 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 esquizofrénicos [Lewis DA 2000; Kapur S 2001]. A pesar de que hoy en día se ofrecen las mejores combinaciones en las intervenciones clínicas para las personas que padecen esquizofrenia, los síntomas persisten en un gran número de pacientes. Incluso, se ha estimado que mejorando la eficiencia en los servicios prestados ofrecidos en la actualidad en la máxima capacidad posible, tres cuartas partes de la carga total de la esquizofrenia en la población persistiría [Saha S 2005]. Esto pone en evidencia la necesidad de continuar invirtiendo en la formación de recursos humanos en la investigación básica y clínica de la enfermedad.

Hipótesis neuroquímicas asociadas a la sintomatología de la esquizofrenia

Con el fin de comprender la causa de la generación de los diferentes síntomas de la enfermedad, se han propuesto una serie de hipótesis, basadas en la alteración de los distintos sistemas de neurotransmisión. Dos hipótesis que históricamente han dominado la literatura, son la dopaminérgica (DAérgica) y la glutamatérgica (GLUérgica). Sin embargo, hace algunos años las hipótesis serotoninérgica (5-HTérgica) y GABAérgica han ido ganado mayor apoyo.

a. Hipótesis DAérgica

La hipótesis DAérgica fue postulada inicialmente por Arvid Carlsson en 1978, dominando la investigación de la esquizofrenia durante varias décadas. La postulación de dicha hipótesis se basó en una serie de evidencias clínicas que mostraban que el consumo de drogas estimulantes como la anfetamina y la cocaína (drogas que aumentan la transmisión DAérgica) inducía psicosis en personas sanas y desencadenaban síntomas psicóticos en pacientes esquizofrénicos. A su vez, más adelante, a través de estudios de neuroimagen se pudo observar que individuos con esta enfermedad presentaban una mayor liberación de Dopamina (DA) en el estriado como respuesta a la administración de anfetamina evidenciando una alteración específica sobre este sistema de neurotransmisión [Laruelle M 1996]. Por otro lado, los antipsicóticos típicos (ver más adelante) utilizados en la clínica, los cuales poseen la propiedad de ser potentes antagonistas de receptores DAérgicos, en particular del tipo D₂, bloquean estos síntomas, existiendo una alta correlación entre su afinidad por los receptores D₂ y la aparición de su efecto terapéutico.

Posteriormente la hipótesis DAérgica fue reformulada y fue Weinberger (1994) quien planteó que un exceso en la transmisión DAérgica en la vía mesolímbica estaría asociado a la aparición de la sintomatología positiva, mientras que una hipofunción

DAérgica en la vía mesocortical explicaría la sintomatología negativa y cognitiva de la patología. Cabe mencionar que la vía mesolímbica es una de las principales vías DAérgicas ascendentes, cuyas neuronas surgen del Área Tegmental Ventral (ATV) proyectando hacia el Estriado ventral o Núcleo Accumbens (NAc). Dicha vía se halla vinculada a los procesos de recompensa y motivación de factores naturales o drogas de abuso. La vía DAérgica mesocortical, conformada por las proyecciones DAérgicas del ATV alcanzando la Corteza Prefrontal (CPF) participa principalmente en los procesos cognitivos de atención, aprendizaje y memoria de trabajo (Figura 1).

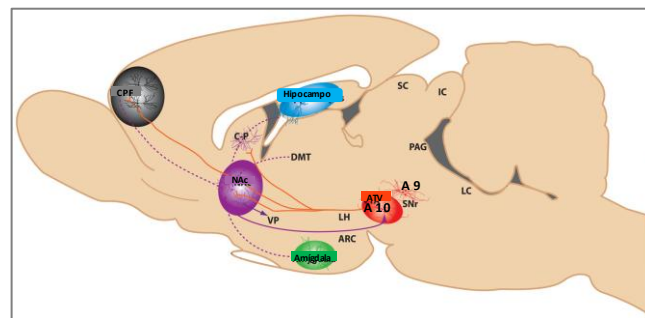


Figura 1. Diagrama de un corte sagital de cerebro de rata indicando la vía mesolímbica conformada por vías DAérgicas del ATV proyectando al NAc (y estructuras adyacentes como la amígdala e hipocampo); la vía mesocortical formada por neuronas DAérgicas de ATV innervando la corteza prefrontal.

Sin embargo, la hipótesis DAérgica es limitada ya que, por un lado, no se han encontrado niveles alterados de DA en estudios post-mortem de pacientes esquizofrénicos. Por otro lado, la sintomatología negativa así como los trastornos cognitivos no son sensibles a los fármacos antipsicóticos típicos (antagonistas D_2). Ambas evidencias sugieren la existencia de mecanismos no-dopaminérgicos en la fisiopatología de la enfermedad [Carlsson A 2001].

b. Hipótesis GLUérgica

La propuesta de que una deficiencia GLUérgica podría estar involucrada en la patología de esquizofrenia fue inicialmente planteada por Kim y cols. en 1980, quienes observaron una disminución significativa en los niveles de glutamato presentes en el líquido cefalorraquídeo de pacientes esquizofrénicos. Más adelante, se planteó la hipótesis GLUérgica la cual surge a partir de evidencias clínicas donde se observó que el consumo de drogas como fenciclidina (PCP) y ketamina, ambos antagonistas no competitivos de los receptores GLUérgicos del tipo N-Metil-D-aspartato (NMDA), inducían síntomas psicóticos, negativos y alteraciones cognitivas en personas sanas al mismo tiempo que exacerbaban este tipo de síntomas en pacientes esquizofrénicos. Esta hipótesis postula que una hipofunción GLUérgica, a través de los receptores

NMDA, estaría involucrada en la fisiopatología de la esquizofrenia [Javitt DC 1991; Lahti AC 2001; Moghaddam B 2003].

Algunos estudios post-mortem, realizados en pacientes esquizofrénicos, identificaron en algunas regiones cerebrales la presencia de alteraciones en la expresión de ciertas subunidades que conforman los receptores NMDA [Akbarian S 1996; Goff DC 2001] así como también un nivel disminuido en la expresión de receptores NMDA en pacientes esquizofrénicos libres de medicación [Pilowsky LS 2006]. Estas evidencias sumadas a la observación de que algunos fármacos antipsicóticos son capaces de bloquear la exacerbación de los síntomas positivos inducidos por ketamina en pacientes esquizofrénicos [Malhorta A 1997], apoyan fuertemente la hipótesis GLUérgica, relacionando una disfunción en los receptores NMDA con la fisiopatología de la esquizofrenia. Sin embargo, a pesar de que la hipótesis se ha establecido en la literatura, los mecanismos que subyacen a la disfunción GLUérgica aún continúan bajo estudio.

c. Hipótesis GABAérgica

La hipótesis GABAérgica propone que una alteración en el funcionamiento de interneuronas corticales inhibitorias GABAérgicas sería un elemento central en la patología de la esquizofrenia [Chattopadhyaya B 2012]. Esta hipótesis surgió de una serie de estudios post-mortem en individuos que habían padecido la patología. En estos estudios se observó la existencia de reducidos niveles de expresión de la enzima GAD 67, una isoforma de la proteína Glutamato Descarboxilasa (GAD), una de las enzimas responsables de la síntesis de GABA. También se observaron reducidos niveles de expresión de GAT1, el transportador de membrana responsable de la recaptación de GABA [Lewis DA 2004; Gonzalez-Burgos G 2010]. De manera interesante, los niveles reducidos para GAD 67 y GAT1 fueron mayormente observados, aunque no exclusivamente, en una clase particular de células GABAérgicas caracterizadas por contener la proteína de unión al calcio parvalbumina (PV). A su vez, alteraciones en la funcionalidad de esta clase de interneuronas se han visto vinculadas a desregulaciones en la actividad de múltiples áreas corticales asociadas al procesamiento y mantenimiento de la información, como en la CPFdorso-lateral e hipocampo, funciones que están particularmente alteradas en pacientes esquizofrénicos [Benes F 2001; Bartos M 2007; Mann EO 2007]. Estas evidencias clínicas sugieren fuertemente que una disfunción en la transmisión GABAérgica estaría relacionada a la sintomatología de la esquizofrenia [Lewis DA 2004; Gonzalez-Burgos G 2010].

d. Hipótesis 5-HTérgica

La vinculación del sistema 5-HTérgico con la sintomatología de la esquizofrenia se basa en dos principales evidencias aunque consideradas indirectas: por un lado, la observación de que agonistas de receptores 5-HTérgicos del tipo 5-HT₂ muestran

propiedades alucinógenas generando alteraciones en la percepción, el humor y en algunos procesos cognitivos [Nichols DE 2004]. Por otro lado, la observación de que los antipsicóticos atípicos (utilizados para el tratamiento de la patología, ver más adelante) poseen alta afinidad por los receptores 5-HTérgicos del subtipo 5-HT_{2A}, asociándola con su principal acción terapéutica [Meltzer HY 2011]. Sin embargo, el hecho de que algunos antipsicóticos atípicos poseen también afinidad por otros subtipos de receptores 5-HTérgicos, tales como el 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆ y 5-HT₇ aportó mayor evidencia a la relación de éste sistema de neurotransmisión con la sintomatología de la enfermedad.

Si bien las hipótesis neuroquímicas planteadas buscan explicar la sintomatología de la enfermedad con alteraciones en un único sistema de neurotransmisión, éstas no son excluyentes entre sí. Los sistemas de neurotransmisión se encuentran interconectados, llevando a que una modificación en alguno de ellos pueda desencadenar, a través de mecanismos de adaptación, alteraciones funcionales en los otros [Carlsson A 2001]. A su vez, la esquizofrenia es una patología muy compleja lo cual hace muy poco probable que su amplia y variada sintomatología pueda ser explicada por la disfunción en un único sistema de transmisión. Es así que actualmente existe una visión multifactorial donde el sistema DAérgico así como el GLUérgico, el de otras monoaminas y el GABAérgico estarían altamente vinculados a la sintomatología de la esquizofrenia. Sin embargo, la mayoría de las estrategias experimentales planteadas en la literatura se centran en el abordaje de una de las hipótesis, con el fin de simplificar la obtención de resultados y de dar la posibilidad de encontrar blancos terapéuticos específicos en cada uno de los sistemas de neurotransmisión. A pesar de esta visión multifactorial, en los últimos años, la investigación en esquizofrenia ha estado enfocada en gran medida al estudio de los circuitos GLUérgicos mediados por los receptores NMDA, de esta manera 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 hipofunción GLUérgica, mediada por el receptor NMDA, con el fin de aportar información original a la temática.

TRATAMIENTO DE LA ESQUIZOFRENIA: FARMACOS ANTIPSICÓTICOS

Existen dos clases de fármacos para el tratamiento de la esquizofrenia: **antipsicóticos clásicos o típicos y atípicos**.

a. Antipsicóticos Típicos

Los neurolepticos o antipsicóticos típicos (AT) fueron los primeros fármacos utilizados para el tratamiento de la esquizofrenia; ejemplo de ello lo constituye el Haloperidol, considerado el antipsicótico típico prototípico [Kapur S 2001]. Esta clase de fármacos mejoran significativamente los síntomas positivos de la enfermedad, aunque poseen prácticamente eficacia clínica nula sobre los síntomas negativos y los trastornos cognitivos. Incluso, por sus efectos secundarios, se observó que el uso de los AT puede producir un deterioro cognitivo aún mayor en los pacientes. Como se mencionó anteriormente, los AT se caracterizan por ser potentes antagonistas de receptores DAérgicos, en particular de los del tipo D₂ (Tabla 1), [Miyamoto S 2005; Ross CA 2006]. Se piensa que ejercen su efecto terapéutico a través del bloqueo de estos receptores en la vía mesolímbica DAérgica [Carlsson A 2001]. Sin embargo, la potencia en el bloqueo de los receptores D₂ conlleva el riesgo aumentado de la aparición de síntomas extrapiramidales tales como temblor, rigidez y distonía, entre otros, efectos secundarios que caracterizan a los AT. Además, su uso prolongado genera efectos no deseados como la sequedad de boca, sedación y complicaciones cardiovasculares [Serretti A 2004]. Este conjunto de efectos secundarios hacen que en la mayoría de los casos, el tratamiento con este tipo de fármacos deba ser suspendido.

b. Antipsicóticos Atípicos

La necesidad de encontrar fármacos con mayor eficacia y selectividad para el tratamiento de la esquizofrenia llevó al desarrollo de una nueva generación de antipsicóticos denominados antipsicóticos atípicos (AAT). Esta nueva generación de fármacos se caracteriza por presentar una disociación entre su eficacia terapéutica y la producción de síntomas secundarios extrapiramidales. Es decir, son capaces de revertir los síntomas positivos a dosis a las que no generan en los pacientes alteraciones motoras como las descritas por los AT [Farde L 1997; Meltzer HY 1999]. Además de la importante ventaja que implica este hecho, los AAT superan a los antipsicóticos convencionales en el tratamiento de los síntomas negativos y los trastornos cognitivos de la patología, logrando mejorías en ambas clases de síntomas [Meltzer HY 1995; Kane JM 2010].

Los AAT constituyen un grupo heterogéneo de fármacos que muestran un perfil farmacológico distinto al de los AT (Tabla 1).

Tal como se observa en la Tabla 1, los AAT Clozapina, Risperidona y Olanzapina poseen mayor afinidad por el subtipo 5-HT_{2A} que por el receptor D₂, a diferencia de los AT (Haloperidol). Esta relación entre afinidades 5-HT_{2A}/D₂ es considerada por algunos autores como la característica que podría explicar la atipicidad de estas tres drogas

[Meltzer HY 1989; Roth BL 2003]. Sin embargo, la definición de atipicidad de los antipsicóticos es limitada ya que existen otros fármacos que se incluyen en la categoría de atípicos, tales como Amisulpirida y Aripiprazol, que poseen una alta afinidad por receptores D₂ en relación al 5-HT_{2A} o presentan afinidad por receptores del subtipo 5-HT_{1A}, respectivamente.

Tabla 1. Perfil farmacológico de antipsicóticos típicos y atípicos

Receptores	ANTIPSICOTICOS					
	TIPICO	ATIPICOS				
	Haloperidol	Clozapina	Risperidona	Olanzapina	Amisulpirida	Aripiprazol
D ₁	+	+	+	++	-	-
D ₂	++++	+	+++	++	++++	++++
D ₃	+++	+	++	+	++	++
D ₄	+++	++	-	++	-	+
5-HT _{1A}	-	-	-	-		++
5-HT _{1D}	-	-	+	-		+
5-HT _{2A}	+	+++	++++	+++	-	+++
5-HT _{2C}	-	++	++	++	-	+
5-HT ₆	-	++	-	++		+
5-HT ₇	-	++	+++	-		++
α ₁	+++	+++	+++	++	-	+
α ₂	-	+	++	+	-	+
H ₁	-	+++	-	+++	-	+
m ₁	-	++++	-	+++	-	-

Tabla 1. Afinidades relativas de antipsicóticos típicos y atípicos a dosis terapéuticas por distintos receptores. - = mínima a nula; + = leve; ++ = moderada; +++ = alta; ++++ = muy alta (Adaptada de Miyamoto S 2005).

Estos datos ponen en evidencia la posibilidad de que múltiples mecanismos farmacológicos podrían estar involucrados en la atipicidad de los AAT [Roth BL 2003; Serretti S 2004]. Lamentablemente, a pesar de las ventajas que presentan los AAT en comparación con los típicos respecto a su eficacia terapéutica, su uso prolongado puede generar severos efectos secundarios (mayor riesgo a la obesidad, hiperprolactinemia y agranulocitosis) que comprometen su utilización [Kapur S 2004].

Problemática con el tratamiento de la esquizofrenia

La aparición de los AAT significó un avance sustancial en el tratamiento de la esquizofrenia debido a que estos nuevos fármacos inciden positivamente sobre la mayoría de los síntomas manifestados en la enfermedad. El hecho de que no induzcan los efectos motores extrapiramidales característicos de los AT, llevó al planteo de la problemática en el tratamiento de la enfermedad (Figura 2). Se sabe que los AT

alcanzan su eficacia terapéutica a una dosis a la cual ocupan aproximadamente, un 80 % de receptores D_2 (Figura 2).

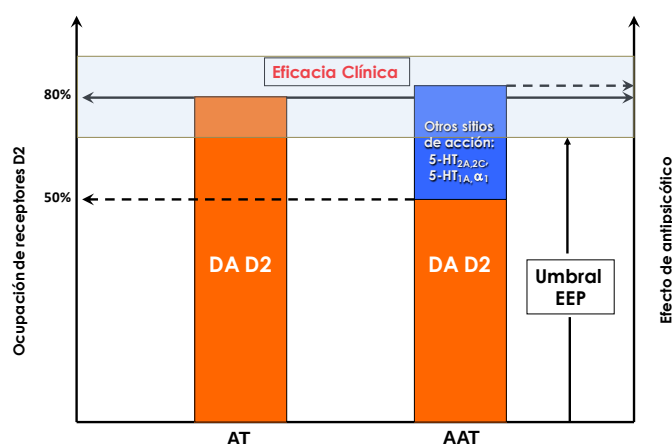


Figura 2. Representación esquemática de la relación entre la ocupación de receptores D_2 , el efecto antipsicótico y la generación de efectos motores extrapiramidales ejercidos por AT y AAT. La ocupación de receptores D_2 por los AT al momento de alcanzar la eficacia terapéutica supera el umbral de generación de los efectos extrapiramidales, mientras que la ocupación de dichos receptores por los AAT no alcanza ese umbral. Datos obtenidos de Kapur S y Seeman P2001.

Este elevado porcentaje de ocupación incluye no solo a los receptores D_2 de la vía mesolímbica (asociada a la sintomatología positiva), sino también a receptores D_2 de la vía nigro-estriatal, específicamente aquellos expresados en el caudado-putamen, vía que participa en el control del movimiento, por lo que al bloqueo de estos últimos se les atribuye la inducción de los efectos motores extrapiramidales [Farde L 1997; 1988]. Por el contrario, los AAT poseen una mayor afinidad por receptores serotoninérgicos del tipo $5-HT_{2A}$ respecto a los D_2 (Tabla 1); [Miyamoto S 2005], alcanzando su eficacia terapéutica con tan solo un 50 % de ocupación de receptores D_2 (Figura 2), evidencia que explicaría la ausencia de los efectos motores extrapiramidales [Farde L 1997]. Se sabe que, además, los AAT interactúan con otros receptores del tipo serotoninérgicos tales como los $5-HT_{1A}$, adrenérgicos e histamínicos, entre otros (Tabla 1) [Bymaster FP 1996; Takahashi Y 1998; Patel S 2001; Roth BL 2004]. La interacción con otros receptores, y en particular los serotoninérgicos, se considera una propiedad clave en el éxito de las acciones terapéuticas de los AAT (Figura 2); [Meltzer HY 2011]. Sin embargo, a pesar de los avances farmacológicos, hoy en día el tratamiento para la esquizofrenia está lejos de ser el óptimo. La generación de los efectos secundarios de ambos tipos de fármacos muchas veces obliga a los pacientes a suspender los tratamientos [Ross CA 2006].

Por lo tanto, comprender el papel que juega cada uno de los receptores por los cuales los antipsicóticos poseen afinidad en su mecanismo de acción, contribuirá a lograr una mejor comprensión de la enfermedad aportando información relevante para la búsqueda de tratamientos más selectivos y eficaces.

Clozapina: antipsicótico atípico prototípico

Clozapina (Clz) fue descubierto en 1958 y es considerado el antipsicótico atípico prototípico [Hippius H 1999]; a dosis terapéuticas no produce efectos extrapiramidales o disquinesia tardía [Meltzer HY 1999b] y mejora significativamente la sintomatología positiva aún en pacientes esquizofrénicos resistentes al tratamiento con antipsicóticos clásicos [Remington GJ 1996]. A su vez, mejora notoriamente el deterioro en las funciones cognitivas y la sintomatología negativa de la patología. En su perfil farmacológico se ve que Clz interactúa con una amplia gama de receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos, adrenérgicos, histamínicos y muscarínicos (Tabla 1). Se cree que su mayor afinidad por los otros receptores (especialmente serotoninérgicos), en comparación con su baja afinidad por receptores dopaminérgicos, podría ser la clave para explicar su eficacia terapéutica (Figura 3).

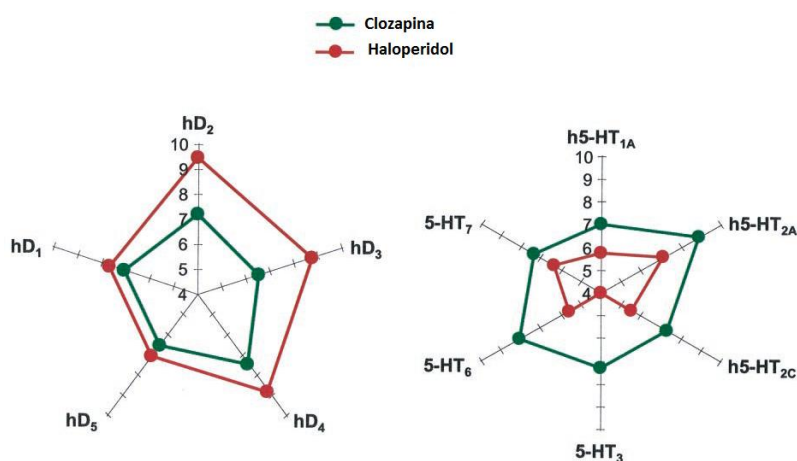


Figura 3. Representación del perfil de unión *in vitro* a múltiples receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos de Clozapina comparado con el AT prototípico Haloperidol. Estos resultados fueron obtenidos utilizando clones de receptores humanos (h), de rata (5-HT₆ y 5-HT₇) y de ratón (5-HT₃). Mientras que Clozapina muestra una amplia y equilibrada interacción con diversos sitios dopaminérgicos y serotoninérgicos, Haloperidol muestra una pronunciada afinidad por los receptores D₂, D₃ y D₄ comparado con la débil afinidad que posee para otros sitios. Obtenida de Millan M 2000.

En particular, Clz posee una potente afinidad por los receptores serotoninérgicos del tipo 5-HT_{2A} en comparación con una baja afinidad por receptores dopaminérgicos D₂ (Tablas 1 y 2), asociándose dicha interacción con la acción de Clz sobre los síntomas positivos de la esquizofrenia [Martin P 1997]. A su vez, Clz muestra afinidad por otros receptores serotoninérgicos entre los que se destacan los 5-HT_{1A} (Tabla 2) como posible sitio de acción involucrado en la acción terapéutica de Clz frente a los trastornos cognitivos [Meltzer HY 2008].

Tabla 2. Perfil farmacológico comparativo entre Haloperidol y Clozapina por receptores monoaminérgicos

Receptores	ANTIPSICÓTICOS	
	Haloperidol	Clozapina
D ₂	0.7	126
5-HT _{2A}	45	16
5-HT _{1A}	1100	875

Tabla 2. Valores de afinidad *in vitro* por receptores aminérgicos de un antipsicótico típico (Haloperidol) y uno atípico (Clozapina) (valores de K_i en nM). Datos obtenidos de Bymaster FP 1996, Arnt J 1998.

Su interacción con los distintos receptores serotoninérgicos (5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₆, 5-HT₇ y 5-HT_{1A}) como potenciales blancos terapéuticos es de particular interés existiendo una gran cantidad de estudios dirigidos a investigar esta temática. A pesar de ello, hasta el momento no existen suficientes evidencias para determinar claramente el papel relativo de cada uno de éstos receptores en la acción terapéutica de Clz sobre los diferentes síntomas de la esquizofrenia.

Trastorno cognitivo en esquizofrenia y Clozapina

Los trastornos cognitivos se manifiestan en un 75 a 85 % de los pacientes esquizofrénicos y se consideran como uno de los síntomas más invalidantes de la patología [Reinchembreg A 2005].

Se ha observado que estos trastornos parecen ser los más sensibles al tratamiento con Clz. De hecho, en experimentos pre-clínicos se ha demostrado que la relación de afinidad de la Clz por los receptores 5-HT_{2A} y D₂ es importante en su acción terapéutica sobre alteraciones cognitivas inducidas por el bloqueo de receptores NMDA, sin embargo dicha relación no parece ser suficiente [Snigdha S 2009]. Es posible que la interacción con otros subtipos de receptores por los cuales Clz posee afinidad deba ser considerada. Específicamente, se ha postulado que la interacción de Clz con el subtipo de receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}, sería de particular importancia en el mecanismo de acción del antipsicótico para mediar sus acciones terapéuticas sobre las alteraciones cognitivas. Se ha descrito que Clz, así como otros AAT, son agonistas parciales del receptor 5-HT_{1A} los cuales pueden funcionar como agonistas o antagonistas dependiendo de la disponibilidad endógena de 5-HT, de la densidad de receptores y de la región de expresión [Newman-Tancredi A 1998; Meltzer HY 2011]

Los receptores 5-HT_{1A} se expresan abundantemente en regiones límbicas del cerebro tales como la CPF e hipocampo, así como en las neuronas de los núcleos mesencefálicos del rafe (autoreceptores somatodendríticos) [Barnes NM 1999]. Estas regiones han sido implicadas en la patología de la esquizofrenia por alteraciones en sus funciones. Aún más, estudios post-mortem en humanos detectaron una sobre-expresión de este subtipo de receptor en regiones corticales frontales y temporales en cerebros de pacientes esquizofrénicos, sugiriendo la existencia de un déficit funcional de estos receptores en la patología [Meltzer HY 2008].

Evidencias pre-clínicas demostraron que los receptores 5-HT_{1A} poseen un rol importante en el aumento de la liberación de dopamina en el circuito mesocortical (ATV y CPFmedial) [Bortolozzi A, 2005; 2010; Díaz-Mataix L 2005], efecto que se ha asociado a la capacidad de los AAT de mejorar la sintomatología negativa y los trastornos cognitivos que aparecen en la enfermedad [Ichicawa J 2001; Leucht S 2009a; Leucht S 2009b]. Aunque de forma indirecta, evidencias pre-clínicas han demostrado que dichos receptores no mediarían el bloqueo por Clz de los signos de hiperactividad evocados por MK-801, sugiriendo que no participarían en la acción terapéutica del antipsicótico sobre los síntomas positivos de la esquizofrenia [Scorza MC, 2010].

A pesar de las evidencias clínicas y pre-clínicas mostradas apoyando una relación entre los receptores 5-HT_{1A} y la función cognitiva, existen datos contradictorios respecto a si el agonismo o el antagonismo 5-HT_{1A} la facilita o la empeora [Meneses A 1998; Harder J 2000; Lüttgen M 2005]. **Es necesario continuar investigando en esta temática con el fin de aportar más evidencias que clarifiquen el papel de dicho receptor en la función cognitiva y que confirmen la participación 5-HT_{1A} en la acción terapéutica de Clz utilizando modelos comportamentales que impliquen específicamente la evaluación de la función cognitiva.**

APORTES PRE-CLINICOS AL ESTUDIO DE LA ESQUIZOFRENIA

Modelos animales para el estudio de la esquizofrenia

Aunque no se pueda modelar completamente en animales una enfermedad tan compleja como la esquizofrenia, el desarrollo de algunos modelos pre-clínicos farmacológicos y conductuales ha permitido aportar gran parte de la información que hoy se conoce acerca de la enfermedad. Existen varios modelos fármaco-conductuales, basados en distintas teorías de la fisiopatología de la esquizofrenia que se utilizan como herramientas farmacológicas para estudiar la neurobiología subyacente a esta patología y el mecanismo de acción de los fármacos antipsicóticos. A través de la mimetización de algunos de los síntomas de la enfermedad en animales de experimentación se ha logrado avanzar significativamente en la comprensión de la enfermedad.

Uno de los modelos de psicosis más utilizados es el uso de fármacos con acción DAérgica directa o indirecta (apomorfina, anfetamina, cocaína). La administración sistémica de este tipo de drogas en animales induce alteraciones conductuales (hiperlocomoción) que están asociadas a un aumento significativo en la transmisión DAérgica, efecto que subyacería a la aparición de los síntomas psicóticos de la esquizofrenia [Kuczenski R 1991; Guillin O 2007]. Además, el aumento en la locomoción es prevenido por la administración de AT y AAT brindando validez predictiva al modelo. Sin embargo, una gran limitante de este modelo farmacológico es que representa pobremente a las otras clases de síntomas manifestados en la enfermedad (síntomas negativos, afectivos y disfunciones cognitivas). Esta desventaja llevó al desarrollo de nuevos modelos [Geyer MA 2003].

Un modelo farmacológico que representa globalmente a la patología, es el uso de fármacos antagonistas de los receptores GLUérgicos del tipo NMDA [Andiné P 1999; Geyer MA 2003; Javitt DC 2010]. Dicho modelo se considera uno de los más apropiados para el estudio de la neurobiología de la esquizofrenia así como para testar el potencial terapéutico de nuevos fármacos con potencial antipsicótico. Este modelo farmacológico está basado en la hipótesis GLUérgica de la esquizofrenia mencionada anteriormente. Se diferencia de otros modelos farmacológicos por inducir, no solo síntomas asociados a la sintomatología positiva, sino también alteraciones cognitivas y negativas semejantes a las observadas en la enfermedad [Moghaddam B 2003; Rung JP 2005].

Características generales del receptor NMDA

Los receptores GLUérgicos del tipo NMDA, son una clase de receptores ionotrópicos expresados ampliamente en el Sistema Nervioso Central (SNC) encargados de mediar la neurotransmisión GLUtérgica. El glutamato, a través de los receptores NMDA, 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, se ha implicado el exceso en la activación de receptores NMDA con procesos de excitotoxicidad, como ocurre durante la isquemia y en algunos trastornos neurológicos [Karavonova I 2007; Fitzgerald PJ 2012]. Debido a su amplia participación en complejos procesos cerebrales, se piensa que el glutamato así como los receptores NMDA, podrían estar involucrados en la etiopatogenia de varios trastornos neuropsiquiátricos tales como trastornos neurodegenerativos, síndromes de dolor, adicción, trastornos afectivos y trastornos del desarrollo neurológico como el autismo o la esquizofrenia. Los receptores NMDA son heterotetrámeros formados por diferentes combinaciones de tres tipos de subunidades: NR1, NR2 (A-D) y NR3 (A-B) (Figura 4). Todos los receptores NMDA funcionales poseen una o más subunidades NR1. A su vez, la mayoría de ellos contienen subunidades de la clase NR2, mayormente NR2A y NR2B, (en cerebro adulto), siendo las subunidades 2C y 2D las más escasamente expresadas

[Cull-Candy SG 2004; Paoletti P 2007]. Distintas combinaciones de las subunidades dan lugar a diferentes sub-clases de receptores NMDA con propiedades funcionales características de cada una (afinidad por agonistas y antagonistas NMDA, conductividad unitaria del canal, sensibilidad al bloqueo por Mg^{2+} dependiente de voltaje y distribución subcelular). Estas diferentes configuraciones y propiedades determinan características funcionales específicas definiendo respuestas fisiológicas o patológicas distintas en respuesta al glutamato u otros agonistas y antagonistas NMDA [Karavonova I 2007; Paoletti P 2007; Kantrowitz J 2010]. Un ejemplo de ello es la demostración de que neuronas que expresan receptores NMDA compuestos con subunidades 2C, demuestran mayor generación de oscilaciones delta en respuesta al bloqueo NMDA, comparado con neuronas expresando receptores NMDA con subunidades 2A/2B [Zhang Y 2009].

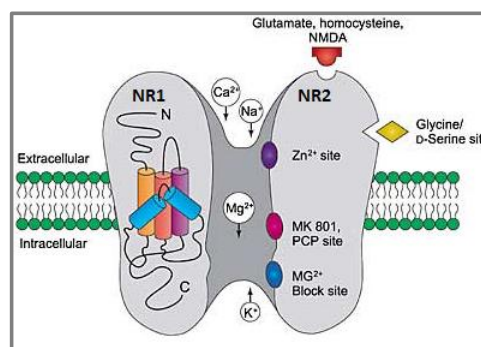


Figura 4. Diagrama que ejemplifica una sub-clase de receptor GLUérgico NMDA conformado por subunidades del tipo NR1 y NR2A ilustrando los sitios de unión de agonistas, antagonistas y moduladores, en particular los sitios de acción de PCP y MK-801.

Los antagonistas del receptor NMDA como modelo pre-clínico para el estudio de las bases neurales de la esquizofrenia

La administración sistémica en animales de experimentación de drogas antagonistas de receptores NMDA tales como PCP, ketamina o MK-801, el antagonista no-competitivo más potente [Bresink I 1995], constituye un modelo farmacológico pre-clínico ampliamente utilizado para estudiar las bases neurales involucradas en la esquizofrenia y el mecanismo de acción de fármacos antipsicóticos. Este hecho se debe principalmente, a la existencia de una gran cantidad de evidencias que vinculan a los antagonistas NMDA con distintos tipos de síntomas que se manifiestan en la esquizofrenia. A su vez y posteriormente a las evidencias mencionadas, surgen otras, que asocian el bloqueo NMDA con la producción de cambios a nivel celular, como ser alteraciones en la expresión de la proteína Parvalbumina y la enzima óxido nítrico-sintasa en neuronas del hipocampo así como también cambios en la expresión génica en células corticales. Todos estos efectos son similares a los descritos en la

esquizofrenia humana [Keilhoff G 2004; Kaiser S 2004; Kehrer C 2008] y han reforzado el uso de esta clase de fármacos como modelo farmacológico pre-clínico de esquizofrenia.

a. Antagonistas del receptor NMDA y su relación con los síntomas positivos

En roedores, la administración sistémica y sub-anestésica de antagonistas NMDA produce un síndrome comportamental motor que se caracteriza por la aparición de hiperlocomoción acompañada de una marcada alteración en su patrón locomotor (característica que permite diferenciar la hiperlocomoción GLUérgica de una inducida por compuestos DAérgicos), estereotipias y signos de ataxia [Andiné P 1999; Geyer MA 2003; Krystal JH 2003; Scorza MC 2008]. A su vez, todas las alteraciones conductuales mencionadas son bloqueadas por fármacos antipsicóticos (AT y AAT) brindando validez predictiva como modelo pre-clínico asociado a la psicosis [Andiné P 1999; Scorza MC 2008].

b. Antagonistas del receptor NMDA y déficit cognitivo

La administración sistémica de antagonistas NMDA en animales induce deficiencias en diferentes dominios cognitivos convirtiendo a estas drogas en un modelo pre-clínico excelente para el estudio de las disfunciones cognitivas observadas en la esquizofrenia [Verma A 1996; White AM 1998; Kesslak J 2003; Bubenikova-Valesova V 2008]. Estas alteraciones cognitivas pueden ser evidenciadas a través del uso de diferentes paradigmas comportamentales tales como *Passive Avoidance* y *Morris water-maze*. Estos fueron específicamente diseñados para evaluar funciones cognitivas vinculadas al aprendizaje y memoria y a la memoria espacial; funciones particularmente dependiente de la región del hipocampo. 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 MM 2005; Enomoto T 2008; Celikyurt IK 2011; Multlu O 2011; Smith JW 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. A pesar de su amplia utilización, algunos de estos paradigmas son muy caros de implementar e implican la disposición de una gran infraestructura en el laboratorio, lo que muchas veces restringe su uso. En este sentido, varios trabajos en ratas han reportado alteraciones cognitivas inducidas por la administración de MK-801, utilizando un modelo de memoria sencillo de instrumentar, mediante el cual se evalúa el parámetro específico de latencia de transferencia en el modelo de laberinto en cruz elevado (ver más adelante) [Itoh J 1991; Hlinák Z 1998; 2002; 2003]. Estos autores describen específicamente un efecto amnésico inducido por MK-801 el cual es antagonizado por el antipsicótico atípico, 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 IK 2011].

Uno de los objetivos del presente trabajo de tesis fue el de implementar en nuestro laboratorio éste modelo de memoria y validar su uso para estudiar el mecanismo de acción del antipsicótico atípico, Clozapina, en relación a su efecto terapéutico sobre el trastorno de la función cognitiva inducido por el bloqueo NMDA.

c. Antagonistas del receptor NMDA, deterioro del valor de procesamiento sensorial y trastornos afectivos

Varias evidencias demuestran que existe una alteración en el filtrado sensorio-motor y 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 receptores NMDA en ratas y primates no humanos, también induce alteraciones sensorio-motoras similares a las de la patología considerándolas conductas homólogas. Por otro lado, la administración sistémica de estos fármacos induce una disminución en las interacciones sociales en el modelo de aislamiento social con roedores, conducta que remeda al aislamiento social comúnmente observado en los esquizofrénicos [Geyer MA 2003; Rung J 2005; Yang S 2010].

d. Mecanismo de acción propuesto para los efectos inducidos por los antagonistas del receptor NMDA

Todos los efectos comportamentales mencionados implican respuestas de aumento y/o excitación dejando en evidencia un mecanismo paradójico cuando se trata del antagonismo de un receptor excitatorio. Esto llevó a plantear la **hipótesis de una desinhibición** GABAérgica inducida por el bloqueo de receptores NMDA, la que explicaría alguno de los efectos farmacológicos observados. Si bien los receptores NMDA se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC, expresándose tanto en neuronas excitatorias como inhibitorias, se piensa que el bloqueo NMDA sobre las neuronas GABAérgicas que controlan neuronas de proyección excitatoria estaría predominando respecto al bloqueo sobre neuronas excitatorias. Al disminuir la actividad de estos *inputs* GABAérgicos se produciría una “liberación” de la inhibición tónica sobre proyecciones GLUérgicas (esquema propuesto en la Figura 5 A-B) generando una respuesta desinhibida [Krystal JH 2003; Homayoun H 2007].

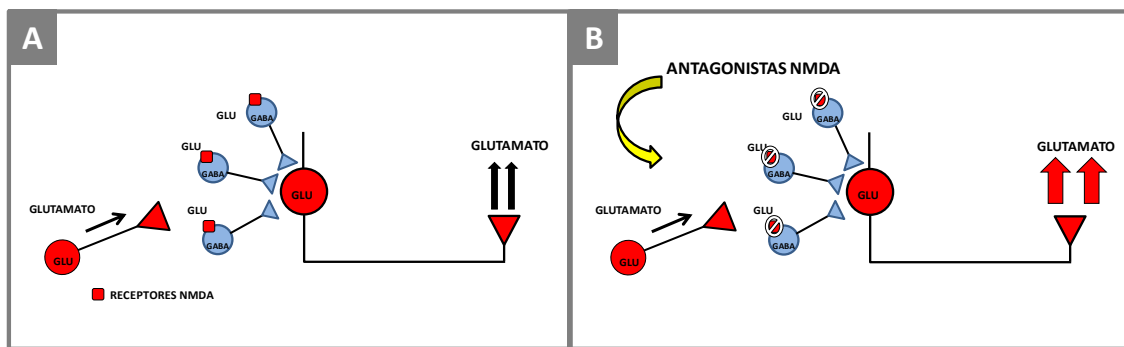


Figura 5 A-B. Esquema representativo de la hipótesis de desinhibición planteada como posible mecanismo de acción implicado en la inducción de los efectos conductuales inducidos por los antagonistas NMDA. A: representación del control inhibitorio, a través de neuronas GABAérgicas, sobre una neurona GLUérgica. B: desinhibición de la neurona GLUérgica por el bloqueo de receptores NMDA expresados en las neuronas GABAérgicas. Se sugiere que el bloqueo NMDA predomina en las neuronas GABAérgicas.

La identificación de circuitos neurales implicados en mediar los efectos inducidos por los antagonistas NMDA 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 esquizofrenia.

Áreas y circuitos vinculados a las acciones de los antagonistas NMDA asociadas a la sintomatología positiva

En la literatura, luego de la aparición de la hipótesis GLUérgica, varios autores se han dedicado a estudiar los circuitos y regiones del SNC involucrados en los efectos motores, cognitivos y perceptuales inducidos por la administración de los antagonistas NMDA ya que su entendimiento aportará importante información sobre las bases neurales alteradas en la esquizofrenia [Suzuki Y 2002; Jodo E 2005; Kargieman L 2007; López-Gil X 2007]. Sin embargo, aún continúan bajo estudio los sitios de acción de dichos compuestos que expliquen la inducción de los efectos mencionados anteriormente.

Corteza Prefrontal

A través de estudios post-mortem e *in vivo* se ha demostrado que Corteza Prefrontal (CPF) es una de las regiones que ha sido ampliamente implicada en la patología de la esquizofrenia y que, a su vez, está involucrada en algunos efectos inducidos por la administración de antagonistas NMDA [Krystal JH 2003]. La CPF es una región que participa en el control de la conducta y las emociones, la adaptación al medio y la elaboración y ejecución de procesos cognitivos, funciones que se ven alteradas en pacientes esquizofrénicos [Lewis DA 2000; Fuster JM 2001]. Estudios realizados

muestran que luego de la administración sistémica de MK-801 o análogos, se produce un aumento en la liberación extracelular de Glutamato, dopamina, serotonina y acetilcolina en la CPF [Moghaddam B 1997; Mathé JM 1999; Adams BW 2001; Lorrain DS 2003; Amargós-Bosch M 2006]. También, se observó un aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas piramidales de la CPF bajo el efecto de éstos fármacos [Kargieman L 2007]. Sin embargo, la administración local (en CPF) de antagonistas NMDA no provocan cambios en la actividad neuronal, ni alteraciones conductuales en los animales [Jodo E 2005; Suzuki Y 2002]. A su vez, en estudios previos hemos demostrado que el síndrome comportamental inducido por la administración sistémica de MK-801 es independiente de la integridad de la CPFmedial [Scorza MC 2008]. Todas estas evidencias sugieren la independencia de dicha región en las acciones centrales del MK-801 estableciendo la posibilidad de que los antagonistas NMDA estén ejerciendo sus acciones a través del bloqueo de receptores NMDA expresados en regiones subcorticales o en regiones corticales diferentes a la CPF.

Núcleos del Tálamo

El tálamo está constituido por un grupo de núcleos topográficamente organizados, actuando como una estación de relevo de información entre la corteza cerebral y el tronco encefálico. Es considerado como una de las principales regiones del SNC mediante la cual la mayor parte de la información subcortical que ingresa a la corteza cerebral es filtrada y procesada. Alteraciones en la función sensorio-motora así como en procesos cognitivos se han asociado a una disfunción tálamo-cortical. Debido a la naturaleza de los síntomas que se manifiestan en la esquizofrenia, el tálamo ha sido implicado proponiéndose que existe una desregulación en su función en la patología [Watis L 2008].

Los circuitos talámicos involucran principalmente 3 tipos de células: las **células relé** (o de relevo), ubicadas en los núcleos del tálamo dorsal, las cuales presentan proyecciones recíprocas con la corteza utilizando glutamato como neurotransmisor (proyecciones tálamo-corticales). Algunas neuronas relé conforman los llamados núcleos específicos de procesamiento, caracterizados por recibir información motora, sensorial o de asociación. Estos proyectan hacia regiones específicas de la corteza. Las neuronas relé también conforman núcleos inespecíficos de procesamiento los cuales reciben información más general (mayormente vinculada con mecanismos de atención y funciones viserales) y proyectan de manera más difusamente hacia regiones más profundas de la corteza; las **interneuronas locales** las cuales actúan inhibiendo localmente a las neuronas relé y a las terminales de las aferencias sensoriales; y por último las **neuronas GABAérgicas** del núcleo Reticular del tálamo (RT), núcleo que conforma gran parte del tálamo ventral. Los cuerpos celulares de este grupo de neuronas GABAérgicas se agrupan en forma de una fina lámina ubicada entre el tálamo dorsal y la corteza cerebral. El RT no se conecta directamente con la corteza cerebral sino que envía sus proyecciones hacia diferentes núcleos del tálamo dorsal

modulando su actividad. Al mismo tiempo, las neuronas del núcleo RT reciben proyecciones colaterales provenientes de las proyecciones tálamo-corticales y cortico-talámicas (Figura 6) [Salt TE 1996; Jones EG 1997; 1998; Gonzalo Ruiz A 1997; Paxinos G 2004; Radley J 2007].

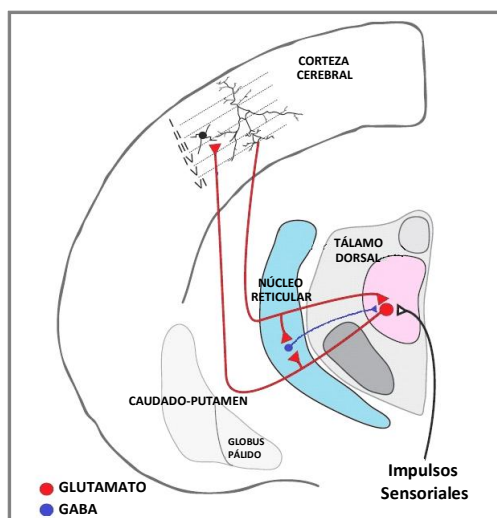


Figura 6. Diagrama esquemático del circuito tálamo-cortical. Las neuronas GLUérgicas (rojas) del tálamo dorsal reciben inputs sensoriales que a su vez son proyectados topográficamente hacia la capa IV de la corteza cerebral, donde liberan Glutamato y excitan a las neuronas piramidales (blancas) e interneuronas GABAérgicas locales (negras) de la corteza. A su vez, la corteza envía proyecciones recíprocas hacia el tálamo. Tanto las proyecciones cortico-talámicas como las tálamo-corticales, envían fibras colaterales a neuronas GABAérgicas en el Núcleo Reticular del tálamo, el cual proyecta a áreas específicas del tálamo dorsal modulando su actividad (Adaptado de Clinton SM y cols 2004).

Un conjunto creciente de evidencias anatómicas y funcionales han mostrado la existencia de anomalías estructurales y funcionales en varios de los núcleos talámicos en pacientes esquizofrénicos. Por ejemplo, estudios post-mortem en humanos han demostrado la existencia de reducciones en el número de neuronas en núcleos específicos del tálamo, entre ellos, el núcleo medio dorsal del tálamo (MDT), el núcleo anterior del tálamo (ATN) y el pulvinar [Andreasen NC 1997]. Otros estudios han reportado niveles de expresión disminuidos de las subunidades NR1, NR2B y NR2C de los receptores NMDA en el tálamo de pacientes con esquizofrenia, en particular en los ATN, MDT y núcleo del tálamo lateral dorsal, los cuales envían proyecciones recíprocas a regiones límbicas, prefrontales y cortezas de asociación, respectivamente [Waits L 2008]. Es así, que una desregulación en su funcionamiento, en particular una disfunción en la neurotransmisión GLUérgica en el tálamo ha sido implicado en la patología de la esquizofrenia [Bresink I 1995].

De hecho, estudios pre-clínicos han implicado a diferentes núcleos del tálamo en alguna de las acciones de los antagonistas del receptor NMDA. En particular, se observó que luego de la administración sistémica de MK-801 aparece un aumento de la señal de expresión para el gen primario *c-fos* en núcleos del tálamo que proyectan a

áreas motoras y de asociación [Väisänen J 2004]. Además, existen evidencias que reportan que la administración de antagonistas NMDA produce daño de neuronas piramidales en ciertas regiones de la corteza y se ha propuesto, que este efecto estaría siendo mediado por un bloqueo de receptores excitatorios expresados en neuronas inhibitorias, desinhibiendo así vías de proyección excitatorias hacia la corteza [Tomitaka S 2000; Homayoun H 2007]. Estudios relacionados muestran que, el daño cortical provocado por la administración de MK-801 fue prevenido por la inyección de muscimol (agonista de los receptores GABA_A) en el ATN, sugiriendo que el efecto del MK-801 estaría siendo mediado por una desinhibición de circuitos tálamo-corticales involucrando a éste núcleo del tálamo [Tomitaka S 2000].

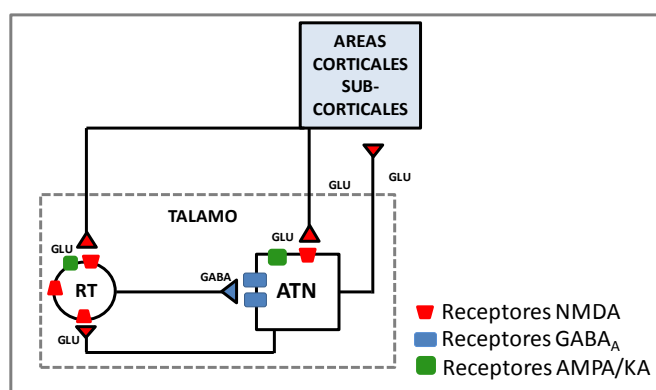
El ATN es un núcleo de asociación del tálamo dorsal que recibe aferencias provenientes mayormente de cortezas límbicas, hipocampo y núcleos mamilares. Posee conexiones recíprocas, a través de proyecciones GLUérgicas, con la corteza cingulada anterior y posterior, en particular con la Corteza Retrosplenial (RSC), también definida como corteza cingulada posterior en ratas [Gonzalo-Ruiz G 1997], siendo considerado como parte del sistema límbico [Shibata H 1993; Paxinos G 2004]. A su vez, el ATN recibe aferencias inhibitorias provenientes de aferencias GABAérgicas del RT [Gonzalo-Ruiz G 1995; Zikopoulos B 2006]. Por lo tanto, el bloqueo de receptores NMDA expresados en neuronas GABAérgicas del núcleo RT podría explicar la desinhibición del ATN. Algunos resultados similares fueron obtenidos luego de la microinyección local de MK-801 en la RSC y en el ATN, observando un aumento en la síntesis de la proteína *heat-shock* 70 (HSP70) en la RSC. Estos mismos autores sugieren que la activación patológica de este circuito tálamo-cortical podrían mediar la psicosis producida por los antagonistas NMDA en humanos y podrían contribuir así a explicar la psicosis en la esquizofrenia [Sharp FR 2001]. **Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias que hayan relacionado la participación del ATN (o el circuito talámico anterior-reticular) y en particular la existencia de un mecanismo de desinhibición del ATN con los cambios conductuales motores inducidos por los antagonistas NMDA, los cuales se asocian a la sintomatología positiva de la enfermedad.**

II. HIPOTESIS DE TRABAJO

En base a los antecedentes mencionados, el presente trabajo de Tesis se centró en el uso del modelo farmacológico del antagonismo de receptores NMDA para modelar la sintomatología positiva de la esquizofrenia así como los trastornos cognitivos de la enfermedad.

El trabajo de tesis se basó en las siguientes dos propuestas:

II.a.- en primer lugar, con el fin de identificar aquellos circuitos neurales GLUérgicos mediados por receptores NMDA y que implican un control GABAérgico, se evaluó la participación del ATN en los efectos comportamentales inducidos por el MK-801 (alteración conductual que refleja la sintomatología positiva de la esquizofrenia). En particular, basados en la hipótesis de la desinhibición GABAérgica como mecanismo de acción de los antagonistas NMDA, proponemos que la administración sistémica de MK-801 involucra una desinhibición del ATN, el cual se encuentra bajo el control GABAérgico del núcleo RT (Esquema 1).



Esquema 1: El núcleo reticular del tálamo (RT) envía proyecciones GABAérgicas inhibiendo al núcleo anterior del tálamo (ATN), un núcleo de salida del tálamo que proyecta hacia diferentes regiones de la corteza y sub-corticales.

II.b.- En segundo lugar y basados en las evidencias que muestran que el subtipo de receptor 5-HT_{1A} se expresa en forma abundante en regiones del SNC vinculadas a la función cognitiva y media aquellos efectos neuroquímicos que han sido vinculados a la acción terapéutica de Clz en la mejoría de los trastornos cognitivos, proponemos que Clz es capaz de bloquear el efecto amnésico inducido por la administración sistémica de MK-801 evidenciado en el modelo de Latencia de Transferencia, a través de receptor 5-HT_{1A}.

III. OBJETIVO GENERAL

Profundizar en el estudio de las bases neurales de la sintomatología positiva de la esquizofrenia y del mecanismo de acción de la Clozapina sobre los trastornos cognitivos mediante el uso del antagonista NMDA, MK-801 como modelo farmacológico.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterización del papel del núcleo anterior del tálamo en el síndrome comportamental motor inducido por la administración sistémica de MK-801.

1.1 Caracterización del síndrome conductual motor inducido por la administración sistémica de MK-801.

1.2 Estudio de la participación del núcleo anterior del tálamo en las conductas motoras inducidas por MK-801 a través de la inhibición GABAérgica de dicho núcleo.

2. Estudio del efecto de Clozapina sobre las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801 en el modelo de memoria Latencia de transferencia.

2.1 Caracterización de las alteraciones conductuales inducidas por la administración sistémica de MK-801 en el modelo Latencia de transferencia.

2.2. Determinación del bloqueo por Clozapina de las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801 en el modelo Latencia de Transferencia.

2.3. Estudio del papel del subtipo de receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} en la acción de Clozapina sobre las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas macho adultas de la cepa Wistar de 270-320 gr (N= 180). Los animales fueron obtenidos del 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 Ética en el Uso de Animales de Experimentación (CEUA) del IIBCE y de acuerdo con la Ley Nacional de experimentación animal N° 18.611. Se utilizó un N= 6-12 animales por grupo experimental.

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)], Muscimol y WAY-100635 (antagonista selectivo de receptores 5-HT_{1A}) fueron obtenidos en Sigma-Aldrich. Clozapina fue obtenida en Tocris Bioscience. Las drogas fueron preparadas disueltas en salino (MK-801, Muscimol, WAY-100635) o vehículo HCl 2%; pH=5.8 (Clozapina), alicuotadas y conservadas a -20 °C hasta el momento de ser utilizadas en los experimentos. Para el caso de MK-801, la vía de inyección fue la intraperitoneal (i.p.), subcutánea (s.c.) para Clozapina y WAY-100635, mientras que Muscimol fue microinyectado intracerebralmente (las condiciones se mencionan más adelante). El volumen de inyección para la administración sistémica fue de 1 ml/kg.

Modelos comportamentales

Todos los experimentos conductuales realizados en este trabajo fueron llevados a cabo en el cuarto de experimentación del Laboratorio de Biología Celular del IIBCE bajo condiciones ambientales de temperatura y ciclo luz-oscuridad similares a las existentes en el Bioterio. Los animales fueron trasladados al cuarto de comportamiento 24 hs antes de la realización de cada experimento para lograr su correcta habituación al ambiente.

1. Modelo de campo abierto

El Campo Abierto (CA) es un modelo ampliamente utilizado para evaluar la actividad locomotora horizontal así como la exploración vertical o *rearings* [Montgomery KC 1955; Archer J 1973; Lamprea MR 2008]. El mismo consiste en una caja de 60 x 60 cm con paredes de acrílico rojo de 40 cm de alto y una cámara de video colocada encima del CA a través de la cual se filma la conducta de los animales. A continuación, a través

de un programa de video-seguimiento Ethovision XP (Noldus) se registraron automáticamente numerosos parámetros; se analizaron los videos obtenidos y se cuantificaron parámetros tales como la distancia recorrida (m), el patrón locomotor, velocidad de movimiento, entre otros (Fig. 7).

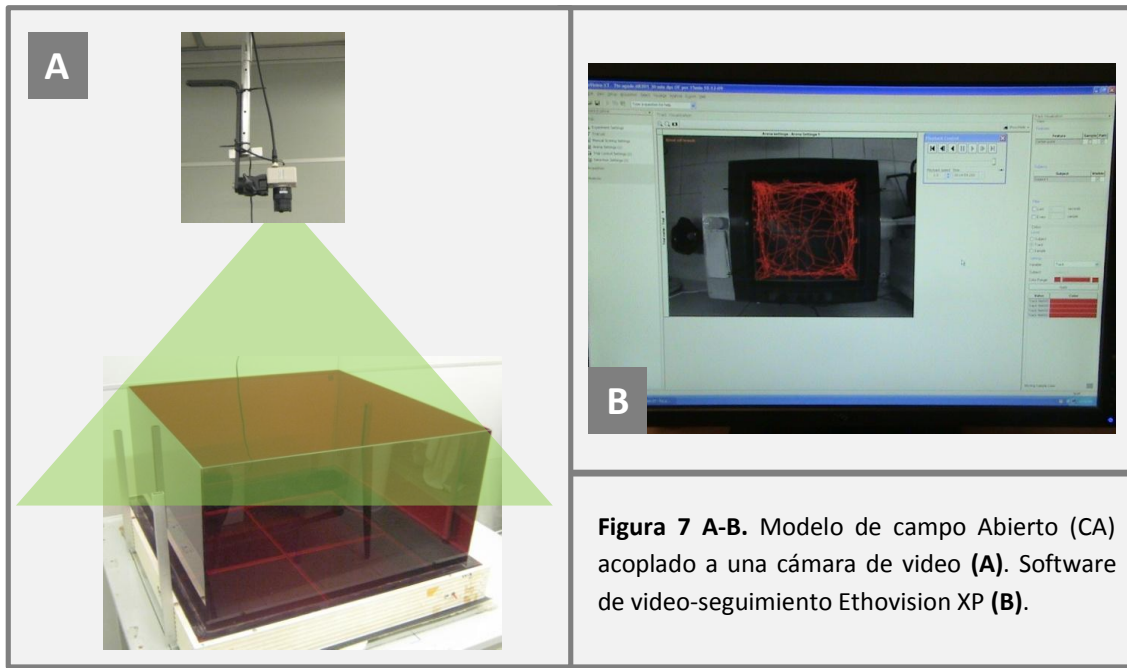


Figura 7 A-B. Modelo de campo Abierto (CA) acoplado a una cámara de video **(A)**. Software de video-seguimiento Ethovision XP **(B)**.

2. Modelo de Latencia de Transferencia

El modelo de Latencia de Transferencia (LT) es un modelo utilizado para evaluar memoria espacial. Fue diseñado a partir del modelo plus-maze o laberinto en cruz elevado clásicamente utilizado para evaluar ansiedad experimental [Lister R 1990; Pellow S 1986]. En este caso la variante a registrar fue el parámetro de latencia de transferencia indicativo del proceso de aprendizaje y memoria [Hlinák Z 1998; Hlinák Z 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 8). El registro del parámetro LT consiste en cuantificar el tiempo que demora el animal en 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. Dado que el objetivo fue evaluar el aprendizaje de una tarea en animales bajo el efecto de MK-801, la droga se inyectó el primer día del experimento (se evalúa la adquisición de la tarea) y se cuantificó la LT1. La evocación de la tarea aprendida fue evaluada al día consecutivo LT2 en ausencia de droga. En animales control se observa una disminución en la LT2 con respecto a la LT1, en cambio, aquellas drogas que generan un efecto amnésico en el animal inducen un aumento significativo en la LT2

con respecto al grupo control sin diferenciarse de la LT1 (del grupo tratado). Como control de reversión del efecto amnésico, los animales fueron sometidos a una tercera sesión el tercer día después de la inyección de la droga (LT3). Aquellos animales que se excedieron de los 90 segundos de latencia [Hlinak Z 2002] así como los que cayeron del modelo fueron descartados de los grupos experimentales (criterio del laboratorio). Todos los experimentos fueron filmados y analizados posteriormente.

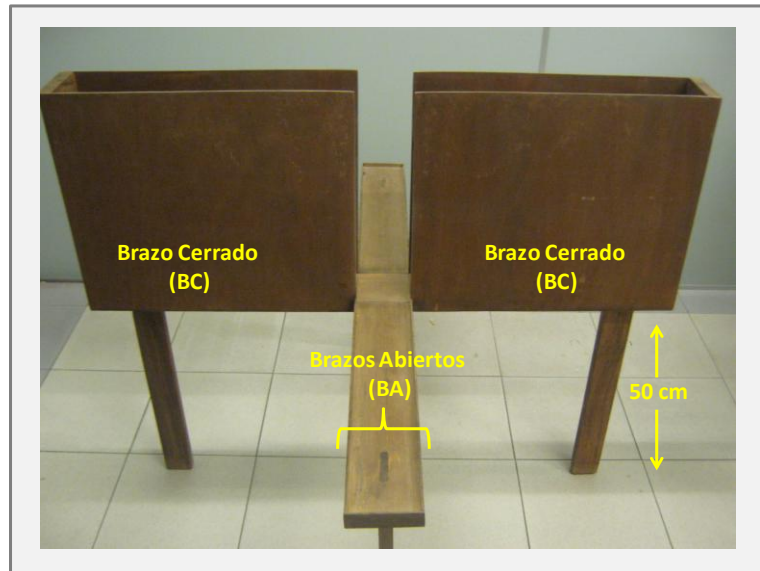


Figura 8. Modelo de Laberinto en cruz elevado utilizado para registrar Latencia de Transferencia.

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* estadístico de *t-Student* o el Análisis de Varianza (ANOVA) de Una o Dos vías seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls. Los datos fueron analizados y graficados utilizando el programa GraphPad Prism 5.01. La significancia estadística fue fijada en $p < 0.05$.

OBJETIVO ESPECÍFICO 1

1. Caracterización del papel del núcleo anterior del tálamo en el síndrome comportamental motor inducido por la administración sistémica de MK- 801.

1.1 Caracterización del síndrome conductual motor inducido por la administración sistémica de MK-801.

Procedimiento experimental

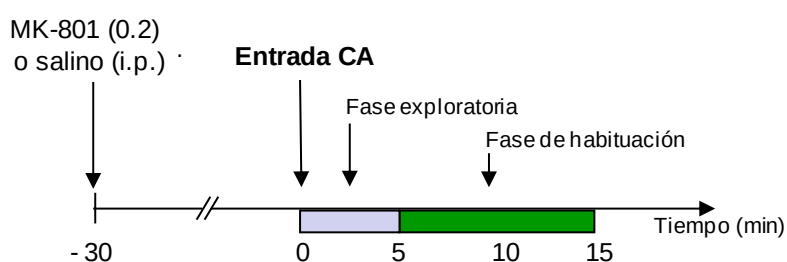
En esta serie de experimentos los animales fueron inyectados i.p. con MK-801 a una dosis de 0.2 mg/kg y salino (grupo control). Dicha dosis fue estudiada previamente por el grupo de investigación del laboratorio y por otros autores. Básicamente, se ha observado que dicha dosis no genera signos de ataxia severos que imposibiliten el movimiento de animal [Andiné y cols. 1999; Scorza y cols. 2008].

Treinta minutos después de la inyección los animales fueron colocados en el CA para el registro de las conductas motoras. El período total de registro fue de 15 min. el cual fue dividido en dos períodos: 0-5 min., 5-15 min. con el fin de diferenciar la fase de exploración en la cual los animales exploran el ambiente nuevo (0-5 min) y la fase de habituación en la que los animales comienzan a adaptarse a la caja (5-15 min.). El protocolo experimental realizado se observa en el Esquema 2.

En simultáneo al registro automático de la actividad locomotora, 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 (el animal se apoya en sus patas traseras y levanta su tronco y patas delanteras; se consideraron los *rearings* libres o apoyados contra la pared); 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.

Esquema 2: Protocolo experimental



Esquema 2. Protocolo experimental para la evaluación del síndrome conductual motor inducido por MK-801 en el CA. CA= Campo Abierto.

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 MD, 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.

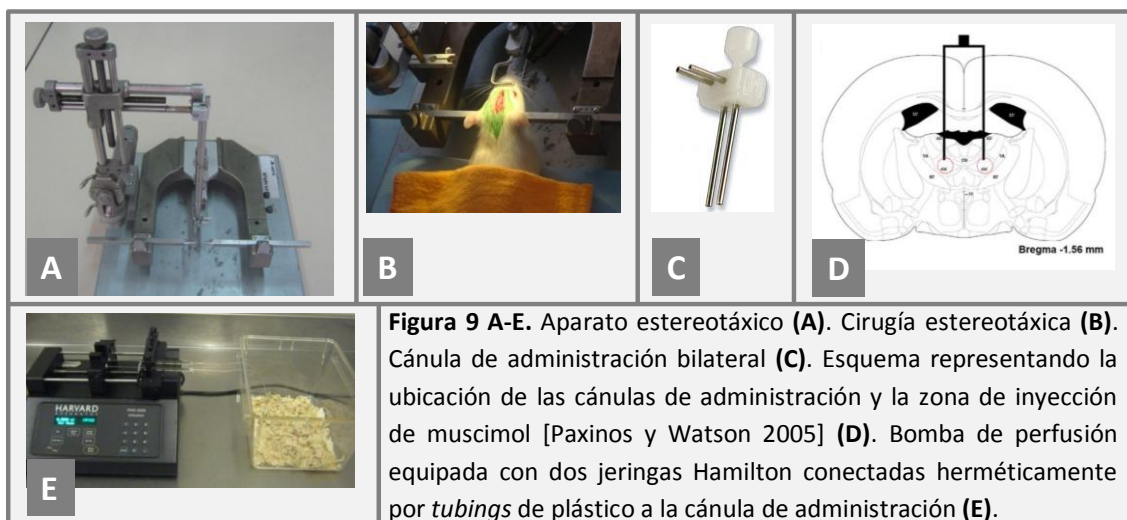
1.2 Estudio de la participación del núcleo anterior del tálamo en las conductas motoras inducidas por MK-801 a través de la inhibición GABAérgica de dicho núcleo.

Procedimiento experimental

Con el fin de determinar si el núcleo anterior del tálamo participaba en las alteraciones conductuales inducidas por MK-801, se utilizó un grupo de animales implantados con cánulas de administración bilaterales localizadas en el ATN.

Cirugía estereotáxica

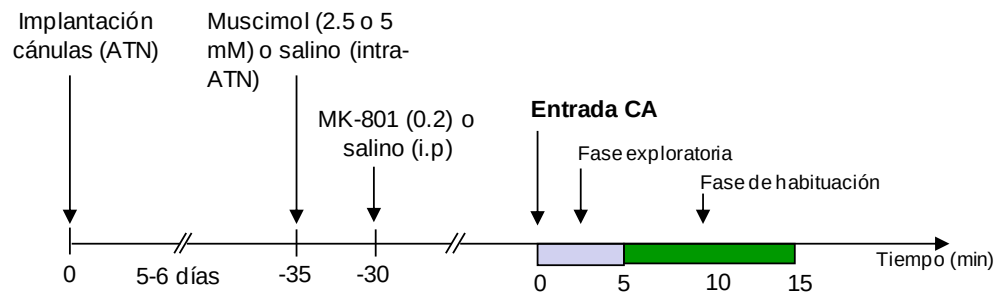
Los animales fueron anestesiadas con ketamina (90 mg/kg i.p.) y xilasina (5 mg/kg i.p.) y colocados en un estereotáxico para la implantación de cánulas bilaterales (Plastic One, USA) en el ATN según las coordenadas AP: -1,5; Lat: ± 1.0 ; DV: -6.0 tomadas del Atlas de Paxinos y Watson. El set utilizado para realizar el implante de las cánulas bilaterales y la posterior microinyección en el ATN se muestra en la Figura 9 A-E. Las cánulas fueron fijadas al cráneo con acrílico dental. Luego de la intervención los animales fueron trasladados nuevamente al Bioterio y monitorizados durante el período de recuperación por 5-6 días hasta el día del experimento.



El día del experimento los animales fueron designados para cada grupo experimental siguiendo un protocolo de doble inyección de acuerdo al Esquema 3. Muscimol fue microinyectado intra-ATN en dos concentraciones 2.5 y 5.0 mM (0.05 y 0.1 μ g

respectivamente), a un flujo de 0.1 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 2 min y 1 min de espera utilizando una bomba de perfusión Harvard PHD2000 (Figura 9 E). Cinco minutos después, los animales fueron inyectados i.p. con MK-801 (0.2 mg/kg) y 30 min. después los animales fueron colocados en el CA y se registraron las conductas motoras incluidas en el síndrome conductual durante 15 min.

Esquema 3: Protocolo experimental



Esquema 3. Protocolo experimental para la evaluación del efecto de la co-administración de muscimol (2.5 y 5.0 mM) intra-ATN sobre las alteraciones conductuales inducidas por la administración de MK-801 (0.2 mg/kg) en el CA.

Análisis histológico para la verificación de la localización de cánulas

Al final de cada experimento, los animales fueron sacrificados por decapitación. Los cerebros fueron disecados y congelados a -20°C . Posteriormente, la localización de las cánulas fue determinada por cortes a crióstato. Aquellos animales que no mostraron una correcta localización de las cánulas fueron excluidos del grupo experimental.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2

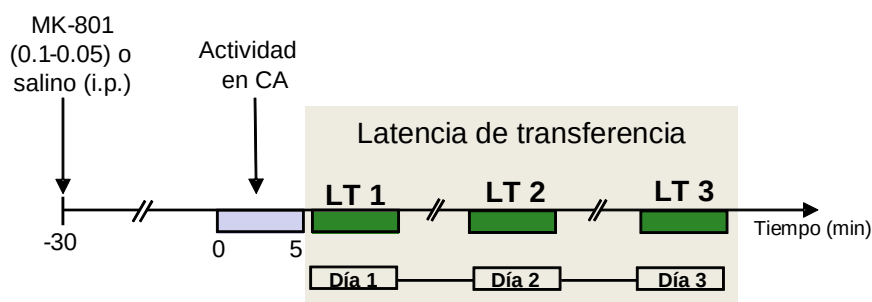
2. Estudio del efecto de Clozapina sobre las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801 en el modelo de memoria Latencia de Transferencia.

2.1 Caracterización de las alteraciones conductuales inducidas por la administración sistémica de MK-801 en el modelo Latencia de transferencia.

Procedimiento experimental

Con el fin de caracterizar el efecto inducido por la administración sistémica de MK-801 en el modelo de LT, en primer lugar se llevó a cabo una curva dosis-respuesta evaluando las dosis de 0.1 y 0.05 mg/kg de MK-801. Dichas dosis fueron seleccionadas basándonos en resultados previos de nuestro laboratorio [Meikle MN 2008]. El día 1 del test (hora 0) se inyectaron i.p. los animales con MK-801 0.1 y 0.05 mg/kg o vehículo. Luego de 30 min. los animales fueron colocados en el CA y se les registró la actividad motora durante 5 min. A continuación se evaluó la LT1 (Día 1) sobre el laberinto en cruz. Las LT2 y LT3 fueron registradas 24 hs. (Día 2) y 48 hs. (Día 3) después, respectivamente. El comportamiento de los animales durante los días 2 y 3 fue evaluado en ausencia de droga (Esquema 4).

Esquema 4: Protocolo experimental



Esquema 4. Protocolo experimental para la evaluación del efecto de MK-801 (0.1 o 0.05 mg/kg) sobre la función cognitiva, utilizando el parámetro de latencia de transferencia en el Laberinto en cruz elevado. La evaluación se realizó durante tres días consecutivos.

2.1.1 Evaluación del efecto sobre la ansiedad 24 horas después de la administración de MK-801 utilizando el modelo animal de ansiedad, Laberinto en cruz elevado.

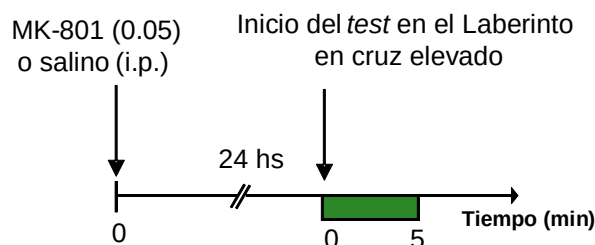
Como parte de la caracterización del efecto inducido por la administración sistémica de MK-801 en el modelo de LT, se evaluó el efecto sobre la ansiedad 24 hs después de administrar MK-801 a la dosis seleccionada previamente. Se utilizó el paradigma Laberinto en cruz elevado el cual es ampliamente utilizado para caracterizar drogas con un perfil ansiolítico o ansiogénico [Pellow S 1985]. Este modelo está basado en el

miedo natural de los animales a los espacios abiertos y elevados. Como consecuencia, las ratas tienden a evitar los brazos abiertos y permanecer más tiempo en los cerrados. Las drogas con propiedades ansiolíticas aumentan el número de entradas a los brazos abiertos y el tiempo de permanencia en los mismos, mientras que las drogas con propiedades ansiogénicas disminuyen dichos parámetros [Cruz A 1994].

Procedimiento experimental:

Los animales fueron inyectados con MK-801 (0.05 mg/kg) o salino i.p. y 24 hrs después se evaluó la ansiedad de los animales (Esquema 5). Los parámetros registrados fueron: número de entradas a los brazos cerrados, número de entradas a los brazos abiertos, tiempo de permanencia en los brazos cerrados, tiempo de permanencia en los brazos abiertos, *head dippings* (parámetro que se cuantifica sobre el brazo abierto cuando el animal explora fuera del margen del brazo y en dirección al suelo), *risk assessments* (parámetro que se cuantifica sobre el brazo cerrado cuando el animal evalúa el riesgo dirigiéndose hacia el brazo abierto) y llegadas a los extremos de los brazos abiertos.

Esquema 5: Protocolo experimental



Esquema 5. Protocolo experimental para la evaluación del efecto ansiolítico o ansiogénico de MK-801 (0.05 mg/kg), 24 hs. después de la inyección de la droga.

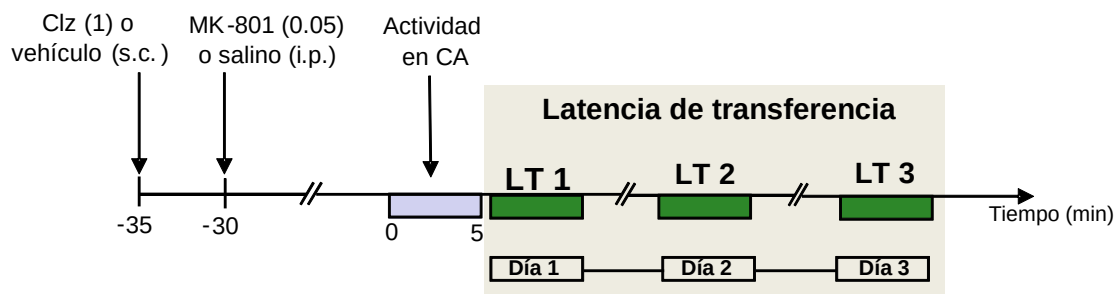
2.2. Determinación del bloqueo por Clozapina de las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801 en el modelo Latencia de Transferencia.

Procedimiento Experimental

El efecto de Clz sobre las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801, fue evaluado a través del ensayo de un protocolo de doble inyección sistémica co-administrando animales con Clz y MK-801. En esta serie de experimentos se utilizó una dosis de MK-801 de 0.05 mg/kg ya que ésta no generó una alteración significativa en la actividad motora de los animales. El día 1 del *test* los animales recibieron una primera inyección de Clz (1 mg/kg) o su vehículo (HCl 2%) s.c. y cinco minutos después, recibieron una segunda inyección i.p. de MK-801 (0.05 mg/kg) o salino. Media hora más tarde se

registró la actividad motora de los animales en el CA durante 5 min. A continuación se evaluó la LT1 (Día 1) sobre el laberinto en cruz. 24 y 48 horas después se registraron LT2 y LT3 respectivamente, en ausencia de las drogas (Ver Esquema 6).

Esquema 6: Protocolo experimental



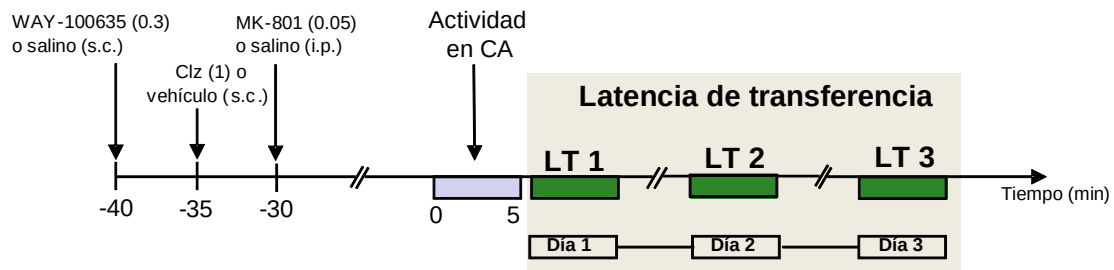
Esquema 6. Protocolo experimental para la evaluación del efecto de Clz (1 mg/kg) en animales tratados con MK-801 (0.05 mg/kg), utilizando la latencia de transferencia como parámetro de alteración de la función cognitiva. La evaluación se realizó durante tres días consecutivos.

2.3. Estudio del papel del subtipo de receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} en la acción de Clozapina sobre las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801.

Procedimiento experimental

En primer lugar se realizó una curva dosis-respuesta para seleccionar una dosis de WAY-100635 que no generara un efecto *per se* en la función cognitiva de los animales evaluada en el modelo LT. Dos dosis de WAY-100635 fueron ensayadas (1 y 0.3 mg/kg). Una vez determinada la dosis de WAY-100635 a ser utilizada, se realizó un protocolo de triple inyección detallado en el Esquema 7. El día 1 del *test* los animales recibieron una primera administración de WAY-100635 (0.3 mg/kg) o salino s.c., luego de 5 min. recibieron una segunda inyección de Clz (1 mg/kg) o HCl 2% s.c. y por último, se administró i.p MK-801 (0.05 mg/kg) o salino. Luego de 30 min. de espera, la actividad locomotora fue registrada en el CA por 5 min. A continuación, se registró LT1 en el plus-maze. 24 y 48 horas después LT2 y LT3 fueron registradas, respectivamente sin la administración de drogas (Ver Esquema 7).

Esquema 7: Protocolo experimental



Esquema 7: Protocolo experimental para evaluar la participación de los receptores 5-HT_{1A} en el mecanismo de acción de Clz sobre la función cognitiva en animales tratados con MK-801 (0.05 mg/kg) evaluada en el modelo LT. La evaluación se realiza durante tres días consecutivos.

VI. RESULTADOS I

1. Caracterización del papel del núcleo anterior del tálamo en el síndrome comportamental motor inducido por la administración sistémica de MK- 801.

1.1 Caracterización del síndrome conductual motor inducido por la administración sistémica de MK-801.

En primer lugar, se caracterizó la inducción del síndrome conductual motor en animales luego de la administración sistémica de MK-801 a una dosis de 0.2 mg/kg (Esquema 2 en Materiales y Métodos). Los resultados mostraron que el antagonista NMDA produjo un aumento en la actividad locomotora en los animales en comparación con el grupo control en función del tiempo registrado (Fig. 10A). Contrario a lo que sucede en el perfil comportamental de un animal control, los tratados con MK-801 no mostraron habituación al CA ya que mantienen una actividad constante a lo largo del tiempo y significativamente diferente con respecto al control tanto en la fase exploratoria ($p < 0.001$) como en la fase de habituación ($p < 0.001$; Fig. 10A). La Fig. 10B muestra que el aumento en la actividad motora total resultó estadísticamente significativo ($p < 0.001$) con respecto al control.

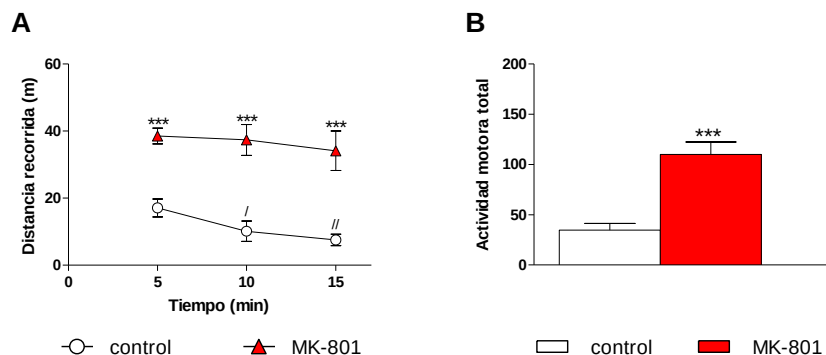


Figura 10 A-B. Efecto de MK-801 (0.2 mg/kg) sobre la actividad motora expresada en intervalos de 5 min. (A) o en los 15 min. totales de registro (B). Los datos se expresan como la media $\pm$ EEM de la distancia recorrida (m, Ethovision) durante 15 min. de los animales inyectados con MK-801 o salino (control). ANOVA de dos vías seguido del Test de Newman Kewls o *t-Student*. /= vs control 5 min. *= vs control. / = $p < 0.05$. // = $p < 0.01$. ***= $p < 0.001$. N= 6-7.

En la Figura 11 A-B se muestran las imágenes representativas del patrón del movimiento para cada tratamiento obtenidas a través del software de video seguimiento.

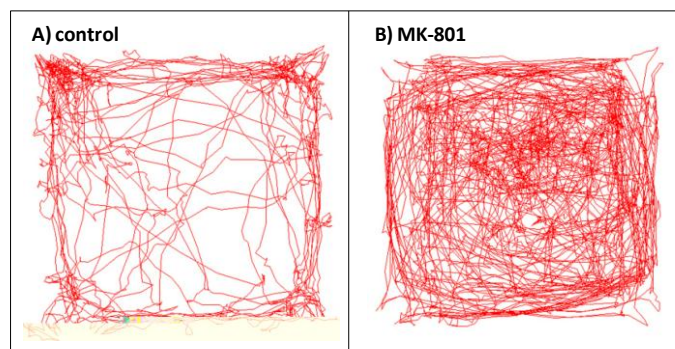


Figura 11 A-B. Recorridos representativos del grupo control (A) y del tratado con MK-801 (0.2 mg/kg, B).

Se pudo observar que la administración sistémica de MK-801 generó un patrón locomotor más intenso que el grupo control reflejando la hiperactividad inducida por la droga.

La Tabla 3 muestra el efecto de MK-801 en el número de *rearings* y otras conductas que forman parte del síndrome conductual motor. La actividad exploratoria vertical de los animales inyectados con MK-801 no fue modificada en forma significativa. Las *head shakes* no fueron significativamente modificadas, sin embargo, la administración de MK-801 indujo la aparición de *head weavings* si bien no se alcanzó la significancia estadística con respecto al grupo control. En cuanto a los signos de ataxia, MK-801 indujo un aumento significativo en la aparición de caídas torpes ($p < 0.05$) sin alterar el grado de abducción de las patas traseras. Finalmente, el tratamiento con MK-801 provocó un patrón locomotor desorganizado y continuo del movimiento ($p < 0.001$ y $p < 0.01$, respectivamente).

Tabla 3. Conductas motoras inducidas por MK-801

Tratamiento	<i>Rearings</i> (0-5)	Estereotipias		Signos de ataxia		Patrón motor	
		Nº <i>Head shakes</i>	Nº <i>Head weavings</i>	Nº Caídas torpes	Abducción de patas (0-3)	Movimiento desorganizado (0-3)	Movimiento continuo (0-3)
control	32.3 ± 3.9	5.3 ± 1.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MK-801	21.4 ± 6.1	3.8 ± 1.5	6.6 ± 3.8	11.9 ± 4.4*	0.0 ± 0.0	2.4 ± 0.4***	1.9 ± 0.5**

Tabla 3. Efecto del MK-801 (0.2 mg/kg) sobre la conducta exploratoria vertical durante la fase exploratoria (primeros 5 min. de registro), estereotipias, signos de ataxia y el patrón locomotor durante 15 min de registro. Los datos se expresan como la media ± EEM. *Test t-Student*. * = vs control; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$. N= 6-7.

En su conjunto, estos resultados demostraron que la administración sistémica de MK-801, a la dosis inyectada, indujo casi la totalidad de las alteraciones conductuales que aparecen en el síndrome comportamental característico que esta descrito en la literatura [Andine P 1999, Geyer MA 2003, Scorza MC 2008].

1.2 Estudio de la participación del núcleo anterior del tálamo en las conductas motoras inducidas por MK-801 a través de la inhibición GABAérgica de dicho núcleo.

Una vez caracterizado el síndrome motor inducido por MK-801 se continuó con la determinación del papel del ATN en la inducción de dicho síndrome mediado por un mecanismo de desinhibición GABAérgica. Para ello se evaluaron las conductas que componen el síndrome comportamental, luego de la co-administración intra-ATN del agonista GABA_A muscimol (2.5 y 5.0 mM) o salino y MK-801 (0.2 mg/kg) o salino de forma sistémica (ver Esquema 3 en Materiales y Métodos).

Al igual que lo observado en animales no operados, los animales microinyectados con salino intra-ATN e inyectados sistémicamente con MK-801 mostraron un aumento significativo en la actividad locomotora en función del tiempo, sin manifestar el proceso de habituación que desarrollan los animales control ($p < 0.001$ para la fase exploratoria y de habituación; Fig. 12A). A su vez, los animales microinyectados con muscimol (2.5 mM) intra-ATN y salino i.p. mostraron un comportamiento similar al grupo control, sin que la droga modifique *per se* la actividad en la fase exploratoria o de habituación al CA. Además, los animales pre-inyectados con muscimol (2.5 mM) en el ATN restauraron completamente la actividad alterada por la inyección intraperitoneal de MK-801 llevándola a un patrón conductual similar a la observada en el grupo control.

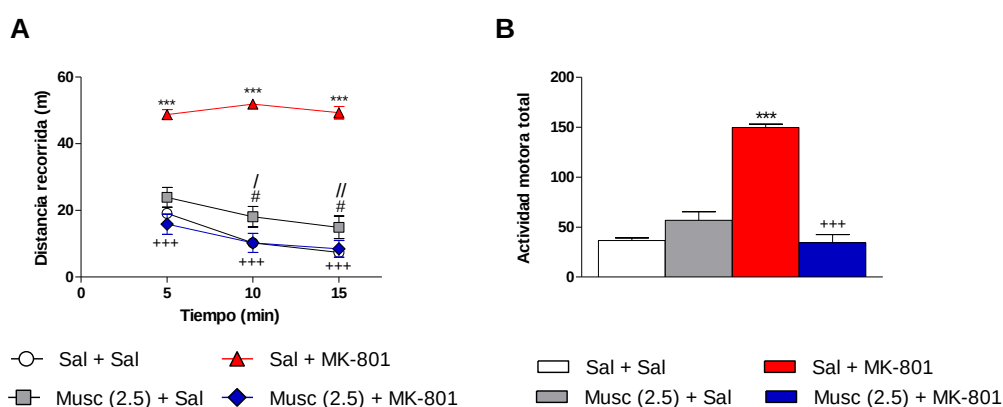


Figura 12 A-B. Efecto de MK-801 (0.2 mg/kg, i.p.) y la co-administración de muscimol 2.5 mM intra-ATN sobre la actividad motora medida como distancia recorrida (mts; Ethovision) cada 5 minutos (A) o en el tiempo total de registro (B). Los datos se expresan como la media $\pm$ EEM. ANOVA de una y dos vías seguido del Test de Newman-Keuls. * = vs Sal + Sal; + = vs Sal + MK-801; / = Sal + Sal 5 min. vs Sal + Sal 10 y 15 min; # = Musc + MK-801 5 min. vs Musc + MK-801 10 y 15 min.; ***, +++ = $p < 0.001$. // = $p < 0.01$. /, # = $p < 0.05$. N= 6 - 7.

En la actividad motora total, la microinyección de muscimol (2.5 mM) intra-ATN bloqueó significativamente la hiperactividad inducida por MK-801 ($p < 0.001$) sin modificar la actividad basal de los animales (Fig. 12B).

Por otra parte, los animales tratados con muscimol 5.0 mM intra-ATN se comportaron de manera similar a lo observado anteriormente. Los inyectados con salino i.p.

mostraron un comportamiento similar al grupo control y los inyectados con MK-801 i.p. restauraron completamente la actividad alterada por el antagonista NMDA (Fig. 13 A-B), indicando que muscimol 5.0 mM bloqueó la acción comportamental inducida por el MK-801.

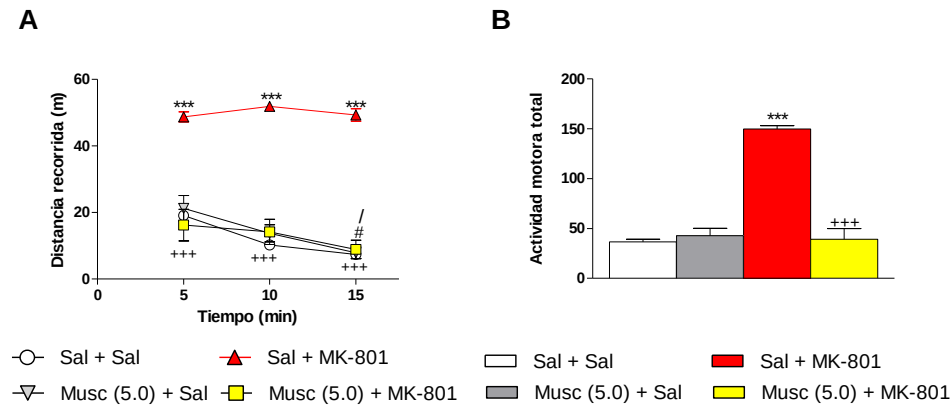


Figura 13 A-B. Efecto de MK-801 (0.2 mg/kg, i.p.) y la co-administración de muscimol 5.0 mM intra-ATN sobre la actividad motora medida como distancia recorrida (mts; Ethovision) cada 5 minutos (A) y en el tiempo total de registro (B). Los datos se expresan como la media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía seguido del *Test* de Newman-Keuls. * = vs Sal + Sal; + = vs Sal + MK-801; / = Sal + Sal 5 min vs Sal + Sal 15 min; # = Muscimol + MK-801 5 min vs Muscimol + MK-801 15 min; ***, +++ = $p < 0.001$. // = $p < 0.01$. /, # = $p < 0.05$. N = 6 - 9.

No se demostró una relación dependiente de la concentración en la respuesta comportamental de los animales pre-tratados con ambas dosis de Muscimol aplicadas en el tálamo y salino o MK-801 sistémicos. Los valores correspondientes a la Media $\pm$ EEM de cada grupo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Efecto de Muscimol intra-ATN en la actividad motora total inducida por MK-801 i.p.

Variable	Tratamiento			
	Musc (2.5) + Sal	Musc (5) + Sal	Musc (2.5) + MK-801	Musc (5) + MK-801
Actividad Motora Total (m)	56.9 $\pm$ 8.5	42.9 $\pm$ 7.4	34.6 $\pm$ 8.0	39.2 $\pm$ 10.8

Tabla 4. Actividad motora durante 15 minutos registrada como distancia recorrida en metros. Los datos se expresan como la media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía seguido del *Test* de Newman-Keuls. No hubo diferencias significativas.

En la Figura 14 A-F se muestran las imágenes representativas de los recorridos (patrón de movimiento) en función de cada tratamiento. Se puede apreciar que la administración de salino intra-ATN y MK-801 sistémico generó un patrón locomotor más intenso que el observado en el grupo control. Tanto muscimol 2.5 como 5.0 mM

intra-ATN restauraron el patrón locomotor alterado por la administración de MK-801, sin modificar la actividad basal de los mismos.

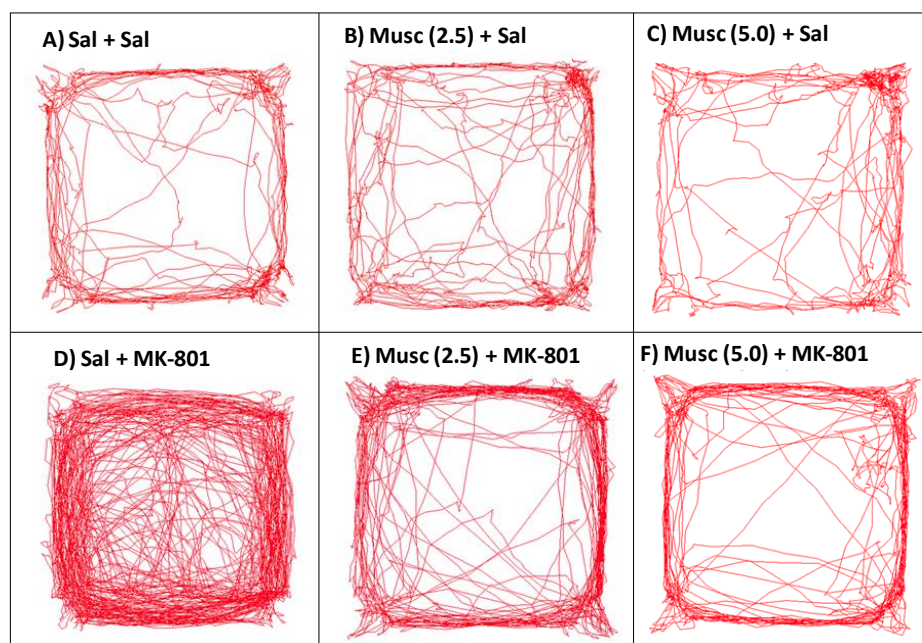


Figura 14 A-F. Imágenes representativas de los recorridos (*tracks*) realizados por los animales de los diferentes grupos experimentales (Software Ethovision XP).

La Tabla 5 muestra el resultado de la administración de muscimol (2.5 y 5.0 mM) intra-ATN sobre las estereotipias, los signos de ataxia y el patrón locomotor inducidos luego de la inyección sistémica de MK-801. Se pudo observar que los animales pre-tratados con salino intra-ATN e inyectados i.p. con MK-801 no mostraron diferencias en la inducción del número de *rearings* con respecto a los animales control. Sin embargo, luego de la co-administración de muscimol 2.5 mM y 5.0 mM se observó una marcada disminución en el número de *rearings*, alcanzando únicamente una diferencia significativa en el grupo co-administrado con muscimol 5.0 mM. No se observaron modificaciones en el número de *head shakes*. En el caso de los *head weavings* se observó una disminución en el número de veces que los animales tratados con MK-801 y ambas concentraciones de muscimol realizaron esta conducta, sin embargo, la disminución no fue significativa. A su vez, se observó un bloqueo significativo comparado con el grupo control tanto en el número de caídas torpes ($p < 0.001$ para muscimol 2.5 y $p < 0.05$ para muscimol 5.0), el movimiento desorganizado y el patrón de movimiento continuo ($p < 0.001$ para ambos). El grado de abducción de las patas traseras no se vio modificado en los grupos evaluados.

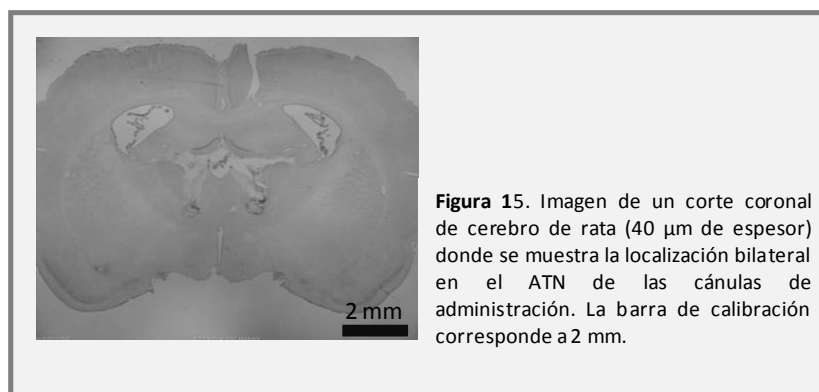
Tabla 5. Efecto de Muscimol intra-ATN en las conductas motoras inducidas por MK-801 i.p.

Tratamiento	Rearings (0-5)	Estereotipias		Signos de ataxia		Patrón motor	
		Nº Head shakes	Nº Head weavings	Nº Caídas torpes	Abducción de patas (0-3)	Movimiento desorganizado (0-3)	Movimiento continuo (0-3)
Sal + Sal	26.7 ± 5.4	3.1 ± 0.8	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Sal + MK-801	28.7 ± 9.8	0.3 ± 0.2	2.7 ± 1.9	10.2 ± 2.5***	0.0 ± 0.0	2.5 ± 0.2***	1.3 ± 0.2***
Musc (2.5)+Sal	22.2 ± 4.9	5.0 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Musc (5)+Sal	26.3 ± 6.9	3.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Musc (2.5)+MK-801	5.4 ± 4.9	2.5 ± 0.9	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.7***	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.2***	0.2 ± 0.1***
Musc (5)+MK-801	4.2 ± 2.1*+	3.8 ± 1.7	0.4 ± 0.4	5.2 ± 3.4 ⁺	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.4 ⁺⁺⁺	0.0 ± 0.0***

Tabla 5. Efecto de la co-administración de muscimol 2.5 y 5.0 mM intra-ATN sobre la conducta exploratoria vertical durante la fase exploratoria (primeros 5 min. de registro), las estereotipias, signos de ataxia y patrón motor inducidas 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 Sal + MK-801; *, + = $p < 0.05$; ***, +++ = $p < 0.001$. N = 6-9.

En su conjunto, los resultados demuestran que la activación de los receptores GABAérgicos por la microinyección de muscimol 2.5 y 5.0 mM intra-ATN fue capaz de bloquear las conductas inducidas por la administración sistémica de MK-801.

La Figura 15 muestra una imagen representativa de los animales operados con una cánula bilateral implantada en el ATN, confirmando así su localización.



1.3. Discusión de resultados I

El primer objetivo del trabajo de Tesis se centró en estudiar la participación del núcleo anterior del tálamo en la generación del síndrome conductual motor característico del bloqueo de receptores NMDA (a través del uso de MK-801), con el fin de profundizar en las bases neurales involucradas en la sintomatología positiva de la esquizofrenia. A su vez, los experimentos fueron diseñados para comprobar la hipótesis de la desinhibición GABAérgica en el mecanismo de acción del MK-801.

La mayoría de los cambios conductuales (hiperlocomoción, estereotipias, ataxia y patrón desorganizado) observados en los animales tratados con MK-801, coinciden con resultados previamente descritos en la literatura confirmando la inducción del síndrome conductual motor característico de los antagonistas NMDA [Andiné P 1999; Geyer MA 2003; Moghadam B 2003; Scorza MC 2008]. La conducta de *rearings* no se vio alterada significativamente en relación a estudios previos (Tabla 3). La actividad exploratoria vertical o *rearing* está descrita en la literatura como una conducta natural que expresan los animales al ser expuestos a un ambiente novedoso. Dicha respuesta se ve exacerbada en los primeros 5 min. del registro, decayendo a medida que los animales se van habituando. En trabajos previos, fue descrito que el tratamiento con MK-801 (0.2 mg/kg) generaba una disminución significativa en dicha conducta, la que estuvo asociada al gran aumento en la actividad motora horizontal que produce el bloqueo de los receptores NMDA, posiblemente en relación a la alteración en la habituación que genera dicha droga en los animales [Scorza MC 2008; 2010]. Las razones por las que en el presente trabajo no se alteró significativamente dicha respuesta no están claras. Variables en la inyección-absorción de la droga, dosis o en la actividad basal previa de los animales pueden ser consideradas. Sin embargo, a pesar de no alcanzar una significancia estadística, los animales tratados con MK-801 mostraron una alteración en la capacidad de habituación al ambiente al menos en relación a la actividad locomotora horizontal, lo que podría estar relacionado con la acción psicotomimética de la droga.

La microinyección de salino en el ATN permitió la inducción del síndrome comportamental luego de la inyección sistémica de MK-801 (0.2 mg/kg). El mismo fue similar al observado en animales no operados e inyectados con MK-801 (0.2 mg/kg). Estos resultados demuestran que la manipulación quirúrgica no alteró la capacidad de la droga de inducir los cambios conductuales característicos. A su vez confirma que el tiempo elegido para la recuperación post-quirúrgica de los animales fue el correcto. La microinyección bilateral intra-ATN de ambas dosis de muscimol, 2.5 y 5.0 mM, bloqueo de manera significativa los cambios conductuales incluidos en el síndrome comportamental en respuesta a la inyección sistémica de MK-801. Ya sea la hiperactividad, las estereotipias y los signos de ataxia. Además se observó un

restablecimiento del patrón motor alterado por el antagonismo NMDA, reflejándose en la descripción de un recorrido motor similar al registrado en animales control. El bloqueo del síndrome comportamental motor inducido por MK-801 sistémico se alcanzó por la activación de receptores GABA_A en el ATN luego de la microinyección del agonista GABA_A muscimol. Estos resultados sugieren tres situaciones: 1) que el ATN es una región clave en la inducción del síndrome motor característico del MK-801; 2) habría un componente GABAérgico mediando el mecanismo de acción del MK-801 el cual debe ser desinhibido para la generación del síndrome conductual; 3) ese componente GABAérgico controlaría la actividad de las neuronas del ATN y por lo tanto su salida hacia otras regiones cerebrales. Es posible que la administración de muscimol re-establezca un desbalance excitatorio (GLU)/inhibitorio (GABA) en el ATN el cual se estaría alterando luego de la administración sistémica de un bloqueante de receptores NMDA. Los resultados presentados en el trabajo de tesis concuerdan con evidencias ya publicadas en la literatura las cuales vinculan la aparición de ciertos efectos inducidos por la administración sistémica de antagonistas NMDA, tales como la excitotoxicidad o el aumento en la actividad de disparo de neuronas corticales. Los autores proponen que dichos efectos son consecuencia de un desbalance en el control excitatorio/inhibitorio en regiones sub-corticales [Tomitaka S 2000; Farber NB 2003; Zhang Y 2009].

La actividad de *rearings* fue el único comportamiento dentro del síndrome conductual de MK-801 que se vio fuertemente disminuida luego de la co-administración de Muscimol intra-ATN. No están claras las razones que expliquen dicha potenciación, sin embargo parece ser un comportamiento que no dependería del restablecimiento excitatorio/inhibitorio en el ATN. No se descarta la participación de un sistema de neurotransmisión no-GLUérgico y no-GABAérgico en la inducción de dicha conducta.

En términos generales, nuestros resultados sugieren que el ATN es una región que participa en la inducción del síndrome conductual motor inducido por MK-801, apoyando la hipótesis de un mecanismo de desinhibición en la base de las acciones inducidas por los antagonistas NMDA. El núcleo reticular del tálamo (RT) proporciona una de las aferencias inhibitorias (vía GABA) de mayor relevancia controlando la actividad de los diferentes núcleos del tálamo. En particular, es la aferencia inhibitoria más importante del ATN [Gonzalo-Ruiz G 1996; 1997]. De hecho, en el tálamo de ratas hay un escaso número de interneuronas inhibitorias [Sawyer SF 1994] por lo que el control inhibitorio en el ATN se da principalmente a través del RT. En este sentido, la disminución en la actividad de neuronas del RT provocaría, entre otras cosas, la desinhibición de las neuronas del ATN (las cuales expresan receptores GABA_A) resultando en una activación de las eferencias de este núcleo hacia regiones corticales y subcorticales las cuales podrían ser las responsables, al menos en parte, de las alteraciones motoras observadas luego de la administración de MK-801 sistémico.

Como se mencionó anteriormente, el ATN es un núcleo talámico de asociación que posee abundantes conexiones recíprocas con la corteza cingulada posterior o corteza retrosplenial (RSC). El circuito conformado por ATN y RSC se ha relacionado con los aspectos motivacionales de las tareas de aprendizaje, la atención y la memoria, aunque no con la función motora directa; la RSC proyecta hacia la corteza cingulada anterior, cortezas motora y premotora y subiculum contribuyendo al control de diferentes funciones motoras [Shibata H 2004]. De forma interesante, se ha identificado dicha corteza como uno de los sitios del SNC que muestra mayor vulnerabilidad a la toxicidad causada por el bloqueo NMDA. A su vez, se demostró que dicha toxicidad disminuye luego de la administración de los fármacos antipsicóticos haloperidol y Clz [Sharp F 2001; Farber N 2003]. Ambas evidencias sugieren que una alteración en los circuitos que involucren a la RSC podría estar mediando el síndrome motor inducido por MK-801 y sugiriendo su participación en la sintomatología positiva de la esquizofrenia.

Es importante mencionar que el MK-801, luego de su administración sistémica, actuará sobre receptores tipo NMDA expresados a lo largo del SNC, incluidos aquellos que se encuentran expresados en el RT y/o en el ATN. Sin embargo, los resultados obtenidos en estos experimentos sugieren que el bloqueo de los receptores NMDA del RT estaría predominando sobre el bloqueo de receptores NMDA expresados en otras regiones, es decir que MK-801 estaría actuando preferentemente sobre el RT. En este sentido, existen evidencias en la literatura que apoyan la idea que una acción preferencial en ciertas regiones del SNC de los antagonistas NMDA, entre las cuales se encuentran el RT. Por ejemplo, se ha visto que luego de la administración sistémica de PCP o MK-801 hay una expresión diferencial del gen c-fos en el RT en comparación con otros núcleos del tálamo [Väissänen J 2003; Santana N 2011]. Interesantes hallazgos más recientes demostraron que existe un subtipo de receptor NMDA compuesto por las subunidades NR2C que le confieren una mayor sensibilidad al bloqueo NMDA a aquellas neuronas del RT que los expresan. Esto se debe a que este subtipo de receptor NMDA posee una baja sensibilidad al bloqueo por Mg^{2+} , encontrándose en su forma activa en condiciones de potencial de reposo y activándose en respuesta al neurotransmisor glutamato sin la necesidad de una previa despolarización neuronal. Es por esta razón que la administración de un antagonista NMDA facilitaría la inhibición en aquellas neuronas que expresen dichos receptores. De manera interesante, este tipo de receptores se expresan abundantemente en las neuronas GABAérgicas del RT [Zahng Y 2009]. Sin embargo, no se puede dejar de mencionar que otras aferencias GABAérgicas provenientes de los ganglios basales [Price JL 1995] y que alcanzan al tálamo, también podrían estar jugando un papel en la desinhibición del ATN.

Teniendo en cuenta la interconexión existente entre los diferentes sistemas de neurotransmisión del SNC, a partir de la cual un desbalance Glutamatérgico/GABAérgico podría generar alteraciones en otros, no se debe desconocer la participación de otros sistemas de neurotransmisión en la modulación de la actividad de los diferentes circuitos talámicos. Por ejemplo, se ha descrito que las neuronas GABAérgicas del RT reciben inervación DAérgica proveniente de la Sustancia Nigra compacta y expresan receptores DAérgicos, del tipo D2 y D4 [Anaya-Martinez V 2006; Govindaiah G 2010], indicando que el sistema DAérgico participa en la modulación de la actividad del RT y por lo tanto de sus eferencias hacia los núcleos talámicos a los que proyecta, entre ellos el ATN. En particular, existen evidencias demostrando que la administración de un antagonista selectivo NMDA (APV) en el RT induce la generación de oscilaciones delta en algunos circuitos tálamo-corticales, efecto que se bloquea luego de la administración de fármacos antagonistas D₂ [Zhang Y 2009]. Los autores mencionan que el efecto requiere de la liberación de DA de los axones DAérgicos que inervan al RT, sugiriendo la existencia de una acción sinérgica entre la hipofunción NMDA y la transmisión DAérgica en la activación de las neuronas GABAérgicas del RT. De manera interesante, este tipo de oscilaciones lentas aparecen en forma elevada en pacientes esquizofrénicos y se asocian con la aparición de síntomas positivos [Llinás R 1999; Boutros N 2008]. Por lo tanto, estas evidencias apoyan una posible integración de las hipótesis neuroquímicas (en particular (GLUérgica, DAérgica y GABAérgica) propuestas para explicar la sintomatología positiva de la patología de la esquizofrenia a nivel de los circuitos tálamo-corticales.

Cabe resaltar algunas consideraciones a tomar en cuenta para la interpretación de los resultados obtenidos. Una posible difusión de muscimol hacia núcleos talámicos vecinos del ATN, tales como los núcleos ventrolateral, ventromedial (VL/VM) y mediodorsal (MD) parece improbable, ya que se ha demostrado que la administración local de muscimol en el VL/VM induce catalepsia [Klockgether TH 1986]. Dicho efecto comportamental no fue observado en los experimentos realizados en este trabajo. Adicionalmente, se consideró que la participación del MD en las conductas observadas luego de la administración de MK-801 sería de menor relevancia, dado que el MD envía sus proyecciones mayormente hacia la CPF, región que se ha demostrado no participa significativamente en la generación del síndrome comportamental motor de MK-801 [Scorza MC 2008]. Por último, el volumen de muscimol administrado es pequeño, por lo tanto, parecería correcto considerar que su distribución se restringió al ATN. Sin embargo, experimentos de administración de un colorante intra-ATN, reproduciendo las condiciones experimentales aplicadas para la administración de muscimol, confirmarían específicamente el área de difusión del agonista GABAérgico administrado. Finalmente, los resultados encontrados no descartan una posible participación de otras regiones del SNC en la generación de los efectos motores inducidos por MK-801.

En su conjunto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis y las evidencias de la literatura mencionadas, sugerimos que el circuito talámico que involucra el RT y su control inhibitorio sobre el ATN debiera ser considerado como un circuito clave en la inducción del síndrome conductual motor inducido por MK-801. En el Esquema 8 se propone un posible mecanismo a través del cual MK-801 podría estar actuando para inducir las alteraciones motoras observadas. Los resultados obtenidos aportan importante información en el estudio de la neurobiología de base de los síntomas psicóticos en la esquizofrenia.

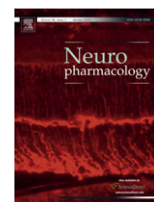
Esquema 8 A-C. El diagrama propone la presencia de 3 pasos implicados en el mecanismo de acción de MK-801 para inducir el síndrome motor con la participación del ATN en dicha inducción. Funcionamiento del circuito talámico en condiciones de equilibrio normales de excitación-inhibición (A). Equilibrio excitatorio-inhibitorio del circuito talámico puede ser alterado luego de la administración sistémica de MK-801. Se propone que la administración sistémica de MK-801, bloquea preferentemente receptores NMDA excitatorios presentes en el RT ejerciendo una desinhibición del ATN y como consecuencia, aumentando la salida GLUérgica de las neuronas de proyección del ATN hacia áreas terminales (corteza prefrontal; corteza retrosplenial RSC; áreas motoras) (B). La microinyección bilateral en el ATN de muscimol restauraría el equilibrio excitatorio-inhibitorio a una situación normal (C). Se muestran también proyecciones GABAérgicas provenientes de núcleos de los ganglios basales (globo pálido, pálido ventral y la pars reticulata de la sustancia negra) hacia neuronas tálamo-corticales. Diagrama basado en Gonzalo-Ruiz G 1996 y Tomitaka S 2000.

PUBLICACIÓN CIENTÍFICA



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm

Role of the anterior thalamic nucleus in the motor hyperactivity induced by systemic MK-801 administration in rats

Ximena López Hill, María Cecilia Scorza*

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 October 2011

Received in revised form

4 January 2012

Accepted 28 January 2012

Keywords:

NMDA receptor antagonists

Anterior thalamus nucleus

Muscimol

Hyperlocomotion

ABSTRACT

Non-competitive N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA-R) antagonists have been extensively used in rodents to model psychotic symptoms of schizophrenia. Although the motor syndrome induced by acute and systemic administration of low doses of dizocilpine (MK-801) has been extensively characterized, its neurobiological basis is not fully understood. NMDA-R antagonists can disinhibit excitatory inputs in certain brain areas, but the precise circuitry is not fully known.

We examined the involvement of the anterior thalamic nucleus (ATN) in hyperlocomotion and other related behaviors (stereotypies, ataxia signs) induced after acute systemic administration of MK-801. Since GABAergic neurons of the reticular thalamic nucleus (RTN) exert the main inhibitory control on thalamic projection neurons, we hypothesized that systemically injected MK-801 might block NMDA-R on RTN GABAergic neurons. This effect would subsequently result in disinhibition of GABAergic inputs onto ATN projections to cortical motor areas, thereby inducing behavioral effects. We evaluated the behavioral syndrome induced by the systemic administration MK-801 (0.2 mg/kg) in control rats and in rats subjected to a bilateral stereotaxic infusion of the GABA_A agonist muscimol (0.2 µl of 2.5 and 5.0 mM; 0.5–1 nmol per application, respectively) into the ATN. As previously reported, MK-801-induced hyperlocomotion in parallel with disorganized movements (e.g. not guided by normal exploration) slight ataxia signs and stereotypies. All responses were antagonized by pre-infusion of muscimol but not saline into the ATN. According to our results we suggest that the ATN plays a role on hyperlocomotion evoked by MK-801 and could involve a thalamic GABAergic disinhibition mechanism.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The strongest evidence that links schizophrenia to excitatory neurotransmission is the finding that the non-competitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor (NMDA-R) antagonists produce psychotic symptoms in healthy individuals and exacerbate clinical symptoms in schizophrenic patients (Coyle, 1996; Javitt and Zukin, 1991; Kim et al., 1980; Olney and Farber, 1995). This evidence suggests the existence of glutamatergic abnormalities in schizophrenia (Lahti et al., 1995, 2001; Malhotra et al., 1997).

In rodents, the systemic administration of the NMDA-R antagonists such as phencyclidine (PCP), ketamine or dizocilpine maleate (MK-801), elicited a behavioral syndrome characterized by hyperlocomotion, ataxia signs and stereotypies (Andiné et al., 1999; Bradford et al., 2010; Geyer and Ellenbroek, 2003; Javitt, 2004; Moghaddam and Jackson, 2003; Scorza et al., 2008). Despite a large body of literature characterizing the above behavioral

syndrome, the brain networks and involved cellular mechanisms are not fully understood.

It has been postulated that NMDA-R antagonists may produce a disruption of the excitatory/inhibitory (E/I) balance via disinhibition of GABAergic inputs to glutamate-containing neurons, enhancing AMPA-mediated neurotransmission in cortical and subcortical regions (DeGiorgio et al., 1999; Kehrer et al., 2008; Krystal et al., 2003; Marek et al., 2010; Moghaddam et al., 1997; Sharp and Tomitaka, 2001; Tomitaka et al., 2000). The thalamus, which provides the main subcortical excitatory input to the cortex, has become an important focus of research in schizophrenia (Andreasen, 1997; Young et al., 2000). Indeed, MK-801 and PCP enhanced *c-fos* expression in various thalamic nuclei that project to motor and association cortical areas (Kargieman et al., 2007; Santana et al., 2011; Väisänen et al., 2004). Likewise, the connectivity between the anterior thalamus nuclei (ATN) and the retrosplenial cortex (RSC) is associated with the neuronal injury induced by MK-801 (Sharp et al., 1991; Tomitaka et al., 2000). The activity of ATN neurons is tightly controlled by GABAergic neurons of the reticular thalamic nucleus (RTN) while ATN neurons send glutamatergic collateral projections to the GABAergic neurons of the RTN

* Corresponding author. Tel.: +598 2487 1616x115; fax: +598 2487 5548.
E-mail address: scorza@iibce.edu.uy (M.C. Scorza).

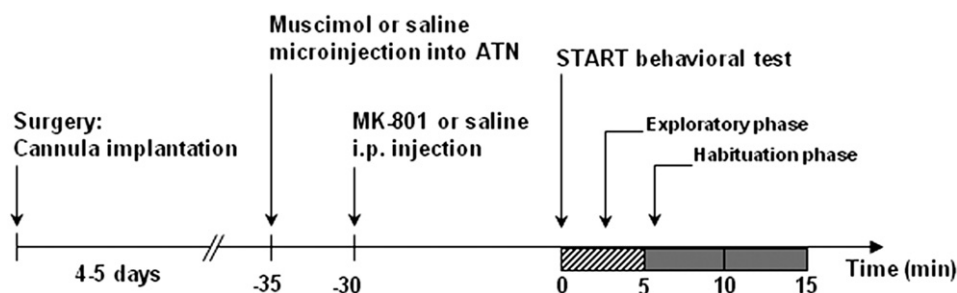


Fig. 1. Schematic representation of the experimental protocol.

(Gonzalo-Ruiz et al., 1996, 1997) to modulate the thalamic-cortical outputs. Interestingly, it has been proposed that this thalamic-cortical circuit is involved in psychosis (Tomitaka et al., 2000) in accordance with evidence that shows thalamic abnormalities in schizophrenia (Andreassen, 1997; Buchsbaum et al., 1996; Young et al., 2000). Here, we investigated the role played by the ATN as a possible substrate involved in the induction of the behavior responses by MK-801. The study was based on the working hypothesis that behavioral actions of MK-801 are caused by hyperactivity of the ATN, following blockade of NMDA-R in GABAergic afferents of the RTN to this thalamic nucleus. We examined the behavioral effects of the systemic administration of the NMDA-R antagonist MK-801 in control rats and in rats whose GABA_A tone in the ATN was increased by the local stereotaxic application of the GABA_A agonist muscimol in order to normalize the E/I balance in the ATN.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats (250–300 g) obtained from the IIBCE animal facilities (Montevideo) were used in this study. The animals were housed in groups of 6 in plastic cages (50 × 37.5 × 21 cm) with food and water available *ad libitum* 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 Guiding principles in the care and use of animals – DHEW Publications, NIH, 80-23) 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 in order 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] was obtained from Sigma RBI. Muscimol was kindly provided by Dr. Pablo Tortorolo (Faculty of Medicine, Uruguay). Ketamine and xylazine were from Konsol Köning S.A Laboratory. MK-801 and muscimol were dissolved in saline. Aliquots were prepared and stored at –20 °C.

2.3. Surgical procedures

The animals were anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of a mixture of ketamine (90 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg) and mounted in a stereotaxic apparatus (David Kopf Instruments, USA). Following a scalp incision, skull landmarks were visualized and coordinates were determined from Paxinos and Watson (2005) atlas. Two small holes were bilaterally drilled in the skull at the ATN coordinates (from duramater and bregma in AP: –1.5 mm, L: ±1.0 mm and DV: –6.0 mm; according to Tomitaka et al., 2000). Thereafter, injection stainless steel bilateral cannula (28 G, 3280PD style-2.0/SPC, Plastics One, USA) were slowly inserted into both holes to reach the ATN. Two small stainless steel screws serving as anchors were cemented to the skull with dental acrylic. After recovering from anesthesia the rats were returned into their home cages to the animal rooms until the day of the experiment (typically 4–5 days after cannula implants). During this period the animals were housed in groups of 3–4 to reduce the risk of injury with the implanted cannula.

2.4. Treatments

On the day of experiment, animals were first microinjected bilaterally into the ATN, with either muscimol (2.5 and 5.0 mM) or vehicle (saline). The intra-thalamic microinjections were performed by connecting the bilateral injection cannula to plastic tubing and these to an infusion pump (Harvard Apparatus, Instech USA). Then, the animals were allowed to move freely in the cage while saline or muscimol were perfused at a flow rate of 0.1 µl/min during 2 min (final volume of 0.2 µl), which corresponds to a total amount of 0.5–1.0 nmol of muscimol (2.5 and 5.0 mM, respectively) per injection site. Five min after the muscimol microinjection into the ATN, rats received an intraperitoneal (i.p.) injection of saline or MK-801 (0.2 mg/kg) and 30 min later, animals were individually placed in the centre of the Open Field (OF) and allowed to move freely for 15 min. The volume of injection was set at 1 ml/kg.

2.5. Behavioral experiments

Rats were moved in their home cages to the experimental room, identified and weighed one day before the behavioral experiments to allow acclimation to the test

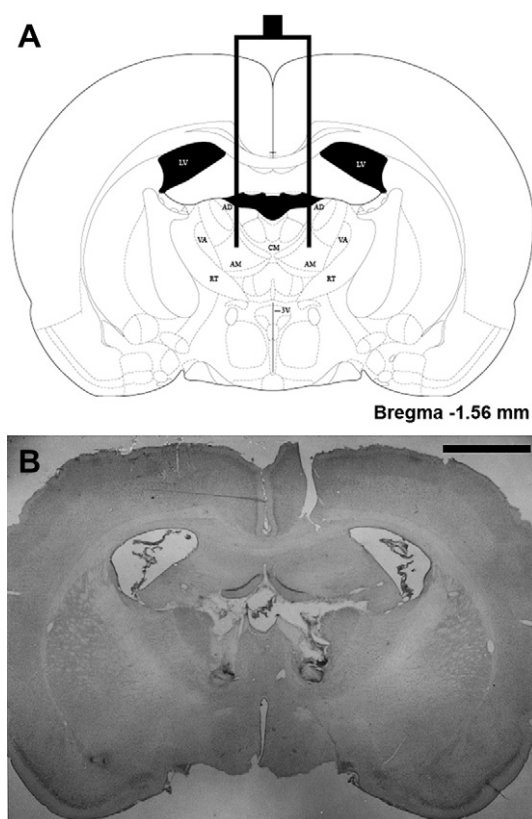


Fig. 2. Localization of the cannula in the anterior thalamic nucleus. Panel A shows a representation of the position of the bilateral cannula in the anterior thalamic nucleus (ATN). Diagram was taken from Paxinos and Watson (2005). Panel B shows a coronal section stained with hematoxylin/eosine showing the level of the bilateral cannula position in the brain. Bar scale in B: 2 mm.

Table 1

Behavioral syndrome induced by MK-801 and the effect of the microinjection of muscimol into the ATN.

Treatment	Motor pattern behaviors			Ataxia signs		Stereotypies	
	Locomotor Disorganization (0–3)	Continuous movement (0–3)	Movement speed (m/sec)	Hind-limb abduction (0–3)	No. of falls	No. Head Shakes	N° Head Weavings
Sal + Sal	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.04 ± 0.003	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.1 ± 0.8	0.0 ± 0.0
Sal + MK-801	2.5 ± 0.2***	1.3 ± 0.2***	0.16 ± 0.004***	0.0 ± 0.0	10.2 ± 2.5***	0.3 ± 0.2	2.7 ± 1.9
Musc (2.5) + Sal	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.06 ± 0.01	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5.0 ± 0.9	0.0 ± 0.0
Musc (5.0) + Sal	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.04 ± 0.008	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.8 ± 0.2	0.0 ± 0.0
Musc (2.5) + MK-801	0.3 ± 0.2***	0.2 ± 0.1***	0.04 ± 0.01***	0.0 ± 0.0	1.0 ± 0.7***	2.5 ± 0.9	0.0 ± 0.0
Musc (5.0) + MK-801	0.5 ± 0.4 ^{///}	0.0 ± 0.0 ^{///}	0.05 ± 0.01 ^{///}	0.0 ± 0.0	5.2 ± 3.4 [/]	3.8 ± 1.7	0.4 ± 0.4

Data are expressed as mean ± SEM of motor behaviors (locomotor disorganization, continuous movement and movement speed), ataxia signs (hind-limb abduction and number of falls upon movement) and stereotypies (number of head shakes and head weavings) after the administration of MK-801 (0.2 mg/kg) or saline in rats pre-microinjected into ATN with saline or muscimol (2.5 and 5.0 mM). One-way ANOVA followed by Newman–Keuls test was applied to compare effect if the treatments between the groups (*) vs. Sal + Sal; (+) Sal + MK-801 vs. Musc (2.5) + MK-801; (/) Sal + MK-801 vs. Musc (5.0) + MK-801. N = 6–8 animals per group.

environment. The experimental room was under controlled temperature ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) and the behavioral testing was conducted using OF paradigm, as previously reported (Scorza et al., 2008). An OF consisting of a square box (60 cm × 60 cm) with red 40-cm-high acrylic walls was used. Locomotor activity was recorded automatically during 15 min by a camera connected to a computer equipped with the Ethovision software 7.0 (Noldus, The Netherlands). Using this video-tracking software we specifically measured the following variables: horizontal locomotor activity defined as the total distance moved in meters (m), movement speed (m/sec) and the locomotor pattern (tracks) of the animals. Two different periods were distinguished and computed; a first 5-min period corresponding to the exploratory phase of the unfamiliar OF and a further 10-min period corresponding to the habituation phase (Fig. 1). In addition, behavioral signs such as head shakes and head weavings were measured. Head weavings were defined as lateral side-to-side movements of the head with no net locomotion (Scorza et al., 2010; Spanos and Yamamoto, 1989). We also scored the number of ataxia signs, including occasional fallings during

horizontal displacement or by loss of equilibrium while rearing. Finally, we scored the intensity of the disorganization of locomotor activity (e.g. movements not guided by normal exploratory behavior) and the non-stop or continuous movement using a 0–3 point scale (0 = absent, 1 = unclear-slight, 2 = clearly present, 3 = intense) (Scorza et al., 2008, 2010; Tricklebank et al., 1984).

After recording the activity of the animal, the box was cleaned with alcohol 30% before placing the next rat. Animals were not habituated to the OF before drug administration and were used only once. Experiments were performed between 9 A.M and 3 P.M.

2.6. Histology

The rats were deeply anaesthetized with urethane (1.2 g/kg, i.p.), and after the head implant was removed they were perfused transcardially with heparinized saline solution followed by buffered 4% PFA to verify the microinjection site.

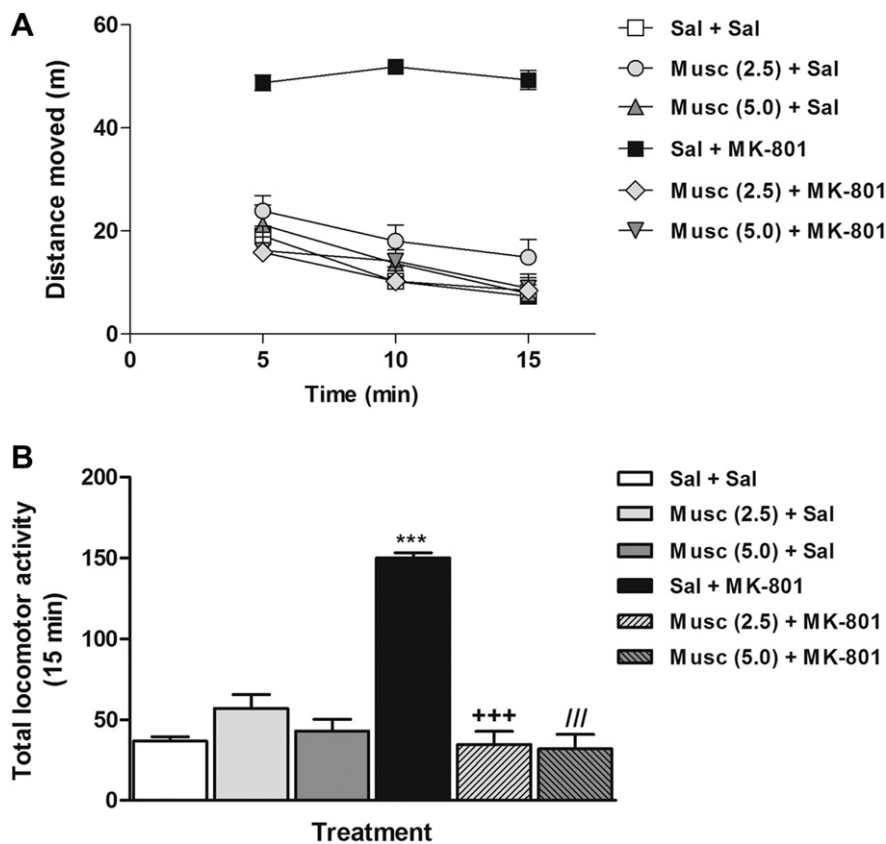


Fig. 3. Locomotor activity induced by systemic administration of MK-801 (0.2 mg/kg) or saline in animals previously microinjected with muscimol (2.5 mM and 5.0 mM) into the anterior thalamus nucleus registered during 0–15 min (A). Effect of the treatments on total distance moved (B). All data are expressed as mean ± SEM. One-way ANOVA followed by Newman Keuls test. * = denotes statistical differences vs. control group; + = denotes statistical differences between muscimol (2.5 mM) + MK-801 vs. Sal + MK-801; / = denotes statistical difference between muscimol (5 mM) + MK-801 vs. Sal + MK-801. *** $P < 0.001$. There was no difference between muscimol 2.5 mM and 5.0 mM vs. control group. N = 6–8. Sal: Saline; musc: muscimol.

The brains were dissected out and post-fixed by immersion in 4% PFA for 24 h. Thereafter, the brains were washed and cryoprotected in 15% sucrose in PBS for 48 h, followed by immersion in 30% sucrose for additional 48 h, and then frozen at -70°C . Twenty four hours later, brains were sectioned coronally at $25\ \mu\text{m}$ using a cryostat (Leica Microsystem CM 1900, USA) and sections were mounted onto gelatin-coated slides and stained using the hematoxylin/eosine method. Both cannula placement and microinjection sites were assessed following the Paxinos and Watson (2005) atlas. Images were captured using a digital camera (Nikon Coolpix E995, USA) attached to a stereoscopic microscope (Nikon Inc. SMZ800, USA) equipped with a plan $1\times$ lens. Animals with microinjections outside the ATN were not included in the calculations.

2.7. Data analysis

Data are shown as Mean $\pm$ Standard Error of the Mean (SEM) and were analyzed by One-way (treatment) or Two-way (time and treatment) analysis of variance (ANOVA) of independent or repeated measures followed by *post-hoc* Newman–Keuls multiple comparison test. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

Fig. 2A–B shows a schematic diagram of the bilateral cannula localization within the ATN (Fig. 2A) and a representative photomicrograph of a coronal brain section of animals microinjected with saline or muscimol at the level of the ATN (Fig. 2B).

3.1. Characterization of behavioral syndrome induced by MK-801

Table 1 summarizes the behavioral responses of animals injected with saline or MK-801 (0.2 mg/kg) during the 15-min recording period. As expected, animals injected with MK-801 showed a distinctive motor pattern including locomotor disorganization, continuous movements and high movement speed as well as ataxia signs. Significant differences were observed among MK-801-treated and control animals in almost all recorded variables, except in the number of head shakes and head weavings.

3.2. Intra-ATN application of muscimol blocked MK-801-induced behavioral syndrome

Fig. 3A–B shows activity changes along the 15 min observation period for all treatment groups. As expected, MK-801-induced a strong locomotor hyperactivity, as shown by an increase in the distance moved, that persisted for the 15-min observation period. This effect was prevented by the application of muscimol (0.5 and 1 nmol) into the ATN. Interestingly, hyperlocomotion decreased with time in all groups (except rats treated with MK-801 alone), likely due to the habituation process. However, MK-801-treated animals showed a similar activity during the exploratory (0–5 min) and habituation phases (5–15 min). Two-way ANOVA revealed a significant effect for time ($F_{2,105} = 12.05$; $P < 0.0001$) and treatment ($F_{5,105} = 83.92$; $P < 0.0001$) but not of the time $\times$ treatment interaction ($F_{10,105} = 0.96$; $P > 0.05$). Post-hoc analysis revealed significant differences between Sal + MK-801 vs. Sal + Sal ($P < 0.0001$) in the total period of time registered (0–15 min; Fig. 3B). The hyperactivity induced by MK-801 was significantly blocked by the microinjection of muscimol (0.5 and 1 nmol) into the ATN ($P < 0.0001$; Fig. 3B) while no differences were observed between the two concentrations of muscimol. Interestingly, neither concentration of muscimol given alone affected basal motor activity. Likewise, muscimol application into the ATN also prevented the induction of almost all other related behaviors induced by the systemic administration of MK-801. Hence, one-way ANOVA followed by post-hoc test demonstrated that muscimol 0.5 and 1 nmol significantly antagonized all the behaviors related with the motor pattern (e.g. locomotor disorganization, continuous movement and movement speed) in addition

to the number of falls observed after the systemic administration of MK-801 (Table 1).

3.3. Movement pattern

Fig. 4a–f shows representative tracks of the rats' movement patterns evoked by saline and MK-801 as well as the effect of muscimol and saline microinjection into the ATN. Tracks of control animals (saline plus saline) displayed a typical pattern of movement with high motor activity close to the OF walls and quite less activity in the central part of the OF (Fig. 4a). In contrast, animals injected with MK-801 plus saline intra-ATN showed a clearly distinctive motor pattern with very high levels of motor activity, including central areas of the OF (Fig. 4b). This behavior was markedly counteracted by the local application of muscimol 2.5 and 5 mM into the ATN (compare panels b–d and f in Fig. 4) reaching the control level (compare panels a–d and f in Fig. 4). As observed with the overall motor activity, any concentration of muscimol altered significantly the basal motor pattern (Fig. 4c and e). Results in Table 1 provide additional information about the behavioral performance of the animals under different treatments.

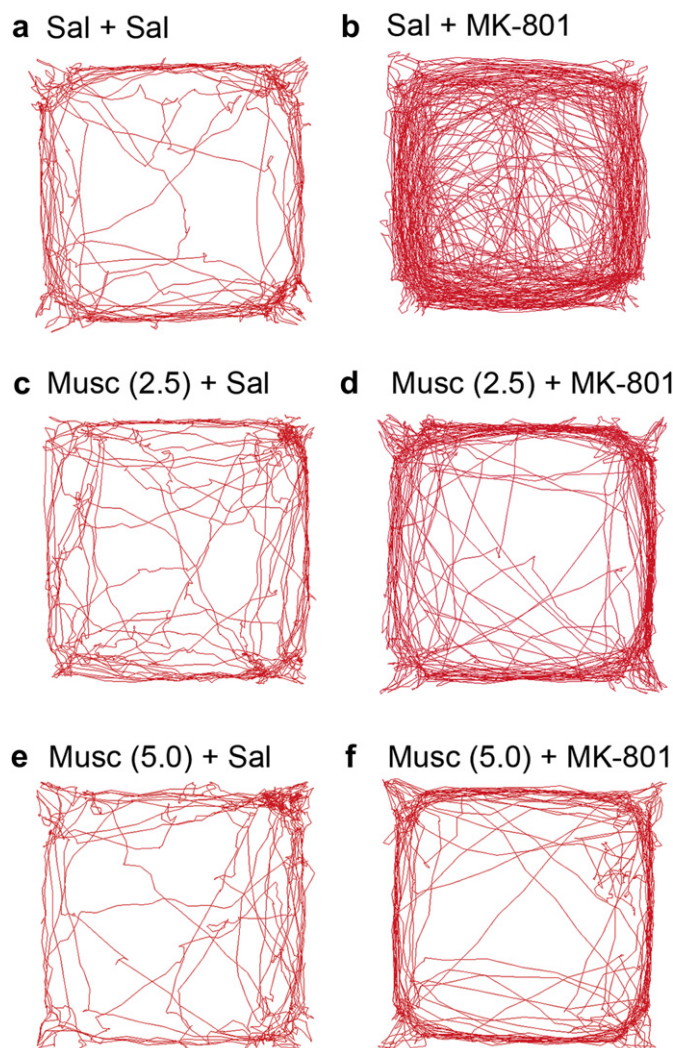


Fig. 4. Pattern of movement induced by Saline, MK-801, muscimol (2.5 mM and 5.0 mM) plus Saline and muscimol (2.5 mM and 5.0 mM) plus MK-801. Red traces represent the animal locomotion under each treatment (a–f) recorded during 15 min. Numerical data corresponding to each trace are shown in Table 1. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

4. Discussion

The present study indicated bilateral microinjection of muscimol into the ATN fully prevented the induction of the hyperactivity syndrome induced by the systemic administration of MK-801. These results enabled us to identify ATN as a substrate involved in the induction of the motor behavioral effects elicited by MK-801, showing also that these could be due to a disruption of the E/I balance in the ATN. Since muscimol prevented MK-801-induced hyperlocomotion, it is possible this effect was mediated by an increase of excitatory non-NMDA (possibly AMPA-mediated) transmission in thalamocortical motor circuits. The injected doses of muscimol were very low (0.5 and 1 nmol) and similarly abolished the MK-801 effect, suggesting a threshold effect. These observations are in accordance with previous reports which indicated that a disruption in the E/I balance of subcortical regions underlie the NMDA-hypofunction model (Farber et al., 2003; Kehrer et al., 2008; Li et al., 2002; Santana et al., 2011; Sharp et al., 1991; Sharp and Tomitaka, 2001; Tomitaka et al., 2000). Moreover, data obtained in our laboratory proved that the motor hyperactivity induced by MK-801 is not completely prevented by severe lesions of the prefrontal cortex (Scorza et al., 2008). In agreement with the present observations, two recent reports support the concept that thalamocortical projections play a key role in the actions of NMDA-R antagonists (Kiss et al., 2011; Santana et al., 2011).

The reticular thalamic nucleus (RTN) provides the majority of inhibitory GABAergic input to thalamocortical neurons, including those from ATN (Gonzalo-Ruiz et al., 1996, 1997; Pinault, 2004; Wang et al., 1999). Our results indicated muscimol restored loss of GABA_A

input onto ATN produced by MK-801, possibly due to a NMDA-R blockade in RTN or basal ganglia GABAergic neurons projecting to principal thalamic neurons. Thus, MK-801 would actually disinhibit ATN neurons, evoking hyperlocomotion whereas muscimol would normalize GABAergic function in the ATN avoiding the disinhibitory action of MK-801. Indeed, muscimol microinjected into ATN likely activated GABA_A receptors highly expressed by projection ATN neurons (Bentivoglio et al., 1993; Huntsman et al., 1996; Palacios et al., 1981), resulting in a restoration of the increased E/I ratio evoked by systemic MK-801 (see diagram in Fig. 5). A preferential action of NMDA-R antagonists on RTN neurons is supported by the differential expression of the immediate early gene *c-fos* in the RTN compared with the rest of the thalamic nuclei after systemic MK-801 and phencyclidine administration (Santana et al., 2011; Väisänen et al., 2004). Moreover, a differential response of the RTN GABAergic neurons to NMDA-R antagonists should be taken into account. Although it has been demonstrated only in the case of a competitive NMDA-R antagonist (APV), Zhang et al. (2009) demonstrated that RTN GABAergic neurons showed unusual basal electrophysiological properties that made them more sensitive than others (e.g. cortex and hippocampus) to NMDA-R antagonists. This characteristic was attributed to the expression of a form of NMDA-R, NR2C, which may contribute to the electrophysiological behavior of the RTN GABAergic neurons (Zhang et al., 2009). However, the effect of non-competitive NMDA-R antagonists has not been assessed yet.

Although our results suggest that the RTN GABAergic neurons have a major role in the induction of the motor behavioral effects elicited by MK-801, the presence of ATN intrinsic GABAergic interneurons or other GABAergic inputs that reach the ATN from the

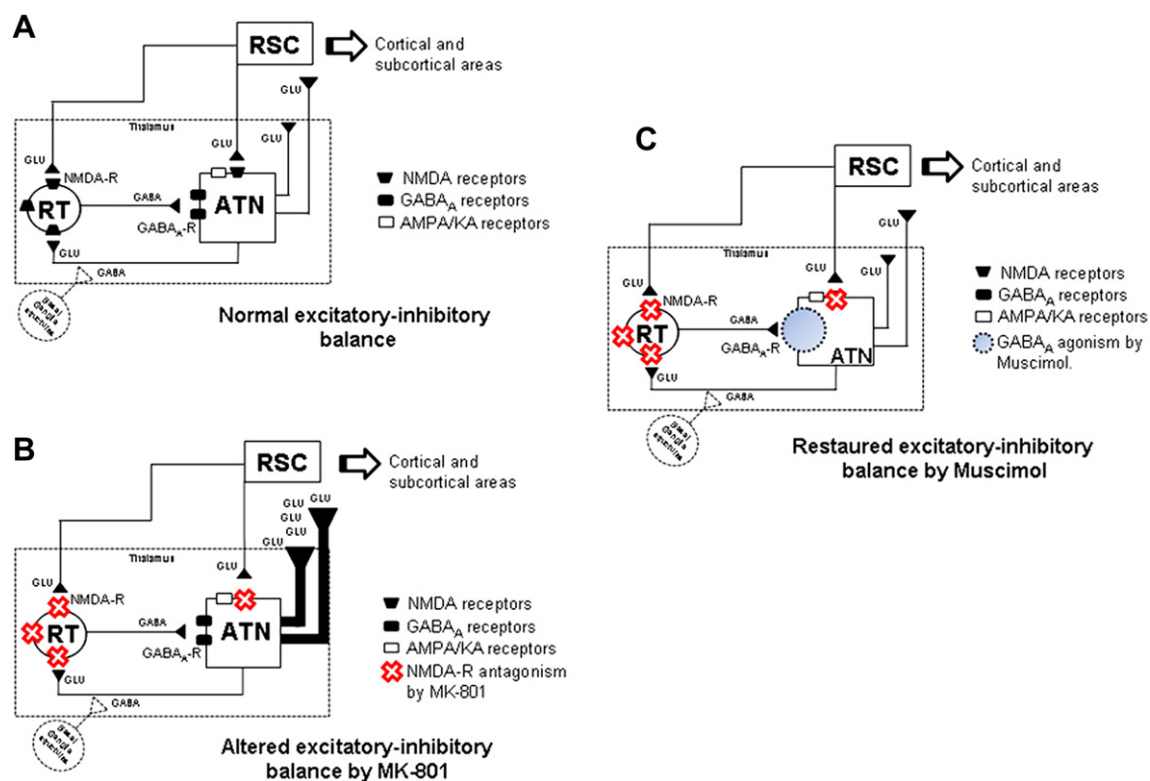


Fig. 5. Diagrams proposing three steps involved in the mechanism of action of the MK-801 to induce the motor behavioral syndrome and the involvement of the ATN in it. Panel A shows the thalamic circuit functioning under normal excitatory-inhibitory balance. Panel B shows how excitatory-inhibitory balance could be altered after the systemic administration of MK-801, e.g. following blockade of all NMDA receptors by systemic MK-801. GABAergic neurons of the reticular thalamic (RT) nucleus are also blockade and consequently the anterior thalamic projection neurons are releasing from a GABA inhibition (disinhibition) intensifying the thalamic output to terminal areas (prefrontal cortex; retrosplenial cortex RSC; motor areas). Panel C shows how bilateral microinjection of muscimol into ATN could restore the excitatory-inhibitory balance to a normal situation. GABAergic projections from Basal Ganglia nuclei (globus pallidus, ventral pallidum and pars reticulata of the substantia nigra) are shown to project to thalamocortical neurons. Diagram based on Gonzalo-Ruiz et al., 1996 and Tomitaka et al., 2000.

basal forebrain and/or the brain stem areas cannot be completely discarded. However, it is usually assumed that thalamic GABAergic interneurons in rats are relatively sparse (Paxinos, 2004; Price, 1995). Moreover, although the ATN in rats appears to have few, if any, intrinsic interneurons, their status as interneurons or projection neurons is not well established (Gonzalo-Ruiz et al., 1996; Wang et al., 1999). Serotonergic and cholinergic fibers are also projecting to the ATN (Price, 1995), although these afferents do not support the presence of GABAergic projections arising to the ATN different from those provided by RTN. In spite of the previous considerations, participation of a subpopulation of GABAergic thalamocortical projections provided by basal ganglia structures (via internal segment of globus pallidus, ventral pallidum and pars reticulata of the substantia nigra) should not be underestimated (Price, 1995). So, future studies should be performed to clarify the patterns of axonal branching and termination and transmitter phenotypes on ATN projection neurons.

Non specific effects induced by cannula implantation and muscimol perfusion into ATN should be considered. However, the present data support the view that the functional integrity of motor pathways responsible for MK-801 action was not affected by the cannula implantation since all rats treated with MK-801 only displayed a behavioral syndrome qualitatively and quantitatively similar to that previously observed using the present experimental conditions in non-operated rats after MK-801 administration (Scorza et al., 2008, 2010). On the other hand, a potential diffusion of muscimol to neighboring thalamic nuclei, such as the ventrolateral/ventromedial (VL/VM) and medio-dorsal (MD) nuclei does not seem to explain the observed behavioral response. The volume of the muscimol solution was very low (0.2 μ l), suggesting a restricted tissue distribution. Moreover, the local injection of muscimol into VL/VM evokes catalepsy (Klockgether et al., 1986), which has not been observed in the rats used in the present study. In addition, MD thalamic nucleus does not appear to play a significant role in the hyperactivity induced by MK-801 (De Leonibus et al., 2001). MD nucleus has dense and reciprocal projections that reach the prefrontal cortex but not the motor cortex (Fuster, 1997; Uylings et al., 2003) making it unlikely to mediate MK-801-induced hyperlocomotion. In support of this view, selective lesions of the prefrontal cortex did not abolish the hyperlocomotion induced by MK-801 (Scorza et al., 2008).

The ATN projects densely to the medial prefrontal cortex and anterior and posterior cingulate cortices. In turn, the RSC (defined in rats as posterior cingulate cortex), has reciprocal connections with the ATN (Gonzalo-Ruiz et al., 1997). The RSC also projects to different parts of the anterior cingulate, motor and prefrontal cortices contributing to several motor functions via numerous projections to subcortical motor systems (Gabriel et al., 1989; Shibata et al., 2004; Tomitaka et al., 2000). Hence, the connectivity between the ATN and other cortical areas, as well as with the hippocampus, could explain – at least in part – the behavioral signs evoked by MK-801.

The present data could also provide significant insights about the neural basis involved in epilepsy, because many disturbances that characterize this pathology, specially those related with thalamocortical circuits, are shared with the neural basis underlying positive symptoms (psychosis) of schizophrenia (Cascella et al., 2009; Koerner et al., 1996; Sharp and Hendren, 2007).

In summary, the present results show that MK-801-induced hyperlocomotion is blocked by an increased GABA_A-mediated inhibition in the ATN, indicating a crucial role of this nucleus in the actions of NMDA-R antagonists. Our results support to recent observations of a role for thalamic projections to the prefrontal cortex in the actions of MK-801 (Kiss et al., 2011) and phencyclidine (Santana

et al., 2011) and underline the involvement of the thalamus in schizophrenia.

Conflict of interest

None.

Acknowledgments

This study was fully supported by *Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas* (PEDECIBA-Uruguay). Ximena López Hill is post-graduate student from PEDECIBA. We are grateful to Analía Richeri, Jessica Urbanavicius and José Pedro Prieto for technical support. We are also grateful to Dr. Ron Benner for his help in language revision.

References

- Andiné, P., Widermark, N., Axelsson, R., Nyberg, G., Ofsson, U., Martensson, 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., 1997. The role of the thalamus in schizophrenia. *Can. J. Psychiatry* 42, 27–33.
- Bentivoglio, M., Kultas-Ilinsky, K., Ilinsky, I., 1993. Limbic thalamus: structure, intrinsic organization, and connections. In: Vogt, B.A., Gabriel, M. (Eds.), *Neurobiology of Cingulate Cortex and Limbic Thalamus*. Birkhäuser, Boston, pp. 71–123.
- Bradford, A.M., Savage, K.M., Jones, D.N., Kalinichev, M., 2010. Validation and pharmacological characterization of MK-801-induced locomotor hyperactivity in BALB/c mice as an assay for detection of novel antipsychotics. *Psychopharmacology (Berl.)* 212, 155–170.
- Buchsbaum, M.S., Someya, T., Teng, C.Y., Abel, L., Chin, S., Najafi, A., Haier, R.J., Wu, J., Bunney Jr., W.E., 1996. PET and MRI of the thalamus in never medicated patients with schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 153, 191–199.
- Cascella, N.G., Schretlen, D.J., Sawa, A., 2009. Schizophrenia and Epilepsy: is there a shared susceptibility? *Neurosci. Res.* 63 (4), 227–235.
- Coyle, J.T., 1996. The glutamatergic dysfunction hypothesis for schizophrenia. *Harv. Rev. Psychiatry* 3 (5), 241–253.
- De Leonibus, E., Mele, A., Oliverio, A., Pert, A., 2001. Locomotor activity induced by the non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801: role of nucleus accumbens efferent pathways. *Neuroscience* 104 (1), 105–116.
- DeGiorgio, L.A., DeGiorgio, N., Volpe, V.T., 1999. Dizocilpine maleate, MK-801, but not 2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo (F) quinoxaline, NBQX, prevents transneuronal degeneration of nigral neurons after neurotoxic striatal-pallidal lesion. *Neuroscience* 90 (1), 79–85.
- Farber, N.B., Jiang, X., Dikranian, K., Nemmers, B., 2003. Muscimol prevents NMDA antagonist neurotoxicity by activating GABA_A receptors in several brain regions. *Brain Res.* 993, 90–100.
- Fuster, J.M., 1997. *The Prefrontal Cortex. Anatomy, Physiology and Neuropsychology of the Frontal Lobe*, third ed. Lipincott-Raven, Philadelphia–New York.
- Gabriel, M., Sparenborg, S., Kubota, Y., 1989. Anterior and medial thalamic lesions, discriminative avoidance learning, and cingulate cortical neuronal activity in rabbits. *Exp. Brain Res.* 76 (2), 441–457.
- Geyer, M.A., Ellenbroek, B., 2003. Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality. *Prog. NeuroPsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 27, 1071–1079.
- 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, G., 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.
- Huntsman, M.M., Leggio, M.G., Jones, E.G., 1996. Nucleus-specific expression of GABA_A receptor subunit mRNAs in monkey thalamus. *J. Neurosci.* 16 (1), 3571–3589.
- Javitt, D.C., Zukin, S.R., 1991. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 148, 1301–1308.
- Javitt, D.C., 2004. Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* 9, 984–997.
- 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.* 1, 1–7.
- Kim, J.S., Kornhuber, H.H., Schmid-Burgk, W., Holzmüller, B., 1980. Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis of schizophrenia. *Neurosci. Lett.* 20, 379–382.

- 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* 2, 1–14.
- Klockgether, T., Schwarz, M., Turski, L., Sontag, K.H., 1986. The rat ventromedial thalamic nucleus and motor control: role of N-methyl-D-aspartate-mediated excitation, GABAergic inhibition, and muscarinic transmission. *J. Neurosci.* 6 (6), 1702–1711.
- Koerner, C., Danover, L., Boehler, A., Marescaux, C., Vergnes, M., 1996. Thalamic NMDA transmission in a genetic model of absence epilepsy in rats. *Epilepsy Res.* 25 (1), 11–19.
- Krystal, J.H., D'Souza, D.C., Mathalon, D., Perry, E., Beleger, A., Hoffman, R., 2003. NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development. *Psychopharmacology (Berl.)* 169, 215–233.
- Lahti, A.C., Koffel, B., LaPorte, D., Tamminga, C.A., 1995. Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13, 9–19.
- Lahti, A.C., Weiler, M.A., Tamara Michaelidis, B.A., Parwani, A., Tamminga, C.A., 2001. Effects of ketamine in normal and schizophrenic volunteers. *Neuropsychopharmacology* 25, 455–467.
- Li, Q., Clark, S., Lewis, D.V., Wilson, W.A., 2002. NMDA receptor antagonists disinhibit rat posterior cingulate and retrosplenial cortices: a potential mechanism of neurotoxicity. *J. Neurosci.* 22 (8), 3070–3080.
- Malhotra, A.K., Pinals, D.A., Adler, C.M., Elman, I., Clifton, A., Pickar, D., Breier, A., 1997. Ketamine-induced exacerbation of psychotic symptoms and cognitive impairment in neuroleptic-free schizophrenics. *Neuropsychopharmacology* 17, 141–150.
- Marek, G.J., Behl, B., Bespalov, A.Y., Gross, G., Lee, Y., Schoemaker, H., 2010. Glutamatergic (N-methyl-D-aspartate receptor) hypofrontality in schizophrenia: too little juice or a miswired brain? *Mol. Pharmacol.* 77 (3), 317–326.
- Moghaddam, B., Jackson, M.E., 2003. Glutamatergic animal models of schizophrenia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1003, 131–137.
- Moghaddam, B., Adams, B., Verma, A., Daly, D., 1997. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J. Neurosci.* 17, 2921–2927.
- Olney, J.W., Farber, N.B., 1995. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch. Gen. Psychiatry* 52, 998–1007.
- Palacios, J.M., Wamsley, J.K., Kuhar, M.J., 1981. High affinity GABA receptors – autoradiographic localization. *Brain Res.* 222, 285–307.
- Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, fifth ed. Academic Press, Sydney.
- Paxinos, G., 2004. *The Rat Nervous System*, third ed. Elsevier, Academic Press, San Diego.
- Pinault, D., 2004. The thalamic reticular nucleus: structure, function and concept. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 46 (1), 1–31.
- Price, J.L., 1995. Thalamus. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*. Academic Press, San Diego, pp. 629–648.
- 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 (10), 918–927.
- Scorza, M.C., Meikle, M.N., López Hill, X., 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. *Neuropharmacology* 59, 112–120.
- Sharp, F.R., Hendren, R.L., 2007. Psychosis: atypical limbic epilepsy versus limbic hyperexcitability with onset at puberty? *Epilepsy Behav.* 10 (4), 515–520.
- Sharp, F.R., Tomitaka, M., 2001. Psychosis: pathological activation of limbic thalamocortical circuits by psychomimetics and schizophrenia? *Trends Neurosci.* 24 (6), 330–334.
- 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.
- Shibata, H., Kondo, S., Naito, J., 2004. Organization of retrosplenial cortical projections to the anterior cingulate, motor, and prefrontal cortices in the rat. *Neurosci. Res.* 49, 1–11.
- Spanos, L.J., Yamamoto, B.K., 1989. Acute and subchronic effects of methylenedioxymethamphetamine [(+/-) MDMA] on locomotion and serotonin syndrome behaviour in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32, 835–840.
- 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.
- Tricklebank, M.D., Forler, C., Fozard, J.R., 1984. The involvement of subtypes of the 5-HT1 receptor and of catecholaminergic systems in the behavioural response MK-801 and PFC 13 to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetrinal in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 106, 271–282.
- Uylings, H.B., Groenewegen, H.J., Kolb, B., 2003. Do rats have a prefrontal cortex? *Behav. Brain Res.* 146 (1–2), 3–17.
- Väisänen, J., Ihalaenen, 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.
- Wang, B., Gonzalo-Ruiz, A., Sanz, J.M., Campbell, G., Lieberman, A.R., 1999. Immunoelectron microscopic study of gamma-aminobutyric acid inputs to identified thalamocortical projection neurons in the anterior thalamus of the rat. *Exp. Brain Res.* 126, 369–382.
- Young, K.A., Manaye, K.F., Liang, C., Hicks, P.B., German, D.C., 2000. Reduced number of mediodorsal and anterior thalamic neurons in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 47 (11), 944–953.
- 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.

VII. RESULTADOS II

2. Estudio del efecto de Clozapina sobre las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801 en el modelo da memoria Latencia de Transferencia.

2.1 Caracterización de las alteraciones conductuales inducidas por la administración sistémica de MK-801 en el modelo Latencia de transferencia.

En primer lugar, se evaluó el efecto de MK-801 sobre la función cognitiva utilizando el modelo de Latencia de Transferencia o LT (ver Esquema 5 en Materiales y Métodos). Teniendo en cuenta que la administración sistémica i.p. del antagonista NMDA puede inducir en los animales un aumento en la actividad motora y comprometer su correcta *performance* en la tarea cognitiva, se seleccionó una dosis menor del antagonista NMDA a la utilizada en el primer objetivo del trabajo. En base a la literatura y antecedentes de nuestro laboratorio [Scorza MC 2008; Meikle MN, trabajo de tesina de grado, 2008) fue elegida la dosis de 0.1 mg/kg de MK-801. En la Figura 16 A se muestra el efecto de la administración sistémica de MK-801 0.1 mg/kg evaluado en el modelo de LT. En primer lugar se observó que no hubo diferencia significativa en la LT1 entre los animales control y tratados. En el segundo y tercer día, los animales del grupo control disminuyeron significativamente los valores de LT2 y 3 respecto al primer día ($p < 0.01$ y $p < 0.001$ respectivamente), efecto indicativo de un aprendizaje exitoso de la tarea. Los animales tratados con MK-801 disminuyeron su valor de LT2 con respecto a la LT1 ($p < 0.05$) sin mostrar diferencia significativa comparada con el grupo control en su valor de LT2 (indicativo de que no hubo un efecto amnésico). En el día 3 si bien se mantiene una tendencia a una LT3 superior que el valor control, no alcanza significancia estadística.

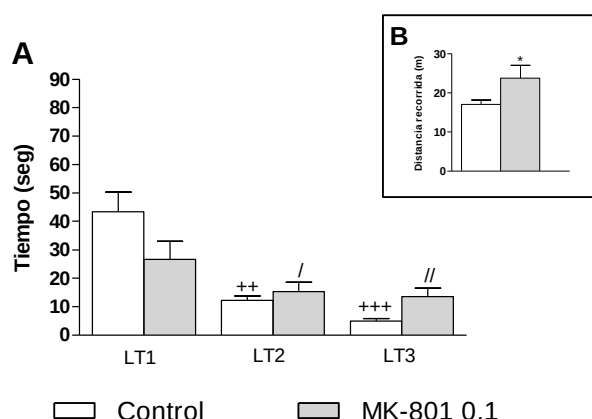


Figura 16 A-B. Efecto de MK-801 0.1 mg/kg sobre la Latencia de Transferencia (A) y la actividad locomotora (mts, Ethovision) en 5 minutos (B). Los datos se expresan como la media $\pm$ EEM de animales inyectados con MK-801 o salino (control). ANOVA de dos vías seguido del *Test* de Newman-Keuls entre los tres días consecutivos para ambos tratamientos. No hubo diferencias significativas entre el grupo control y el tratado para cada día de LT. * = vs control; += vs LT 1 control; /= vs LT 1 MK-801; *, /= $p < 0.05$. ++, // = $p < 0.01$. +++ = $p < 0.001$. N= 7-9.

A su vez, se observó que MK-801 a la dosis ensayada e inmediatamente después de ser inyectado indujo un aumento significativo en la actividad locomotora (evaluada como distancia recorrida en el CA) de los animales ($p < 0.05$; Fig. 16 ver recuadro). Si bien en este estudio, persistió la hiperactividad como efecto principal del fármaco, no se observaron conductas de ataxia y estereotipias, las cuales fueron observadas luego de la inyección de una dosis mayor del antagonista NMDA (datos no mostrados). La hiperactividad inducida por MK-801 0.1 mg/kg provocó un 40 % de caídas en los animales desde el brazo abierto del modelo laberinto en cruz elevado con respecto a los controles. Es posible que la falta de efecto amnésico de la droga en la LT2 con respecto al control se deba a una interferencia de la alteración motora sobre el aprendizaje de la tarea. Fue por esta razón que se seleccionó una dosis menor de MK-801 para estudiar su efecto sobre la función cognitiva.

En la Figura 17A se observa el efecto de MK-801 0.05 mg/kg evaluado en el modelo de LT. El primer día de evaluación no se observó una diferencia significativa en la LT1 entre los animales control y tratados. Los animales controles nuevamente presentan una disminución significativa del parámetro de LT en función del tiempo, indicativo de una función cognitiva normal en los animales.

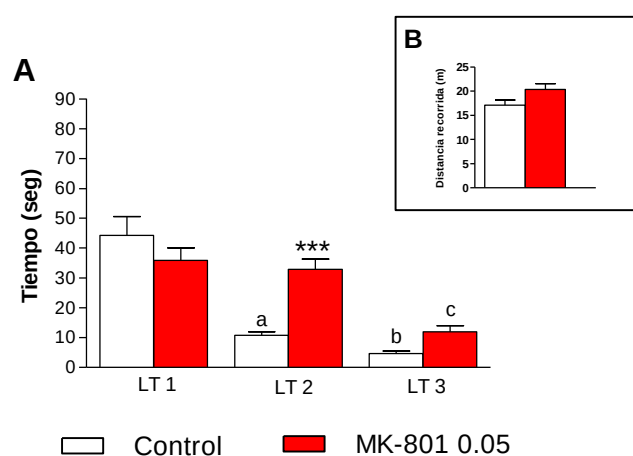


Figura 17 A-B. Efecto de MK-801 (0.05 mg/kg) sobre la función cognitiva a través de la evaluación de LT registrada a las 0 (LT 1), 24 (LT 2) y 48 hs (LT 3) (A) y sobre la actividad locomotora durante 5 min (B) luego de 30 min de la administración de MK-801. Los datos se expresan como la media $\pm$ EEM de animales inyectados con MK-801 o salino (control). ANOVA de dos vías seguido del *Test* de Newman-Keuls entre los tres días consecutivos para ambos tratamientos. * = vs control; a, b = vs LT1 control; c = vs LT2 MK-801. *** = $p < 0.001$. a, b = $p < 0.001$. c = $p < 0.01$. N= 6-12.

Por el contrario, la administración de MK-801 a esta dosis indujo un aumento significativo ($p < 0.001$) de LT2 respecto a la alcanzada por el grupo control, dejando en evidencia un efecto amnésico de la droga. Dicho efecto desapareció en el día 3 del ensayo en el cual se recuperaron los valores de latencia basal. A su vez, la dosis seleccionada no alteró significativamente la actividad locomotora de los animales (Fig.

17 B) y disminuyó a un 20 % el porcentaje de caídas de los animales. El patrón motor fue cualitativamente similar al de los animales controles. A partir de éstos resultados obtenidos, la dosis de 0.05 mg/kg de MK-801 fue seleccionada para realizar los experimentos de los objetivos específicos 2 y 3.

Con el fin de confirmar que el valor aumentado de LT2 reflejara específicamente una alteración en la función cognitiva de los animales y no una disminución en la ansiedad (efecto que se vería reflejado también en un aumento de la LT2), se evaluó el efecto de MK-801 (0.05 mg/kg) sobre la ansiedad de los animales a las 24 hrs (tiempo de LT2) después de la administración de la droga. La Figura 18 A-C muestra el efecto de MK-801 (0.05 mg/kg) sobre la ansiedad experimental 24 horas después de su administración evaluada en el Laberinto en cruz elevado.

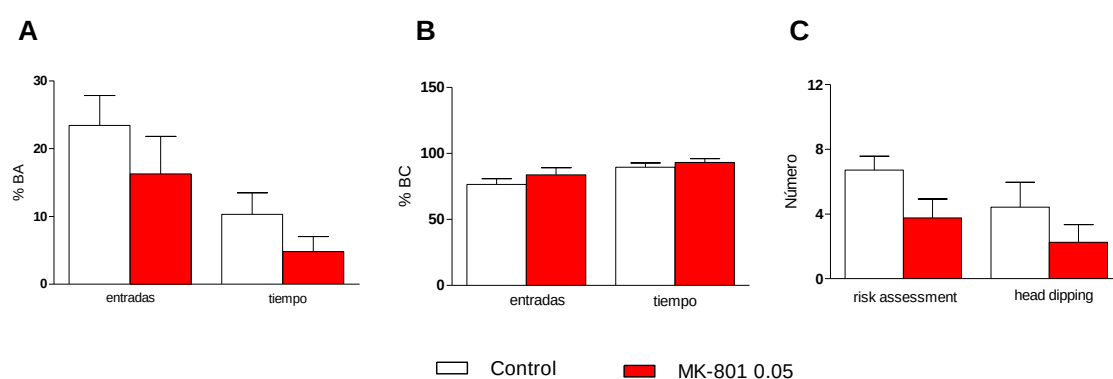


Figura 18 A-C. Evaluación de la administración sistémica de MK-801 (0.05 mg/kg) sobre diferentes parámetros que reflejan la ansiedad de los animales durante 5 min 24 horas después de la administración de la droga. A: porcentaje de entradas y tiempo en los brazos abiertos (BA); B: porcentaje de entradas y tiempo en los brazos cerrados (BC); C: número de *risk assessments* y *head dippings*. Los datos se expresan como la media $\pm$ EEM de animales inyectados con MK-801 (0.05 mg/kg) o salino (control). *Test t-Student*. N= 4-7.

No se observan diferencias significativas en el porcentaje de entradas y tiempo de permanencia sobre los brazos abiertos (% BA) o los brazos cerrados (% BC) ni en el número de *risk assessment* y *head dippings* entre el grupo control y el tratado con MK-801. Cabe mencionar que la actividad motora evaluada a las 24 hs. luego de la inyección no fue modificada (17.9 ± 2.7 control vs 17.2 ± 3.4 MK-801). En su conjunto, estos resultados demostraron que luego de 24 horas de la administración de MK-801 (0.05 mg/kg) no fue identificado un efecto en la ansiedad de los animales tratados, confirmando que el aumento en la LT2 se debe a un efecto amnésico inducido por la droga.

2.2. Determinación del bloqueo por Clozapina de las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801 en el modelo Latencia de Transferencia.

En esta serie de experimentos se evaluó el efecto de Clz sobre el efecto amnésico inducido por MK-801. Para llevar a cabo dicho objetivo se realizó una nueva serie de experimentos en los que se co-administraron Clz (1 mg/kg) y MK-801 (0.05 mg/kg) (ver Esquema 6 en Materiales y Métodos) y posteriormente se evaluó la Latencia de Transferencia durante tres días consecutivos. En primer lugar, se observó que no hubo diferencias significativas en la LT1 entre los animales control y tratados con las diferentes drogas. En segundo lugar, nuevamente los animales controles presentaron una disminución significativa del parámetro de LT en función del tiempo ($p < 0.001$), indicativo de una función cognitiva normal en este grupo. En tercer lugar, la administración de MK-801 nuevamente mostró un aumento significativo de LT2 respecto al grupo control ($p < 0.05$), resultado indicativo del efecto amnésico inducido por el bloqueo NMDA.

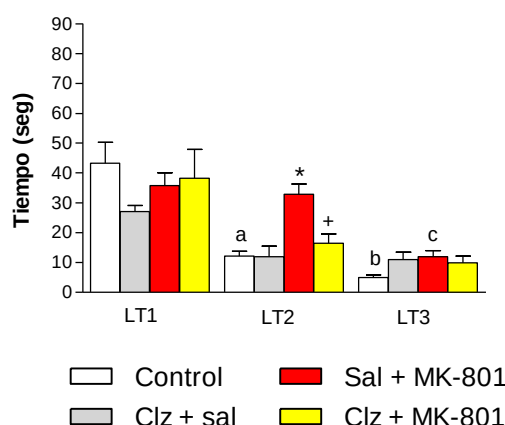


Figura 19. Efecto de Clz (1.0 mg/kg) sobre la alteración cognitiva inducida por MK-801 (0.05 mg/kg). Los datos se expresan como la media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías seguido del *Test* de Newman-Keuls entre los tres días consecutivos para todos los tratamientos. * = vs LT2 control; + = vs LT2 MK-801; a, b = vs LT1 control; c = vs LT2 MK-801. *, + = $p < 0.05$. a, b = $p < 0.001$. c = $p < 0.01$. N= 6-12.

En cuarto lugar, se pudo observar que el tratamiento con Clz previno el aumento en la LT2 en los animales inyectados con MK-801 ($p < 0.05$), sin modificar la actividad basal de los animales (Fig. 19). Al tercer día todos los grupos experimentales mostraron LT3 similares, alcanzando el valor del grupo control. Estos resultados demuestran que Clz fue capaz de bloquear el efecto amnésico inducido por MK-801.

Paralelamente, la dosis de Clz utilizada no alteró la actividad motora basal de los animales, mientras que tampoco la afectó cuando fue co-administrada con MK-801 alcanzando en ambos casos valores medios similares al grupo control (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de Clz sobre la actividad motora total inducida por MK-801

Variable	Tratamiento			
Actividad Motora (m)	control	MK-801	Clz + salino	Clz + MK-801
	18.28 ± 1.6	20.3 ± 3.9	14.8 ± 1.3	16.2 ± 1.6

Tabla 6. Actividad motora durante 5 minutos de los distintos grupos experimentales. Los datos se expresan como la media ± EEM. ANOVA de una vía seguido del *Test* de Newman-Keuls. N= 6-12.

2.3 Estudio del papel del subtipo de receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} en la acción de Clozapina sobre las alteraciones cognitivas inducidas por MK-801.

Enfocados en el estudio de la participación de los receptores serotoninérgico del tipo 1A en el mecanismo de acción de Clz, se evaluó el efecto de la co-administración de Clz (1 mg/kg) y MK-801 (0.05 mg/kg) sobre la función cognitiva evaluada en el modelo de LT luego del bloqueo del receptor 5-HT_{1A} a través del uso de un antagonista selectivo (WAY-100635; ver Esquema 7 en Materiales y Métodos).

En primer lugar se evaluó el efecto de la administración sistémica de WAY-100635 sobre la función cognitiva evaluada en el modelo de LT, a una dosis seleccionada según la literatura (1 mg/kg; Fig. 20 A). Se observó que el grupo control y tratado con WAY no presentaron diferencias significativas en el parámetro LT1. Nuevamente el grupo control disminuyó significativamente LT2 y LT3 ($p < 0.001$) reflejando una función cognitiva normal.

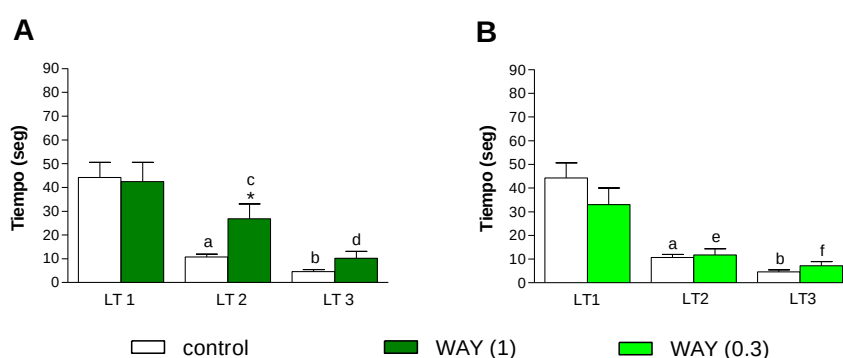


Figura 20 A-B. Efecto de WAY-100635 (1.0 y 0.3 mg/kg) sobre la función cognitiva evaluada en el modelo LT respecto al control (vehículo). Los datos se expresan como la media ± EEM. ANOVA de dos vías seguido del *Test* de Newman-Keuls entre los tres días consecutivos para todos los tratamientos. *= vs LT2 control; a, b = vs LT1 control; c, d = vs LT1 WAY (1); e, f = vs LT1 WAY (0.3). * = $p < 0.05$. a, b = $p < 0.001$. c = $p < 0.05$. d = $p < 0.001$. e, f = $p < 0.05$. N= 5-8.

De manera contraria, los animales tratados con WAY-100635 (1 mg/kg) si bien mostraron una LT2 significativamente menor respecto a su LT1 ($p < 0.05$), la misma fue estadísticamente diferente a la LT2 del grupo control ($p < 0.05$) dejando en evidencia

que generó un efecto amnésico *per se* (Fig. 20 A). Al tercer día la LT3 fue similar al control. Estos resultados llevaron a ensayar una menor dosis de WAY-100635; se seleccionó una dosis de 0.3 mg/kg y se registraron las latencias por 3 días seguidos. No se observaron diferencias significativas respecto al grupo control (Fig. 20 B) desapareciendo el efecto amnésico observado anteriormente. Ninguna dosis de WAY-100635 alteró la actividad motora de los animales al día de su administración (18.28 ± 1.6 control, 15.0 ± 0.8 WAY 1.0 y 22.0 ± 1.4 WAY 0.3). Basados en los resultados se seleccionó la dosis 0.3 mg/kg para utilizarse en el siguiente experimento.

A continuación se procedió a evaluar el rol de los receptores 5-HT_{1A} en el bloqueo ejercido por Clz sobre el efecto amnésico inducido por MK-801. Para ello se evaluó la latencia de transferencia utilizando animales tratados con WAY-100635 (0.3 mg/kg), Clz (1 mg/kg) y MK-801 (0.05 mg/kg). Los resultados se presentan en la Figura 21. Nuevamente, los distintos grupos experimentales no presentaron diferencias significativas en LT1. A su vez, los animales controles disminuyeron significativamente LT2 y LT3 respecto al primer día de ensayo indicando que la función cognitiva no fue alterada ($p < 0.001$). El grupo experimental tratado con MK-801 demostró una vez más un efecto amnésico reflejado en el valor de LT2 significativamente mayor a la LT2 del grupo control ($p < 0.001$) a su vez que fue similar a su propia LT1. Finalmente, se observó que el tratamiento con WAY-100635, Clz y MK-801 (WAY + Clz + MK-801) induce un valor de LT2 significativamente mayor al valor de LT2 del grupo control ($p < 0.01$) siendo similar a la de los animales con MK-801.

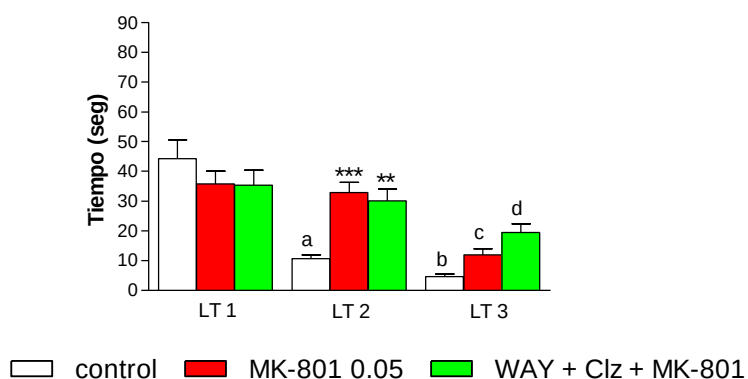


Figura 21. Efecto de WAY-100635 (0.3 mg/kg) sobre el bloqueo de Clz (1.0 mg/kg) de la alteración cognitiva inducida por MK-801 (0.05 mg/kg). Los datos se expresan como la media $\pm$ EEM. ANOVA de dos vías seguido del *Test* de Newman-Keuls entre los tres días consecutivos para todos los tratamientos. * = vs control LT2, ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$; + = vs MK-801 LT2, $p < 0.05$; a, b = vs control LT1, $p < 0.001$; c = vs MK-801 LT2, $p < 0.01$; d = vs WAY+Clz+MK-801 LT2; $p < 0.05$. N= 5-10.

En la Tabla 7 se muestra que el grupo experimental WAY + Clz + MK-801 posee un valor de LT2 significativamente mayor ($p < 0.05$) comparada con la del grupo experimental Clz + MK-801 y similar al tratado únicamente con MK-801.

Tabla 7. Efecto de WAY y Clz sobre el efecto amnésico inducido por MK-801

Variable	Tratamiento			
	control	MK-801	Clz + MK-801	WAY + Clz + MK-801
LT 2	9.8 ± 1.3	$29.3 \pm 3.5^{***}$	$16.4 \pm 3.1^{++}$	$30.1 \pm 3.9^{***\#}$

Tabla 7. Efecto de WAY-100635 (0.3 mg/kg) sobre el bloqueo de Clz (1.0 mg/kg) del aumento de la latencia de transferencia 24 hrs después del tratamiento (LT2) inducida por MK-801 (0.05 mg/kg). Los datos se expresan como la media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía seguido del *Test* de Newman-Keuls. *** = vs control, $p < 0.001$; ++ = vs MK-801, $p < 0.01$; # = vs Clz + MK-801, $p < 0.05$. N= 5-10.

Estos resultados indican que en presencia de WAY-100635 Clz no fue capaz de prevenir el efecto amnésico inducido por MK-801. La co-administración de WAY, Clz y MK-801 no alteró la actividad motora comparada con el grupo control (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto sobre la actividad motora de los distintos tratamientos

Variable	Tratamiento			
	control	MK-801	Clz + MK-801	WAY + Clz + MK-801
Actividad Motora (m)	18.28 ± 1.6	20.3 ± 3.9	16.2 ± 1.6	17.9 ± 4.6

Tabla 8. Actividad locomotora durante 5 minutos de los distintos grupos experimentales a los 30 min del tratamiento. Los datos se expresan como la media $\pm$ EEM. ANOVA de una vía seguido del *Test* de Newman-Keuls. No se encontraron diferencias significativas. N= 5-10.

2.4. Discusión de resultados II

La segunda parte del presente trabajo de Tesis se centró en estudiar el mecanismo de acción del antipsicótico atípico Clozapina sobre una alteración conductual evaluada en el modelo Latencia de Transferencia, inducida por el antagonismo NMDA, asociada a algunos aspectos de los trastornos cognitivos que se observan en la esquizofrenia. En particular se evaluó el papel de los receptores 5-HT_{1A} en los efectos del antipsicótico.

En esta serie de experimentos se evaluó en primer lugar la dosis de 0.1 mg/kg de MK-801, la cual no demostró el efecto amnésico esperado. Este resultado contrastó con datos previos del laboratorio demostrando un efecto amnésico inducido por MK-801 a esta dosis [Meikle MN 2008]. Como hemos mencionado anteriormente, es posible que el aumento en la actividad locomotora haya interferido con la *performance* de los animales, poniendo en duda el resultado comportamental obtenido. Considerando la necesidad de encontrar un claro efecto amnésico para proceder con los experimentos subsecuentes, se procedió a evaluar una dosis menor de MK-801.

La observación de un aumento en LT2 inducido por la administración sistémica de MK-801 (0.05 mg/kg) en comparación con el control, demostró que el antagonismo NMDA provocó una alteración en la capacidad de los animales para realizar la tarea sugiriendo la presencia de un déficit en las habilidades de aprendizaje y un deterioro en la función cognitiva de los animales. Estos resultados coinciden con otros reportes en los que se describió una alteración en distintos dominios cognitivos inducidos por MK-801 evaluadas tanto en el modelo de LT como en otros modelos conductuales [Benvenga MJ 1988; Itoh J 1991; Hlinák Z 1998; 2002; Celikyurt I 2010]. En concordancia con estas evidencias, es sabido que los receptores NMDA participan en procesos involucrados en la formación de memorias dependientes del hipocampo a través de fenómenos de potenciación a largo plazo [Bliss TV 1993], procesos que podrían verse alterados luego de la administración de MK-801 e inducir las alteraciones cognitivas observadas. Por otro lado, el hecho de que la dosis de MK-801 seleccionada (0.05) para estos estudios no indujera hiperactividad u otras alteraciones motoras y que, tanto el grupo control como el tratado, realizaran la tarea propuesta de manera similar en el primer día del test (sesión de adquisición de la tarea), demuestra que el aumento de LT2 observado en el grupo con MK-801, no debió estar influido por un impedimento motor en el día de adquisición. Cabe mencionar que las caídas del laberinto en cruz elevado registradas en los animales en el día 1 del *test*, fueron consideradas como eventos ocasionales, no relacionadas a la inducción de los signos de ataxia (caídas torpes) observadas en el Open Field. A su vez, se descartó la influencia de un aumento en la actividad motora y/o un posible efecto ansiolítico inducido por MK-801 24 hrs después de su administración (ambas respuestas podrían generar un aumento en la LT2), resultado que apoya fuertemente la aparición del

efecto amnésico inducido por el antagonista NMDA. Por último, no parece haber un efecto residual del fármaco ya que al tercer día de ensayo la LT de MK-801 no fue significativamente diferente respecto al grupo control. En su conjunto, estos resultados fortalecen el uso del modelo LT como un paradigma conductual sencillo y viable para la evaluación de alteraciones en el aprendizaje y la memoria.

La co-administración del AAT Clz bloqueó el efecto amnésico inducido por MK-801 restableciendo la capacidad de los animales de aprender la tarea realizada en el día 1 del test. Estos resultados van en el mismo sentido que datos previos de la literatura los cuales describen un efecto positivo de Clz frente a alteraciones cognitivas inducidas por el bloqueo NMDA utilizando otros modelos conductuales tales como el *Water Maze* y *Novel Object Recognition* [Ichikawa J 2001; Leucht S 2009b] confirmando la ventaja terapéutica en el uso de este antipsicótico en el tratamiento de los trastornos cognitivos de la esquizofrenia.

El antagonismo selectivo de los receptores 5-HT_{1A}, a través del uso de WAY-100635, impidió la habilidad de Clz de bloquear el aumento de LT2 inducido por MK-801, indicando que el AAT requiere de la activación de los receptores 5-HT_{1A} para ejercer su efecto. A su vez, la dosis de WAY-100635 (0.3) seleccionada en estos experimentos permitió descartar un efecto amnésico *per se* de la droga demostrando un efecto específico de Clz a través de los receptores 5-HT_{1A}. La capacidad de Clz para mejorar las alteraciones cognitivas inducidas por la administración de antagonistas NMDA ha sido descrita en la literatura, sin embargo, no estaba del todo claro a través de qué receptores ejerce sus efectos. En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo apoyan la hipótesis que propone que los receptores 5-HT_{1A} son un sitio de acción clave en el mecanismo de acción de Clz [Meltzer HY 2008].

Si bien algunas evidencias demuestran que las alteraciones cognitivas pueden ser atenuadas a través del agonismo 5-HT_{1A}, existen otras evidencias que reportan que el antagonismo 5-HT_{1A} media los efectos positivos sobre las alteraciones cognitivas [Boast C 1999]. Esta contradicción sugiere que los receptores 5-HT_{1A} podrían estar actuando de manera distinta sobre distintos dominios cognitivos dejando en evidencia la posibilidad de que distintos mecanismos mediados por un agonismo o un antagonismo de los receptores 5-HT_{1A} participen en la mejora de las funciones cognitivas en diferentes pacientes esquizofrénicos [Madjid N 2006; Meltzer HY 2011].

Si bien el presente trabajo no profundiza en los mecanismos que subyacen a la acción positiva de la Clz, la propiedad de ser un agonista parcial de los receptores 5-HT_{1A} sugiere la posibilidad de que la administración de MK-801 genere un aumento indirecto sobre la transmisión 5-HTérgica que este en la base del efecto amnésico. A través de una acción antagonista (o agonismo parcial) Clz re-establecería esa alteración. En apoyo a esta hipótesis, existen evidencias que muestran que PCP, Ketamina y MK-801 aumentan la transmisión 5-HTérgica en la CPFmedial, la que es

bloqueada por la administración de Clz y no de Haloperidol [Amargos-Bosch M 2006; Lopez Gil X 2007]. Los autores proponen que tal respuesta podría estar relacionada con la eficacia superior de la AAT respecto de los AT en la mejoría de los trastornos cognitivos de la esquizofrenia. Quedaría por demostrar si tal efecto neuroquímico sucede en la región del Hipocampo, otra región altamente vinculada con la función cognitiva.

Finalmente, no podemos dejar de mencionar que el componente 5-HT_{1A} posiblemente no sea el único receptor que estaría interviniendo en la acción de Clz, ya que, el AAT posee afinidad por otros receptores entre los que se destacan los serotoninérgicos 5-HT₆ y 5-HT₇ y los muscarínicos m₁ [Pitsikas 2003; 2008; Pouzet 2002]. Estos sitios de acción podrían ser importantes en la acción terapéutica del antipsicótico sobre a los trastornos cognitivos, sin embargo, sus roles quedan por ser determinados.

ABSTRACT DE MANUSCRITO EN PREPARACIÓN

Clozapine blocks the amnesic effect induced by dizocilpine through a 5-HT_{1A} receptor-dependent mechanism

Ximena López Hill^a and María Cecilia Scorza^{a,*}

^aLaboratory of Cell Biology, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Avenida Italia 3318, 11600 Montevideo, Uruguay. *Corresponding author: María Cecilia Scorza, PhD. E-mail: scorzacecilia@gmail.com

Abstract

Cognitive deficits are core feature in schizophrenia accounted for much of the impairment in functioning of patients. Clinical evidences have suggested that atypical antipsychotics drugs, specifically Clozapine, are better improving cognition deficits in patients compared to typical ones. Although Clozapine binds to several receptors, receptor/s by which mediated the deficit improvement remains so far unknown. Enough evidences support for 5-HT_{1A} receptors as a putative site by which drug mediate the beneficial action.

The N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) antagonists have been used as an animal model of cognitive deficits in schizophrenia. Dizocilpine (MK-801), the most potent NMDAR antagonist, induces cognitive deficit measured by Transfer Latency (TL). TL is a behavioral parameter for the evaluation of spatial learning and memory in animals which can be measured using the elevated plus-maze test.

Here we investigated the effect of Clozapine (Clz) in cognitive deficit induced by MK-801 using the TL. Additionally, we determined if 5-HT_{1A} receptors are involved in the Clz action.

Wistar male rats were injected with Clz (1 mg/kg) or vehicle and 5 min later MK-801 (0.05 mg/kg) or saline were administered. Moreover, WAY-100635 (selective 5-HT_{1A} antagonist) was pre-injected (0.3 mg/kg) in animals and then treated with Clz (1 mg/kg) and MK-801 (0.05 mg/kg). In both experiments, TL1 was evaluated after 30 min of drug injections whereas animal's performance without drugs was measured in TL2 and TL3, 24 and 48 h later, respectively.

TL2 was more prolonged in animals treated with MK-801 than saline, indicating an amnesic effect of the drug. TL3 was similar to control value. Clz attenuated the increase in TL2 observed after MK-801 treatment. Interestingly, WAY-100635 prevented the attenuation of the MK-801-induced amnesic effect by Clz, demonstrating the involvement of 5-HT_{1A} receptors in the mechanism of action of Clz. These results provide a significant implication for the cognition improvement in schizophrenia.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

El desarrollo de esta tesis permitió la obtención de las siguientes conclusiones:

- 1) Se profundizó en la caracterización del síndrome comportamental asociado al antagonismo NMDA previamente descrito en la literatura.
- 2) Se identificó al núcleo anterior del tálamo como un sustrato neurobiológico implicado en la inducción del síndrome conductual motor provocado por MK-801.
- 3) Se determinó que una desinhibición del núcleo anterior del tálamo, posiblemente vía aferencias GABAérgicas del núcleo reticular, parece ser un mecanismo implicado en la generación de la mayoría de las conductas que componen el síndrome conductual motor del antagonista NMDA, MK-801. El antagonismo del receptor NMDA generaría un desbalance en el control excitatorio/inhibitorio en el núcleo anterior del tálamo generando las alteraciones conductuales observadas.
- 4) Los resultados sugieren que una desinhibición del núcleo anterior del tálamo podría estar asociada a la sintomatología positiva de la patología de la esquizofrenia.
- 5) Una alteración directa en el sistema GLUérgico vía NMDA, subyacería a la alteración cognitiva evaluada ya que la administración sistémica de MK-801 generó un efecto amnésico evaluado en el paradigma de Latencia de Transferencia.
- 6) A través del uso del modelo de memoria de Latencia de Transferencia se confirmó la capacidad de Clozapina de bloquear el efecto amnésico inducido por MK-801. Este resultado además deja en evidencia la validez de semejanza del modelo y apoyan las evidencias que muestran el uso de Clozapina en el tratamiento de los trastornos cognitivos en la esquizofrenia.
- 7) Se determinó que el receptor 5-HT_{1A} juega un importante papel en la acción terapéutica de Clz sobre el efecto amnésico generado por MK-801, aportando información relevante sobre la participación de este receptor en el tratamiento de los déficits cognitivos presentes en la esquizofrenia.
- 8) Se validó el modelo de Latencia de transferencia como una herramienta útil para estudiar el potencial terapéutico de fármacos antipsicóticos y su mecanismo de acción.

IX. PERSPECTIVAS

Los resultados de la presente Tesis contribuyeron a ampliar el conocimiento acerca de las bases neurales que subyacen a la acción del antagonismo de receptores NMDA y su relación con la sintomatología positiva y al mecanismo de acción del antipsicótico atípico Clozapina, en relación a su acción terapéutica sobre los trastornos cognitivos de la esquizofrenia. En este sentido, los resultados obtenidos generan una serie de perspectivas inmediatas o a futuro que se resumen a continuación:

1) Si bien el núcleo anterior del tálamo parece ser un sustrato neurobiológico involucrado en el síndrome motor inducido por el antagonismo del receptor NMDA, queda pendiente evaluar si dicho núcleo participa en el mecanismo de acción de un antipsicótico atípico, bloqueando dicha alteración motora. Se sabe que el tálamo es una región que expresa varios receptores por los cuales Clz posee afinidad, por lo tanto, sería interesante estudiar además el papel de algunos receptores en la acción terapéutica del antipsicótico.

2) Queda pendiente estudiar los circuitos de proyección del núcleo anterior del tálamo involucrados en la respuesta motora observada luego de la administración del antagonista NMDA.

3) Ha sido ampliamente demostrado que los niveles de expresión del Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) en regiones límbicas de ratas adultas están positivamente correlacionados con la habilidad para aprender y adquirir memorias, a través de su influencia en la inducción de la potenciación a largo plazo (LTP) [Xu B, 2000; Yamada K, 2002]. A su vez, disminuciones en la expresión de BDNF han sido reportadas en el suero de pacientes con esquizofrenia [Toyooka K, 2002] asociándose también con alteraciones en la transmisión GLUérgica, a través del receptor NMDA. Los antagonistas NMDA son ampliamente utilizados como modelo pre-clínico para estudiar las alteraciones cognitivas asociadas a la esquizofrenia [Moghaddam B 2003]. De manera interesante, estudios pre-clínicos han demostrado que la administración sistémica de MK-801, promueve una disminución en la expresión de BDNF en el hipocampo, región involucrada en la formación de memorias [Fumagalli F 2003].

Con el fin de continuar profundizando en el efecto amnésico inducido por MK-801 sobre el parámetro Latencia de Transferencia, queda pendiente investigar si las alteraciones inducidas por MK-801 en este modelo estarían asociadas con cambios en la expresión de BDNF en el hipocampo y la corteza prefrontal, regiones ampliamente vinculadas a las funciones cognitivas. De esta manera, quedaría relacionado el efecto amnésico identificado en la tarea de Latencia de transferencia con una disminución en la expresión de BDNF, estudiando a su vez, si existe una expresión diferencial en ambas regiones.

4) En la búsqueda de fortalecer la validación del uso del modelo LT como herramienta para estudiar el potencial terapéutico de fármacos antipsicóticos y su mecanismo de acción, se planifica evaluar el efecto de un AT y otros AAT sobre las alteraciones inducidas por MK-801 en este modelo.

5) De comprobarse un efecto de MK-801 sobre los niveles de expresión de BDNF en el hipocampo y/o corteza prefrontal, se evaluará la acción de un AT y un AAT sobre dicho efecto.

X. CONTRIBUCIONES

Artículos publicados y en preparación

- Ximena López Hill, Cecilia Scorza (2012). *Role of the anterior thalamic nucleus in the motor hyperactivity induced by systemic MK-801 administration in rats.* *Neuropharmacology* **62**: 2439-2445.
- Ximena López Hill, Cecilia Scorza (2013). *Clozapine blocks the amnesic effect induced by dizocilpine through a 5-HT_{1A} receptor-dependent mechanism.* Manuscrito en preparación.

Presentaciones orales en congresos

- Ximena López Hill. **“Clozapina bloquea el déficit cognitivo inducido por MK-801 a través del receptor 5-HT_{1A}. Implicancias en el tratamiento de la esquizofrenia”.** Mesa redonda de Neurociencias, XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, Piriápolis Uruguay (2012).

Posters presentados en congresos

- X.López Hill, C. Scorza. **“El agonismo de receptores GABA_A en el núcleo anterior de tálamo bloquea el síndrome comportamental inducido por el antagonista NDMA, MK-801.”** XIII Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, Piriápolis, Uruguay (2010).
- López-Hill X. y Scorza MC **“Hyperlocomotion induced by MK-801, a N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist, imply a GABAergic disinhibition of the anterior thalamic nucleus.”** II Reunión Conjunta de Neurociencias (II RCN), Córdoba, Argentina (2010).
- López-Hill X. y Scorza MC **“Hyperlocomotion induced by MK-801, a N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist, imply a GABAergic disinhibition of the anterior thalamic nucleus.”** Simposio Desarrollo y Plasticidad del Sistema Nervioso Montevideo, Uruguay (2010).
- Ximena López Hill y María Cecilia Scorza **“Muscimol (a GABA_A receptor agonist) intra-anterior thalamic nucleus blocks the behavioral syndrome induced after systemic administration of MK-801.”** Society for Neuroscience, Neuroscience 2011, Washington D.C., USA (2011).
- M^a Cecilia Scorza y Ximena López Hill **“Anterior thalamic nucleus as a neural substrate involved in the induction of the motor behavioral effects elicited by dizocilpine (MK-801).”** 8th FENS Forum of Neuroscience, Barcelona, España (2012)
- López Hill, Ximena y Scorza, María Cecilia **“Clozapina bloquea el déficit cognitivo inducido por MK-801 en ratas a través del receptor serotoninérgico 5-HT_{1A}.”** XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, Piriápolis Uruguay (2012).
- López Hill X y Scorza MC. **“MK-801-induced cognitive deficit in rats is improved by Clozapine: involvement of serotonin 5-HT_{1A} receptor mechanism.”** 1^{er} Congreso FALAN, Cancún, México (2012).

XI. REFERENCIAS

Adam BW, Moghaddam B (2001). *Effect of clozapine, haloperidol, or M100907 on phencyclidine-activated glutamate efflux in the prefrontal cortex*. Biol. Psychiatry **50**(10): 750-757.

Akbarian S, Sucher NJ, Bradley D, Tafazzoli A, Trinh D, Hetrick WP, Potkin SG, Sandman CA, Bunney WE Jr, Jones EG (1996). *Selective alterations in gene expression for NMDA receptor subunits in prefrontal cortex of schizophrenics*. J. Neurosci. **16**: 19–30.

Amargos-Bosch M, López- Gil X, Artigas F, Adell A (2006). *Clozapine and olanzapine, but not haloperidol, suppress serotonin efflux in the medial prefrontal cortex elicited by phencyclidine and ketamine*. Int. J. Neuropsychopharmacol. **9** (5): 565- 573.

Anaya-Martinez V, Martinez-Marcos A, Martinez-Fong D, Aceves J, Erlij D (2006). *Substantia nigra compacta neurons that innervate the reticular thalamic nucleus in the rat also project to striatum or globus pallidus: implications for abnormal motor behavior*. Neuroscience **143**: 477-486.

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

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.

Archer J (1973). *Tests for emotionality in rats and mice: a review*. Anim. Behav. **21**(2):205-235.

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

Barnes NM, Sharp T (1999). *A review of central 5-HT receptors and their function*. Neuropharmacol. **38**: 1083-1152.

Bartos M, Vida I, Jonas P. (2007). *Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks*. Nat. Rev. Neurosci **8**: 45–56.

Benes F, Berretta S (2001). *GABAergic Interneurons: Implications for Understanding schizophrenia and Bipolar Disorder*. Neuropsychopharmacol. **25**(1): 1-26.

Benvenga MJ, Spaulding TC (1988). *Amnesic effect of the novel anticonvulsant MK-801*. Pharmacol. Biochem. Behav. **30**(1): 205-217.

Bliss TV, Collingridge GL (1993). *A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus*. Nature **361**: 31-39.

Boast C, Bartolomeo AC, Morris H, Moyer JA (1999). *5HT Antagonists Attenuate MK801-Impaired Radial Arm Maze Performance in Rats*. Neurobiol. Learning and Memory **71**: 259-271.

Bortolozzi A, Díaz-Mataix L, Scorza MC, Celada P, Artigas F (2005). *The activation of 5-HT receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity*. J. Neurochem. **95**(6): 1597-1607.

Bortolozzi A, Masana M, Díaz-Mataix L, Cortés R, Scorza MC, Gingrich JA, Toth M, Artigas F (2010). *Dopamine release induced by atypical antipsychotics in prefrontal cortex requires 5-HT(1A) receptors but not 5-HT(2A) receptors*. Int J. Neuropsychopharmacol. **17**: 1-16.

Boutros NN, Arfken C, Galderisi S, Warrick J, Pratt G, Iacono W (2008). *The Status of Spectral EEG Abnormality as a Diagnostic Test for Schizophrenia*. Schizophr. Res. **99**(1-3): 225-237.

Bresink I, Danysz W, Parsons CG, Mutschler E (1995). *Different binding affinities of NMDA receptor channel blockers in various brain regions--indication of NMDA receptor heterogeneity*. Neuropharmacol. **34**: 533-540.

Bubenikova-Valesova V, Stuchlik A, Svoboda J, Bures J, Vales K (2008). *Risperidone and ritanserine but not haloperidol block effect of dizocilpine on the active allothetic place avoidance task*. Proc. Natl. Acad. Sci. **105**(3): 1061-1066.

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

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

Carlsson A, Waters N, Holm-Waters S, Tedroff J, Nilsson M, Carlsson ML (2001). *Interactions between monoamines, glutamate, and gaba in schizophrenia: New Evidence*. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **41**: 237-260.

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

Chattopadhyaya B, Di Cristo G (2012). *GABAergic circuit dysfunctions in neurodevelopmental disorders*. Front. Psychiatry **3**(51): 1-9.

Goff DC, Coyle JT (2001). *The emerging role of glutamate in the pathophysiology and treatment of schizophrenia*. Am. J. Psychiatry **158**: 1367-1377.

Clinton S, Meador-Woodruff J (2004). *Thalamic dysfunction in schizophrenia: neurochemical, neuropathological, and in vivo imaging abnormalities*. Schizophr. Res. **69**: 237-253.

Cruz A, Frei F, Graeff G (1994). *Ethopharmacological analysis of rat behavior on the elevated Plus-maze*. Pharmacol. Biochem. Behav. **49**: 171-176.

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

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

Enamoto T, Ishibashi T, Tokuda K, Ishimaya T, Toma S, Ito A (2008). *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.

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

Farde L, Wiesel FA, Halldin C, Sedvall (1988). *Central D₂-dopamine receptor occupancy in schizophrenic patients treated with antipsychotic drugs*. Arch. Gen. Psychiatry **45**: 71-76.

Fitzgerald PJ (2012). *The NMDA receptor may participate in widespread suppression of circuit level neural activity, in addition to a similarly prominent role in circuit level activation*. Behavioural Brain Res. **230**: 291-298.

Fumagalli F, Molteni R, Roceri M, Bedogni F, Santero R, Fossati C, Gennarelli M, Racagni G, Riva MA (2003). *Effect of Antipsychotic Drugs on Brain-Derived Neurotrophic*

Factor Expression Under Reduced N-Methyl-D-Aspartate Receptor Activity. J. Neurosc. Research **72**: 622-628.

Fuster JM, (2001). *The prefrontal cortex--an update: time is of the essence.* Neuron **30**(2): 319-33.

Geyer MA, Ellenbroek B (2003). *Animal behavior models of the mechanisms underlying antipsychotic atypicality.* Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. **27**(7): 1071-1079.

Gonzales-Burgos G (2010). *Alterations of Cortical GABA Neurons and Network Oscillations in Schizophrenia.* Curr Psychiatry Rep. **12**(4): 335–344.

Gonzalo-Ruiz A, Sanz JM, Lieberman AR (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 AR (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.

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

Guillin O, Abi-Dargham A, Laruelle M (2007). *Neurobiology of dopamine in schizophrenia.* Int Rev Neurobiol. **78**: 1-39.

Harder JA, Ridley (2000). *The 5-HT1A antagonist, WAY 100 635, alleviates cognitive impairments induced by dizocilpine (MK-801) in monkeys.* RM Neuropharmacol. **39**: 547–552.

Hippius H (1999). *A historical perspective of clozapine.* J. Clin. Psychiatry **60**(12): 22-33.

Hlinák Z, Krejčí I (1998). *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.

Hlinák Z, Krejčí I (2002). *MK-801 induced amnesia for the elevated plus-maze in mice* Behav. Brain Res. **131**: 221-225.

Hilínák Z, Krejčí I (2003). *N-Methyl-D-Aspartate Prevented Memory Deficits Induced by MK-801 in Mice*. *Physiol. Res.* **52**: 809-812.

Homayoun H, Moghaddam B (2007). *NMDA Receptor Hypofunction Produces Opposite Effects on Prefrontal Cortex Interneurons and Pyramidal Neurons*. *J. Neurosci.* **27**: 11496-11500.

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

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

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

Javitt DC (2010). *Glutamatergic theories of schizophrenia*. *Isr J. Psychiatry Relat Sci.* **47**: 4-16.

Jodo E, Suzuki Y, Katayama T, Hoshino K, Takeuchi S, Niwa Sh, Kayama Y (2005). *Activation of Medial Prefrontal Cortex by Phencyclidine is Mediated via a Hippocampoprefrontal Pathway*. *Cerebral Cortex* **15**: 663—669.

Jones EG (1997). *Cortical development and thalamic pathology in schizophrenia*. *Schizophr. Bull.* **23**: 483-501.

Jones EG (1998). *The thalamus of primates*. In: Bloom, F.E., Bjorklund, A., Hokfelt, T. (Eds.), *The Primate Nervous System, Part II*. Elsevier, New York, pp. 1 –246.

Kaiser S, Foltz L, George C., Kirkwood S, Bemis K, Lin X, Gelbert L, Nisenbaum L (2004). *Phencyclidine-induced changes in rat cortical gene expression identified by microarray analysis: implications for schizophrenia*. *Neurobiol. Disease* **16**: 220-235.

Kane JM, Correll Ch. (2010). *Past and Present Progress in the Pharmacologic Treatment of Schizophrenia*. *J Clin Psychiatry.* **71**(9): 1115-1124.

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

Kapur S, Seeman P (2001). *Does fast dissociation from the dopamine d(2) receptor explain the action of atypical antipsychotics?: A new hypothesis*. Am. J. Psych. **158**(3): 360-369.

Kapur S, Sridhara N, Remington G (2004). *The newer antipsychotics: underlying mechanisms and the new clinical realities*. Curr Opin Psychiatry **17**:115-121.

Kantrowitz J, Javitt DC (2010). *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.

Karavanova I, Vasudevan K, Cheng J, Buonanno A. (2007). *Novel regional and developmental NMDA receptor expression patterns uncovered in NR2C subunit- β -galactosidase knock-in mice*. Mol Cell Neurosci. **34**(3): 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. **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. **1**(6): 1-7.

Keilhoff G, Becker A, Grecksch G, Wolf G, Bernstein HG (2004). *Repeated application of ketamine to rats induces changes in hippocampal expression of parvalbumin, neural nitric oxide synthase and c-fos similar to those found in human schizophrenia*. Neurosci. **126**: 591-598.

Kesslak JP, Chuang KR, Berchtold NC (2003). *Spatial learning is delayed and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression inhibited by administration of MK-801 in rats*. Neurosci. Lett. **353**(2):95-98.

Kim JS, Kornhuber HH, Schmid-Burgk W, Holzmüller B (1980). *Low cerebrospinal fluid glutamate in schizophrenic patients and a new hypothesis on schizophrenia*. Neurosci. Lett. **3**: 379-382.

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

Kuczenski R, Segal DS, Aizenstein ML (1991). *Amphetamine, Cocaine, and Fencamfamine: Relationship between Locomotor and Stereotypy Response Profiles and Caudate and Accumbens Dopamine Dynamics*. J. Neurosci. **9**: 2703-2712.

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

Laruelle M, Abi-Dargham A, Van dyck C, Gil R, D'souza C, Erdos J, Mccance E, Rosenblatt W, Fingado Ch, Zoghbi S, Baldwin R, Seibyli J, Krystal J, Charney D, Innis R (1996). *Single photon emission computerized tomography imaging ofamphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects*. Proc. Natl. Acad. Sci. **93**: 9235-9240.

Lathi AC, Weiler MA, Tamara Michaelidis BA, Parwani A, Tamminga CA (2001). *Effects of Ketamine in Normal and Schizophrenic Volunteers*. Neuropsychopharmacology **25**: 455-467.

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

Leucht S, Komossa K, Rummel-Kluge C, Corves C, Hunger H, Schmid F, Asenjo Lobos C, Schwarz S, Davis JM (2009b). *A meta-analysis of head-to-head comparisons of second-generation antipsychotics in the treatment of schizophrenia*. Am J Psychiatry **166**: 152-163.

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

Lewis DA, Volk DW, Hashimoto T (2004). *Selective alterations in prefrontal cortical GABA neurotransmission in schizophrenia: a novel target for the treatment of working memory dysfunction*. Psychopharmacol. **174**: 143-150.

Llinás R, Ribary U, Jeanmonod D, Kronberg E, Mitra P (1999). *Thalamocortical dysrhythmia: A neurological and neuropsychiatric syndrome characterized by magnetoencephalography*. PNAS **96**(26): 15222-15227.

Lister R (1990). *Ethologically based animal models of anxiety disorders*. Pharmacology & therapeutics, **43**(3): 321-340.

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

Lorrain DS, Baccei CS, Bristow LJ, Anderson JJ, Varney MA (2003). *Effects of ketamine and N-methyl-D-aspartate on glutamate and dopamine release in the rat prefrontal cortex: modulation by a group II selective metabotropic glutamate receptor agonist LY379268*. Neurosci. **117**(3):697-706.

Lüttgen M, Elvander E, Madjida N, Ögren S (2005). *Analysis of the role of 5-HT_{1A} receptors in spatial and aversive learning in the*. Neuropharmacol. **48**: 830-852.

Madjid N, Elvander Tottie E, Lüttgen M, Meister B, Sandin J, Kuzmin A, Stiedl O, Ögren S (2006). *5-Hydroxytryptamine 1A receptor blockade facilitates aversive learning in mice: interactions with cholinergic and glutamatergic mechanisms*. J. Pharmacol. Exp. Ther. **316**: 581-591.

Malhorta AK, Adler CM, Kennison SD, Elman I, Pickar D, Breier A (1997). Clozapine blunts N-methyl-D-aspartate antagonist-induced psychosis: a study with ketamine. Biol Psychiatry. **42**(8): 664-668.

Mann EO, Paulsen O. (2007) *Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations*. Trends Neurosci. **30**: 343–349.

Marcus M, Jardemark KE, Wadenberg ML, Langlois X, Hartel P, Svensson TH (2005). *Combined alpha₂ and D_{2/3} receptor blockade enhances cortical glutamatergic transmission and reverses cognitive impairment in the rat*. Int. J. Neuropsychopharmacol. **8**(3): 315-327.

Martin P 1997, Waters N, Waters S, Carlsson A, Carlsson ML, (1997). *MK-801-induced hyperlocomotion: differential effects of M100907, SDZ PSD 958 and raclopride*. Eur. J. Pharmacol. **335** (2-3): 107-16.

Mathé JM, Nomikos GG, Blakeman KH, Svensson TH (1999). *Differential actions of dizocilpine (MK-801) on the mesolimbic and mesocortical dopamine systems: role of neuronal activity*. Neuropharmacol. **38**(1): 121-128.

Meikle MN (2008). Tesina de Graduación: “*Caracterización de las conductas inducidas por el antagonista NMDA, MK-801 en ratas. Modelo farmacológico para el estudio del mecanismo de acción de fármacos antipsicóticos*”.

Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC (1989). *The ratios of serotonin₂ and dopamine₂ affinities differentiate atypical and typical antipsychotic drugs*. Psychopharmacol. Bull. **25**(3): 390-402.

- Meltzer HY (1995). *Clozapine: is another view valid?* Am. J. Psychiatry **152**(6): 821-825.
- Meltzer HY. (1999). *The Role of Serotonin in Antipsychotic drug action.* Neuropsychopharmacol. **21**: 106-115.
- Meltzer HY, Park S, Kessler R. (1999b). *Cognition, schizophrenia and the atypical antipsychotic drugs.* Proc. Natl. Acad. Sci. **96**(24): 13591-13603.
- Meltzer HY, Huang M (2008). *In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems.* Prog. Brain Res. **172**: 177-97.
- Meltzer HY, Massey BW (2011). *The role of serotonin receptors in the action of atypical antipsychotic drugs.* Curr. Op. Pharmacol. **11**: 59–67.
- Meneses A (1998). *Physiological, pathophysiological and therapeutic roles of 5-HT systems in learning and memory.* Rev. Neurosci. **9**: 275-289.
- Millan MJ (2000). *Improving the Treatment of Schizophrenia: Focus on Serotonin (5-HT)_{1A} Receptors.* J. Pharmacol. Exp. Ther. **295**: 853-861.
- Miyamoto S, Duncan GE, Marx CE, Lieberman JA (2005). *Treatments for schizophrenia: a critical review of pharmacology and mechanisms of action of antipsychotic drugs.* Mol. Psych. **10**: 79-104.
- Moghaddam B (1997). *Stress Activation of Glutamate Neurotransmission in the Prefrontal Cortex: implications for Dopamine-Associated Psychiatric Disorders.* Biol psychiatry **51**: 775-787.
- Moghaddam B, Jackson ME (2003). *Glutamatergic animal models of schizophrenia.* Ann. NY Acad. Sci. **1003**: 131-137.
- Montgomery KC, Monkman JA (1955). *The relation between fear and exploratory behavior.* J. Comp. Physiol. Psychol. **48**(2):132-136.
- Mutlu O, Ulak G, Celikyurt IK, Akar FY, Erden F (2011). *Effects of olanzapine, sertindole and clozapine on learning and memory in the Morris water maze test in naive and MK-801-treated mice.* Pharmacol. Biochem. Behav. **98**: 398–404.
- Newman-Tancredi A, Gavaudan S, Conte C, Chaput C, Touzard M, Verrie` le L, Audinot V, Millan MJ (1998). *Agonist and antagonist actions of antipsychotic agents at 5-HT_{1A} receptors: a [35S]GTPgammaS binding study.* Eur J Pharmacol **355**: 245-256.

Nichols DE (2004). *Hallucinogens*. Pharmacol. Ther. **101**(2): 131-81.

Organización Mundial de la Salud (OMS) (2001). Informe sobre la salud mental. Cap. 2: *Carga de los Trastornos mentales y conductuales*.

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

Patel S, Fernandez-Garciab E, Hutsonb PH, Patelb S. (2001). An in vivo binding assay to determine central alpha(1)-adrenoceptor occupancy using [(3)H]prazosin. *Brain Res. Brain. Res. Protoc.* **8**: 191-198.

Paxinos G (2004). *Talamus*. En *The rat Nervous Sistem*, 3th edn. Academic Press, San Diego, pp: 407-441.

Paxinos G, Watson C (2005). *"The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates"*, 5th edn.

Pellow S, File SE (1986). *Anxiolytic and anxiogenic drug effects in exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat*. Pharmacol. Biochem. Behav. **24**: 525-529.

Pilowsky LS, Bressan RA, Stone JM, Erlandsson K, Mulligan RS, Krystal JH, Ell PJ. (2006). *First in vivo evidence of an NMDA receptor deficit in medication-free schizophrenic patients*. Mol Psychiatry. **11**: 118–119.

Pitsikas N, Rigamonti AE, Cella SG, Muller EE (2003). *The 5-HT 1A receptor antagonist WAY 100635 improves rats performance in different models of amnesia evaluated by the object recognition task*. Brain Res. **983**(1-2): 215-222.

Pitsikas N, Zisopoulou S, Pappas I, Sakellaris N (2008). *The selective 5-HT(6) receptor antagonist Ro 04-6790 attenuates psychotomimetic effects of the NMDA receptor antagonist MK-801*. Behav. Brain Res. **188**(2): 304-309.

Pouzet B, Didriksen M, Arnt J (2002). *Effects of the 5-HT(7) receptor antagonist SB-258741 in animal models for schizophrenia*. Pharmacol. Biochem. Behav. **71**(4): 655-665.

Price JL (1995). *Talamus*. En Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System*. Academic Press, San Diego, pp. 629-648.

Remington GJ, Addington D, Collins EJ, Jones BD, Lalonde P, MacCrimmon DJ, MacEwan GW. (1996). *Clozapine: current status and role in the pharmacotherapy of schizophrenia*. Can J Psychiatry. **3**: 161-166.

Reinchenberg A (2005). *Cognitive impairment as a risk factor for psychosis*. Dialogues Clin Neurosci. **7**: 31-38.

Radley J, Farb C, He Y, Janssen W, Rodrigues S, Johnson L, Hof P, LeDoux J, Morrison J (2007). *The distribution of NMDA and AMPA receptor subunits at thalamoamygdala dendritic spines*. Brain Res. **1134**(1): 87–94.

Rodriguez JJ, Kohn R, Aguilar S (2009). *Prevalencia y carga de los trastornos mentales en la población adulta de América Latina y el Caribe*. En: *Epidemiología de los trastornos mentales en América Latina y el Caribe*. Organización Panamericana de la Salud, OPS: Washington DC.

Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikoy M, Coyle JT. (2006). Neurobiol. Schizop. *Neuron* **52**: 139-153.

Roth BL, Shefflerb D, Potkin SG (2003). *Atypical antipsychotic drug actions: unitary or multiple mechanisms for 'atypicality'?* Clinical Neuroscience Research **3**: 108-117.

Roth BL, Hanizavareh SM, Blum AE. (2004). *Serotonin receptors represent highly favorable molecular targets for cognitive enhancement in schizophrenia and other disorders*. Psychopharmacol (Berl) **174**(1): 14-24.

Rung JP, Carlsson A, Markinhuhta KR, Carlsson ML (2005). *(+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry **29**: 827-832.

Saha S, Chant D, Welham J, McGrath J (2005). *A Systematic Review of the Prevalence of Schizophrenia*. Plos Med. Journal **2**(5): 413-433.

Salt TE, Eaton AS (1996). *Functions of ionotropic and metabotropic glutamate receptors in sensory transmission in the mammalian thalamus*. Prog. Neurobiol. **48**(1):55-72.

Santana N, Troyano-Rodriguez 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.

Sawyer SF, Young SJ, Groves PM, Tepper JM (1994). *Cerebellar-responsive neurons in the thalamic ventroanterior-ventrolateral complex of rats: in vivo electrophysiology*. Neuroscience **63**(3): 711-724.

Scorza MC, Meikle MN, López Hill X, 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 MC, Castañé A, Bortolozzi A, Artigas F (2010). *Clozapine does not require 5-HT_{1A} receptors to block the locomotor hyperactivity induced by MK-801 Clz and MK-801 in KO1A mice*. Neuropharmacol. **59**: 112-120.

Serreti A, De Ronchi D, Lorenzi C, Bernardi D (2004). *New Antipsychotics and Schizophrenia: A Review on Efficacy and Side Effects*. Curr. Med. Chemistry **11**: 343-358.

Sharp F, Tomitaka M, Bernaudin M, Tomitaka S (2001). *Psychosis: pathological activation of limbic thalamocortical circuits by psychomimetics and schizophrenia?* Trends in Neurosci. **24**: 330-334.

Shibata H, Kondo S, Naito J (2004). *Organization of retrosplenial cortical projections to the anterior cingulate, motor, and prefrontal cortices in the rat*. Neurosci. Res. **49**: 1-11.

Smith JW, Gastambide F, Gilmour G, Dix S, Foss J, Lloyd K, Malik N, Tricklebank N (2011). *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.

Snigdha S, Horiguchi M, Huang M, Li Z, Shahid M, Neill JC, Meltzer HY (2009). *Attenuation of phencyclidine-induced object recognition deficits by the combination of atypical antipsychotic drugs and pimavanserin (ACP 103), a 5-Hydroxytryptamine 2A receptor inverse agonist*. J. pharmacol. Exp. Ther. **332**: 622-631.

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

Takahashi Y, Kusumi I, Ishikane Y, Matsubara S, Koyama T (1998). *In vivo occupation of dopamine D₁, D₂ and serotonin (5-HT)_{2A} receptors by sertindole in the rat brain*. J. Psychiatry Neurosci. **23**(3): 157-162.

- Tricklebank MD, Forler C, Fozard JR (1985). *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*. Eur. J. Pharmacol. **106**: 271-282.
- Tomitaka S, Tomitaka M, Tolliver BK, Sharp FR (2000). *Bilateral blockade of NMDA receptors in anterior thalamus by dizocilpine (MK-801) injures pyramidal neurons in rat retrosplenial cortex*. European J. Neurosci. **12**: 1420-1430.
- Toyooka K, Asama K, Watanabe Y, Muratake T, Takahashi M, Someya T, Nawa H (2002). *Decreased levels of brain-derived neurotrophic factor in serum of chronic schizophrenic patients*. Psychiatry Res. **110**(3): 249-57.
- Tsuang M (2000). *Schizophrenia: genes and environment*. Biological Psychiatry **47**: 210-220.
- Väisänen J, Ihalainen J, Tanila H, Castren E (2004). *Effects of NMDA-receptor antagonist treatment on c-fos expression in rat brain areas implicated in schizophrenia*. Cell and Mol Neurobiol. **24**: 769-780.
- Verma A, Moghaddam B (1996). *NMDA receptor antagonists impair prefrontal cortex function as assessed via spatial delayed alternation performance in rats: modulation by dopamine*. J. Neurosci. **16**(1): 373-379.
- Watis L, Chen SH, Chua HC, Chong SA, Sim K. (2008). *Glutamatergic abnormalities of the thalamus in schizophrenia: a systematic review*. J Neural Transm **115**: 493-511.
- Weinberger DR, Aloia MS, Goldberg TE, Berman KF (1994). *The frontal lobes and schizophrenia*. J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci. **6**: 419-427.
- White AM, Best PJ (1998). *The effects of MK-801 on spatial working memory and within-session spatial learning*. Pharmacol. Biochem. Behav. **59**(3): 613-617.
- Xu B, Gottschalk W, Chow A, Wilson RI, Schnell E, Zang K, Wang D, Nicoll RA, Lu B, Reichardt LF (2000). *The role of brain-derived neurotrophic factor receptors in the mature hippocampus: modulation of long-term potentiation through a presynaptic mechanism involving TrkB*. J. Neurosci. **20**(18): 6888-6897.
- Yamada K, Mizuna M, Nabeshima T (2002). *Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory*. Life Sci. **70**(7): 735-744.

Yang S, Hong Ch, Huanga Y, Tsai S (2010). *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*. Neurosci. Let. **469**: 127-130.

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

Zhang Y, Llinas RR, Lisman JE (2009). *Inhibition of NMDARs in the nucleus reticularis of the thalamus produces delta frequency bursting*. Frontiers in Neural Circuits **3**(20): 1-9.

FINANCIACIÓN

Beca de Finalización de Postgrados otorgada por Comisión Académica de Postgrados (CAP), UdelaR. Setiembre 2011-julio 2012.

PEDECIBA (alícuotas 2010 y 2011).