

Paper del receptor 5HT_{1A} en el mecanisme d'acció de psicofàrmacs

Laia Lladó Pelfort

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

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

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



Paper del receptor $5HT_{1A}$ en el mecanisme d'acció de psicofàrmacs

Tesi doctoral presentada per
Laia Lladó Pelfort

Barcelona, juny de 2010

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

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

Els directors:

Dra. M^a Pau Celada Pedrosa
Investigadora IDIBAPS

Dr. Francesc Artigas Pérez
Professor d'Investigació del CSIC

Signat: Laia Lladó Pelfort
Barcelona, juny 2010

El present treball ha estat finançat amb els següents projectes:

- Modulació serotoninérgica de la corteza prefrontal: relevancia en el tratamiento de la depresión y la esquizofrenia. CICYT SAF2007-62378
- Modulació de los circuitos cortico-mesencefálicos por receptores 5-HT_{1A}. Relevancia en la acción terapéutica de los fármacos antipsicóticos. FIS PI060264
- Monoaminergic neurotransmission in prefrontal cortex: Target for augmentation strategies in schizophrenia. SENY Fundació
- Effects of F15599 and F13640 on pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in rat brain: *in vivo* electrophysiological studies. Pierre Fabre Médicament-IDIBAPS
- Actividad cortical y alucinaciones. Nuevo modelo experimental para la identificación de dianas terapéuticas en esquizofrenia. FIS PI09/1245

I ha estat realitzat amb el suport econòmic d'una beca predoctoral del programa de la "Junta para la Ampliación de Estudios" (JAE) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

A la meva família

“Jo no m’assec i deixo que les veus em destrossin. Em defenso el millor que puc. De vegades, els crido tan fort i tan alt que la infermera del meu psiquiàtric ha de posar-me una injecció. Si no puc ignorar-les, intento contestar amb la veu lleugerament més alta que la seva.”

Extret del relat d’un malalt d’esquizofrènia

Diuen que tots els científics aportem el nostre granet de sorra i que tard o d’hora es veuen els resultats, com passa en un formiguer. Vull donar les gràcies a totes les persones que en aquests anys m’han ajudat a empentar el meu granet de sorra en el formiguer de les malalties mentals.

Gràcies pels somriures càlids que cada dia em trobo al laboratori i al passadís, per les calçotades, costellades, asados, sopars i cervesetes vàries, per tots els companys de viatges i excursions, per les aterrades a Montjuïc amb accent argentí, pels cables soldats en bona companyia, per les músiques enganxoses de mitja tarda, per les sessions de jazz a la Ciutadella, els concerts i les festes sense fi, pels wiiiiiiis, els grans dies i els atacs de riure, per les xerrades a la terrassa amb cigarros sense cigarro i els cafès sense cafè i pels trens perduts en el millor moment. Perquè no tot en la ciència és ciència.

Il·lustració de portada: Margarita Pelfort Balaguer

“El receptacle de l'ànima i del control del moviment voluntari -de fet de les funcions nervioses en general- ha de ser situat al cor. El cervell és un òrgan de menor importància, potser necessari per refredar la sang.”

Aristòtil (384-322 a.C.)

Citat a Nussbaum (1978)

Aristotle's De Motu Animalium.

Princeton University Press, Princeton, NJ



“El foll”, 1904

Pablo Ruiz Picasso (1881-1973)

Aquarel·la sobre paper

Índex

Abreviacions	5
Introducció general	II
L'escorça prefrontal	13
Definició	13
Funció	14
Subdivisions funcionals	14
<i>Primats</i>	
<i>Rata</i>	
Connectivitat	16
<i>Connectivitat amb el tàlem</i>	
<i>Connectivitat cortico-cortical</i>	
<i>Connectivitat subcortical</i>	
Arquitectura	17
Tipus de neurones corticals	17
<i>Neurones piramidals</i>	
<i>Interneurones GABAèrgiques</i>	
<i>Altres tipus neuronals</i>	
<i>Relació entre diferents tipus de neurones corticals</i>	
Unitat funcional	22
Activitat cortical	23
Interacció recíproca entre l'EPF i els sistemes moduladors ascendents	25
Sistemes moduladors ascendents	25
<i>Sistema serotoninèrgic</i>	
Connectivitat entre sistemes moduladors i l'EPF	29
Interacció entre sistemes moduladors i l'EPF	30
<i>Modulació de la fisiologia cortical</i>	
<i>Modulació de les funcions corticals</i>	

El receptor 5-HT_{1A}	33
Descobriment, clonatge i descripció del gen	33
Distribució anatòmica del receptor al sistema nerviós	33
La proteïna: El receptor 5-HT _{1A} com a GPCR	34
<i>Mecanismes de transducció de senyals</i>	
<i>Desensibilització del receptor</i>	
<i>Oligomerització</i>	
Funció	36
<i>Relació del receptor 5-HT_{1A} amb les funcions cognitives</i>	
Esquizofrènia	41
Introducció	41
Simptomatologia i diagnosi	41
Etiologia, fisiopatologia i hipòtesis	42
Tractament	44
El receptor 5-HT _{1A} en la fisiopatologia i el tractament de l'esquizofrènia	46
<i>Estudis en animals</i>	
<i>Estudis en humans</i>	
Depressió	47
Introducció	47
Simptomatologia i diagnosi	47
<i>Deteriorament cognitiu en depressió</i>	
Etiologia, fisiopatologia i hipòtesis	48
Tractament	49
El receptor 5-HT _{1A} en la fisiopatologia i el tractament de la depressió	50
<i>Variants del gen del receptor 5-HT_{1A}</i>	
<i>Quantificació del receptor en pacients depressius</i>	
<i>El receptor 5-HT_{1A} i la hipòtesi relacionada amb l'estrès</i>	
<i>El receptor 5-HT_{1A} i la hipòtesi neurotròfica</i>	
<i>El receptor 5-HT_{1A} i el tractament monoaminèrgic</i>	
Dolor	55
Introducció	55

El receptor 5HT1A en el processament i el tractament del dolor	56
Hipòtesi de treball i objectius	61
Materials i mètodes	65
Materials	65
<i>Animals</i>	
<i>Fàrmacs</i>	
Registres electrofisiològics in vivo en rata anestesiada	66
<i>Preparació dels animals</i>	
<i>Preparació dels elèctrodes</i>	
<i>Sistemes</i>	
<i>Identificació de les neurones</i>	
<i>Farmacologia</i>	
<i>Histologia</i>	
<i>Anàlisi de dades</i>	
Microdiàlisi intracerebral in vivo en rata anestesiada	78
<i>Preparació de les sondes de microdiàlisi</i>	
<i>Preparació dels animals</i>	
<i>Obtenció de mostres</i>	
<i>Histologia</i>	
<i>Anàlisi de mostres</i>	
Anàlisi estadístic	80
Resultats	85
Treball 1	87
<i>L'agonista 5-HT1A 8-OH-DPAT provoca excitacions de les neurones piramidals d'EPFm a través de l'acció preferent sobre les interneurons GABAèrgiques</i>	
Treball 2	131
<i>L'F15599, un nou agonista del receptor 5-HT1A, amb acció preferencial sobre els heteroreceptors postsinàptics in vivo</i>	
Treball 3	145
<i>Efectes in vivo del nou agonista 5-HT1A F13640 sobre autoreceptors i heteroreceptors 5-HT1A de rata</i>	
Treball 4	181
<i>Efecte de diferents agonistes 5-HT1A sobre les oscil·lacions de baixa freqüència de l'EPFm de rata</i>	

Treball 5	209
<i>Caracterització del DU 125530, un antagonista 5-HT1A amb possible aplicació en la potenciació de tractaments antidepressius</i>	
Discussió general	247
Selectivitat regional	247
Senyalització dirigida per agonista	249
Excitacions produïdes per agonistes d'un receptor inhibitori	251
Les interneurons GABAèrgiques podrien tenir un paper clau en la desinhibició de les neurones piramidals d'EPF	253
Control de la via dopaminèrgica mesocortical i esquizofrènia	255
Interneurons GABAèrgiques i esquizofrènia	258
Millora del tractament antidepressiu	260
Ús d'agonistes 5-HT1A pel tractament del dolor	262
Activitat oscil·latòria	263
Conclusions	267
Bibliografia	271

Abreviacions

5-HIAA	<i>5-hydroxy-indolacetic acid</i>
5-HT	Serotonina; 5-hidroxi-triptamina
5CSRTT	<i>5 choice serial reaction time task</i>
8-OH-DPAT	8-hidroxi-N,N-dipropil-2-aminotetralina
AAT	antipsicòtic atípic
AC	adenilil ciclasa
ACAd	àrea cingulada anterior dorsal
ACh	acetilcolina
AD	antidepressiu
AHP	<i>after hyperpolarization potential</i>
AP	anteroposterior
AT	antipsicòtic típic
ÀTV	àrea tegmental ventral
BA	<i>Brodman area</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BP	<i>binding potential</i>
CB	calbindina
CCK	colecistoquinina
CR	calretinina
DA	dopamina
DALYs	<i>disability adjusted life years</i>
DOI	1-(2,5-dimethoxi-4-iodofenil)-propan-2-amina
DSM-IV	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders</i>
DU ₁₂₅₅₃₀	2-(4-(4-(7-cloro-2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-5-il)-1-piperazinil)butil)-1,2-benzisotiazol-3(2H)-ona-1,1-diòxid
DV	dorsoventral

EAC	escorça cingulada anterior
EEG	electroencefalograma
EOF	escorça orbitofrontal
EPF	escorça prefrontal
EPF DL	escorça prefrontal dorsolateral
EPF OM	escorça prefrontal orbitomedial
EPFm	escorça prefrontal medial
EPSC	excitatory postsynaptic current
FI3640	3- cloro- 4- fluorofenil- [4- fluoro- 4- ((5- metilpiridin- 2-il)metilamino)metil]piperidin- 1-il]metanona; Befiradol
FI5599	3-cloro-4-fluorofenil-[4-fluoro-4-[[5-metilpirimidin-2-ilmetil)amino]metil]piperidin-1-il]metanona
FFT	<i>fast Fourier transform</i>
FRB	<i>fast rhythmic bursting</i>
FS	<i>fast spiking</i>
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
GAD 65 / 67	Glutamat-descarboxilasa 65 kDal /67 kDal
GD	gir dentat
GIRK	<i>G protein inwardly rectifying potassium channel</i>
GPCR	<i>G protein coupled receptor</i>
HPA	eix hipotàlem-pituïtari-adrenal
HPC	hipocamp
HPLC	<i>High Performance Liquid Cromatography</i>
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenós
IB	<i>inactivating bursts</i>
ICD-10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th version</i>
ILA	infralímbica
IMAO	inhibidor de la monoaminoxidasa

IUPHAR	<i>International Union of Basic and Clinical Pharmacology</i>
KO	<i>knock out</i>
L	lateral
LC	locus coeruleus
LCR	líquid cefaloraquidi
LFP	<i>local field potential</i>
LSD	(6aR,9R)- N,N- dietil- 7-metil- 4,6,6a,7,8,9-hexahidroindolo- [4,3-fg] quinolina- 9-carboxamide
LTP	<i>long term potentiation</i>
MAO	monoaminoxidasa
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MD	mediodorsal
MOp	àrea motora primària
MOs	àrea motora secundària
NA	noradrenalina
NAc	nucli accumbens
NIB	<i>non-inactivating burst</i>
NMDA	N-metil-D-aspartat
No-FS	<i>no-fast-spiking</i>
NPY	neuropèptid Y
NR	nuclis del rafe
NRD	nuclis del rafe dorsal
NRI	<i>noradrenalin reuptake inhibitor</i>
NRM	nuclis del rafe medial
NRT	nucli reticular
OMS	Organització Mundial de la Salut
PCPA	para-cloro-fenilalanina
PET	<i>positron-emission tomography</i>
PKC	<i>protein-kinase C</i>
PL	prelímica

PLC β	<i>phospholipase Cβ</i>
PV	parvalbúmina
REM	<i>rapid eye movement</i>
RS	<i>regular spiking</i>
S ₁	àrea somatosensorial primària
S ₂	àrea somatosensorial secundària
siRNA	<i>small interference RNA</i>
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>
SNRI	<i>serotonina and noradrenalin reuptake inhibitor</i>
SS	somatostatina
SSRI	<i>selective serotonin reuptake inhibitor</i>
SWS	<i>slow wave sleep</i>
TC	talamocortical
TEC	teràpia electroconvulsiva
TPA	tren de potencials d'acció
VIP	polipèptid intestinal vasoactiu
WAY 100635	N-[2-[4-(2-metoxifenil)-1-piperazinil]etil]-N-(2-piridil)ciclohexancarboxamida
WM	<i>working memory</i>
YLDs	<i>years lived with disability</i>

Introducció general

Un percentatge important de la població mundial està afectada per malalties psiquiàtriques però la línia que posa el límit entre normalitat i malaltia, en aquests casos no està massa ben definida. Si el comportament es definís com una funció normal, com podríem definir on posem els nostres límits de confiança per a delimitar el comportament patològic? El criteri acceptat actualment per la major part dels experts en l'àrea és que si aquell comportament dificulta el correcte funcionament de la persona, si dificulta la seva vida diària hauria de ser considerat patològic. Però altra vegada, tot i l'existència de criteris acordats, en el cas de les malalties/anormalitats psiquiàtriques, aquests criteris -almenys fins al moment- sempre han estat subjectius.

Un tret comú de moltes malalties psiquiàtriques és que provoquen, a banda dels símptomes diferencials de la malaltia, alteracions en un domini del funcionament cerebral que engloba les anomenades funcions cerebrals superiors: la cognició. Es poden trobar diferents definicions de cognició segons l'especialista a qui es faci la pregunta: neuròleg, psicòleg, neurocientífic filòsof o enginyer en intel·ligència artificial. En aquest precís moment, estàs duent a terme diferents tasques cognitives. A partir d'un grup de línies i caràcters, has reconegut per crear paraules. Has consultat a la teva memòria i els teus coneixements sobre llenguatge el significat d'aquestes paraules. Fins i tot has pogut fer alguna tasca de decisió mentre decidies si continuar llegint o no aquest capítol. Així, el terme cognició (del llatí *cognoscere*, conèixer) inclou un ampli espectre de conceptes com són la percepció, la memòria, l'aprenentatge, la presa de decisions o la resolució de problemes.

En un principi es creia que la cognició estava lligada tan sols als humans, però a poc a poc s'ha anat veient que animals que no s'havien considerat dins del grup d'éssers vius superiors s'hi havien d'incloure. Així, la cognició ha deixat de ser una característica solament humana i ha passat a ser una característica més però no la que ens defineix. Tot i que no pot ser considerat un tret únic, sí que és un tret quantitativament diferencial de l'espècie humana i la seva alteració en malalties psiquiàtriques pot afectar de manera important la vida diària de la persona.

Com podem tractar aquestes alteracions? Quins mecanismes tenim per tal d'evitar-les? El principal problema en el tractament de les malalties psiquiàtriques és que hi pot haver diferents hipòtesis per explicar-les, però la causa real de l'alteració en la majoria dels casos no es coneix. Un altre dels problemes, força derivat de l'anterior, és que tot i els intents de

classificacions, les diferents malalties continuen sent calaixos de sastre amb subtipus ben diferents d'alteracions que es tracten de manera similar. Això fa que la farmacologia no sigui ni de bon tros l'opció perfecta, però de moment és una de les millors opcions que tenim pel tractament de malalties psiquiàtriques. Un dels reptes importants en el camp de la farmacologia serà el d'intentar personalitzar els tractaments, però per això caldrà tant entendre l'origen de les malalties (gens de vulnerabilitat, circuit implicats, etc.) com entendre els mecanismes d'acció dels fàrmacs utilitzats.

En aquesta tesi ens hem centrat en l'estudi del receptor 5-HT_{1A} , un dels receptors de neurotransmissors més estudiat des del seu descobriment, en el mecanisme d'acció de psicofàrmacs. Per situar aquest receptor en el camp de la psicofarmacologia la tesi consta primerament d'una introducció sobre l'àrea cerebral implicada en les funcions cerebrals superiors -l'escorça prefrontal-, com aquesta àrea és regulada pels sistemes moduladors i quin paper té el receptor 5-HT_{1A} en les funcions cerebrals superiors. Seguidament es descriuen diferents situacions alterades (esquizofrènia, depressió i dolor), com aquestes situacions són tractades i quin paper hi juga el receptor 5-HT_{1A} .

La tesi pretén esclarir una mica més els possibles mecanismes d'acció de diferents psicofàrmacs per tal d'aportar noves idees per al tractament de l'esquizofrènia, la depressió i el dolor.

L'escorça prefrontal

L'escorça prefrontal (EPF) és la part del lòbul frontal del cervell que es troba situada rostralment respecte l'àrea motora i premotora, amb connexions recíproques denses amb el nucli mediodorsal del tàlem (MD).

Com a àrea nodal d'interconnexions, l'activitat fonamental d'aquesta àrea és l'orquestració de les funcions cerebrals superiors [1].

DEFINICIÓ

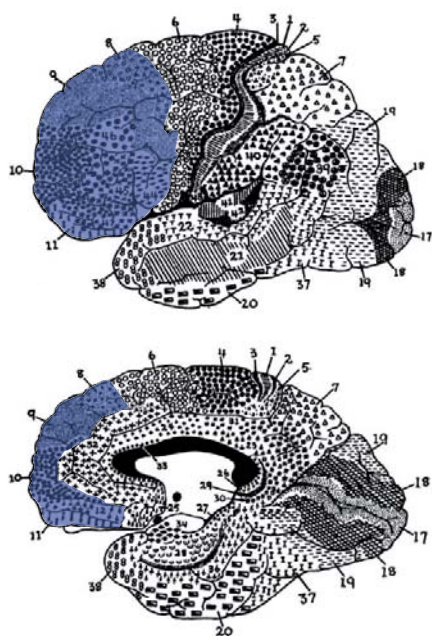


Fig. 1. Mapa citoarquitectònic de l'escorça cerebral segons Brodmann [2]. La zona destacada correspon a l'EPF: BA 8-13 i 44-47. Modificat de Pandya [852].

En un principi, després dels estudis citoarquitectònics de Brodmann [2] (Fig. 1), s'anomenà a l'escorça prefrontal (EPF) escorça granular frontal: l'escorça de primats amb capa IV granular situada frontalment a les àrees motores agranulars. La principal raó per utilitzar aquest criteri és que es creia que l'EPF era única de primats i, en aquest tàxon, l'EPF és granular. Però un criteri citoarquitectònic fa difícil la comparació d'àrees homòlogues entre espècies degut a la gran variabilitat que existeix, tant intraespècie com interespècie [3].

Rose i Woolsey [4] mostraren que tots els mamífers tenien un nucli medio-dorsal al tàlem (MD) que únicament projectava a una regió del lòbul frontal la qual podia ser considerada l'EPF. Això permeté utilitzar aquest criteri per definir les homologies entre espècies de mamífers, evitant les limitacions del criteri citoarquitectònic.

Aquesta definició basada en un criteri connectivista encara és vigent, però amb matisos. Estudis en diferents espècies han mostrat que les projeccions del MD no estan restringides només a l'EPF [5-10] i que altres nuclis talàmics també projecten a l'EPF [7, 11-14]. Degut a aquestes consideracions, la definició actual matisa que es pot considerar EPF l'àrea frontal amb la connexió recíproca *més densa* amb el MD quan es compara amb els altres nuclis

talàmics [15]. Tot i això, el caràcter quantitatiu del criteri a vegades fa difícil arribar a una conclusió indiscutible en la discussió d'homologies entre espècies [14].

FUNCIÓ

Estudis en rates, monos i humans estan d'acord amb la idea que l'EPF contribueix a aquells processos de control cognitiu que són necessaris per una òptima planificació de seqüències comportamentals complexes, incloent la selecció de l'atenció i resistència a interferència, la inhibició comportamental, els canvis de tasca, la planificació i la presa de decisions. L'EPF és important quan el processament *top-down* és necessari, és a dir, en les situacions en les quals el comportament ha de ser guiat per estats interns o intencions i quan la interacció entre l'estímul sensorial, el pensament i l'acció no tenen una relació directa ni ben establerta. Així, l'EPF necessita integrar informació tant d'una experiència prèvia com de la situació del moment, planificar i organitzar en el temps, dirigir l'atenció i inhibir aquells estímuls que siguin irrelevants per poder guiar els criteris d'acció [1].

Per tal de dur a terme aquesta organització temporal del comportament, l'EPF està implicada en el manteniment *on line* de representacions memorístiques, l'anomenada memòria de treball (*working memory*, WM), necessària per la mediació de l'acció en el temps. A diferència d'altres àrees corticals, les neurones de l'EPF resten actives durant el retard entre una pista i l'execució relacionada sense que els afecti la presència d'interferències o distraccions [16], mantenint la informació rellevant per la tasca. En relació amb aquest fet, estudis de lesions de l'EPF provoquen alteracions en la selecció d'accions a executar i l'ordre temporal d'aquestes accions en humans, monos i rosegadors [17-22].

Altres estudis de lesions de l'EPF en rosegadors o humans han mostrat que aquestes provoquen un augment de les conductes perseverants. Per tant, l'EPF seria necessària per al canvi de pautes d'acció [23, 24]. Per altra banda lesions de l'EPFm de rosegadors [23] o de l'EPF-DL d'humans [25-27] generen també dèficits d'atenció.

SUBDIVISIONS FUNCIONALS

Tot i que a mesura que baixem en l'escala evolutiva els mamífers tenen àrees corticals menys diferenciades, menys específiques i menys segregades [15], la topografia i el patró de connectivitat de l'EPF de rates és prou comparable amb el de monos [14, 28] i es poden establir paral·lelismes entre les dues espècies. Tant l'EPF de mono com la de rata són àrees d'associació multimodal entre regions cerebrals [29-31].

Primats

L'EPF de primats es subdivideix en dues regions principals segons criteris funcionals, de citoarquitectura i connectivitat:

- L'EPF dorsolateral (DL) (BA₄₆ i la zona ventral de BA₉). Està considerada com la part més cognitiva de l'EPF. Rep indirectament eferències de pràcticament totes les modalitats sensorials, així com d'àrees premotora i orbital [32]. Per tant recull informació somatosensorial al més alt nivell d'integració. Té fortes connexions amb estructures motores no primàries, així com del cerebel i el coliculus superior. Aquesta organització anatòmica reflexa la importància de l'EPF DL en el control de processos cognitius i en la guia de tasques comportamentals complexes.
- L'EPF orbitomedial (OM) comprèn les regions orbital o orbitofrontal, situades en la zona ventral (BA _{11,12}) i la regió medial, que inclou l'EPF medial (BA₃₂) i la regió cingulada anterior (BA ₂₄ i ₂₅). Aquesta àrea està més relacionada amb processos socio-emocionals, fet que es reflexa en el patró de forta connexió amb estructures límbiques [32].

Rata

L'EPF de rata està subdividida en dues zones generals (Fig. 2):

- Orbitofrontal (EOF). Inclou les regions orbitals ventral i lateral i l'àrea insular agranular.
- Medial (EPFm). Al seu torn es divideix en:
 - Cingulada anterior dorsal (ACAd). Involucrada en la generació de normes associades amb l'ordre temporal i la seqüenciació motora del comportament [14]. Hi ha controvèrsia però en la seva inclusió en l'EPF [32].
 - Prelímbica (PL). S'ha relacionat amb funcions d'atenció i selecció de resposta així com de WM. Aquesta regió es podria considerar com una versió primitiva homòloga a l'EPF-DL de primats [15, 20, 33, 34].
 - Infralímbica (ILA). Relacionada amb el control de l'activitat autònoma/visceromotora [35-37] i en la modulació de comportaments relacionats amb la por [38, 39].
 - Àrea motora secundària (MOs). Resta en discussió la seva inclusió en l'EPF [14, 40].

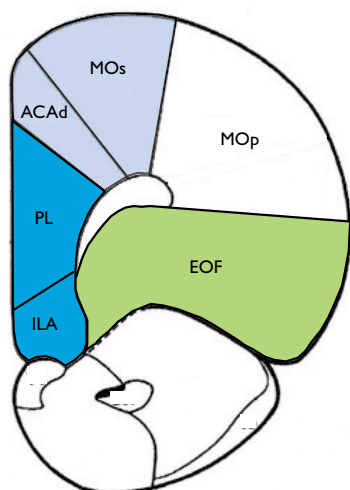


Fig. 2. Diagrama il·lustratiu de l'EPF de rata. En blau l'EPFm (més clares les regions en discussió), en verd l'EOF. MOP: escorça motora primària. Modificat de Kolb [853].

CONNECTIVITAT

L'EPF forma part de gran nombre de circuits cerebrals, els quals li donen les característiques idònies per dur a terme les funcions superiors on participa. Un dels trets principals de la connectivitat de l'EPF és que pràcticament totes les connexions que forma són recíproques.

Connectivitat amb el tàlem

Ja hem vist la importància de les connexions amb el MD, criteri per definir-la. Altres nuclis talàmics connectats amb l'EPF són els nuclis de la línia mitja, que projecten preferentment a les regions ventrals de la paret medial de l'EPF i semblen estar implicats en funcions viscerals, i els nuclis intralaminars, que envien aferències a àrees més dorsals de l'EPFm i estan relacionats amb processos d'atenció [41].

Connectivitat cortico-cortical

La majoria d'axons que arriben a l'EPF són aferències corticals, majoritàriament ipsilaterals [31]. Les connexions cortico-corticals d'EPF de rata reflecteixen l'especialització funcional de les diferents subdivisions. A grans trets, MOs i ACAAd projecten recíprocament a àrees neocorticals sensorimotors i d'associació, així com l'escorça visual i perirrhinal, mentre que PL i ILA tenen interconnexió amb escorces d'associació límbica temporal, insular agranular i formació hipocampal [42-44].

Connectivitat subcortical

A nivell subcortical, l'EPF de rata està connectada recíprocament amb el tàlem, els nuclis aminèrgics del mesencèfal (Nuclis del Rafe, NR; Locus Coeruleus, LC; Àrea Tegmental Ventral, ÀTV), l'hipotàlem lateral i el sistema límbic. La projecció a les estructures motores dels ganglis basals no és directament recíproca sinó a través del tàlem [15, 45-47]. Les estructures límbiques com l'amígdala, el sèptum i l'hipotàlem reben projeccions majoritàriament a través d'àrees ventrals de l'EPF. Per altra banda, els nuclis monoaminèrgics del tronc de l'encèfal reben projeccions principalment de l'EPFm de rates i l'EPF DL de primats [32, 45, 48, 49].

ARQUITECTURA

En primats, l'EPF és una isocorça¹, clarament laminada. Anomenades des de la superfície exterior a la substància blanca trobem les capes [50]: I/Molecular, II/ Granular externa, III/ Piramidal externa, IV/ Granular interna, V/ Piramidal interna, VI/ Polimòrfica.

La capa II connecta àrees corticals del mateix hemisferi. La capa III connecta amb l'hemisferi oposat o amb escorces d'associació del mateix hemisferi. En escorces de 5 capes, la majoria de connexions talàmiques són a aquesta capa, mentre que en escorces de sis capes són a la capa IV. Les capes V i VI representen les principals sortides d'informació de l'escorça.

L'EPFm de rata també conté aquesta estructura laminar, però l'estratificació cortical està menys diferenciada, distingint-se només 4 capes: I, II/III, V i VI [51].

TIPUS DE NEURONES CORTICALS

L'EPF està constituïda per dos grans grups de neurones: les neurones espinoses i les neurones no espinoses. Les neurones espinoses inclouen la població de neurones piramidals i neurones estrellades que formen sinapsis asimètriques excitatòries (glutamatèrgiques). Les neurones no espinoses inclouen la població de neurones que formen sinapsis simètriques inhibidores (GABAèrgiques).

Neurones piramidals

Suposen un 80% de la població neuronal cortical i són neurones de projecció que integren i transfereixen la informació a altres àrees cerebrals. Són neurones multipolars amb soma en forma piramidal o ovoide, amb una única dendrita apical molt ramificada que s'estén a capes superficials (característica que permet la integració d'informació de diverses capes corticals), múltiples dendrites basals i un únic axó descendent que transmet la informació a àrees de projecció corticals o subcorticals [10, 42, 52, 53].

Classificació electrofisiològica

Les propietats electrofisiològiques intrínseques de cada neurona defineixen els patrons de descàrrega concrets i, per tant, la capacitat per integrar entrades i sortides d'informació. Segons la resposta a polsos de corrent i els seus patrons de descàrrega *in vitro* [54-57] o *in vivo* en rata anestesiada [58] s'ha definit diferents tipus de neurones piramidals (Fig. 3a):

¹La part més gran de l'escorça cerebral, on es distingeixen les neurones organitzades en sis capes. També anomenada escorça homotípica, neocòrtex, neopallium.

- Neurons de descàrrega regular (*regular spiking*, RS). Constitueixen la major població dins de les neurones piramidals. Mostren una descàrrega sostinguda amb un patró regular. Poden mostrar adaptació² lenta o ràpida davant d'una despolarització mantinguda.
- Neurons que descarreguen en trens de potencials d'acció (TPA) i que no presenten inactivació (*non-inactivating burst*, NIB). Presenten una descàrrega en trens/agregats de potencials d'acció amb una amplitud del potencial d'acció constant.
- Neurons que descarreguen en TPA i que presenten una inactivació del potencial d'acció dins del tren (*inactivating burst*, IB). La població amb menor representació. Presenten TPA on els potencials d'acció van disminuint l'amplitud i augmentant la durada (inactivació).

Més recentment [59] també s'ha descrit neurones que descarreguen en TPA d'alta freqüència (300-600 Hz) que es repeteixen seguint ritmes ràpids (30-50 Hz) (*fast rhythmic bursting*, FRB).

En les condicions en què es van fer els primers estudis de caracterització electrofisiològica, les propietats de les diferents classes de neurones semblaven inflexibles, però actualment estudis de registres intracel·lulars en animals no anestesiats han mostrat que una neurona pot passar d'un tipus de descàrrega a un altre canviant lleugerament el seu potencial de membrana, que alhora depèn dels senyals que rep i dels diferents estats de vigília [60, 61]. Així una mateixa neurona pot mostrar diferents patrons de descàrrega que anteriorment s'adjudicaven a tipus neuronals diferents (Fig. 3). Les diferents proporcions de tipus electrofisiològics en animals en comportament, anestesiats i *in vitro* podria explicar els rols de les diferents classes un diferents estats funcionals del cervell [62].

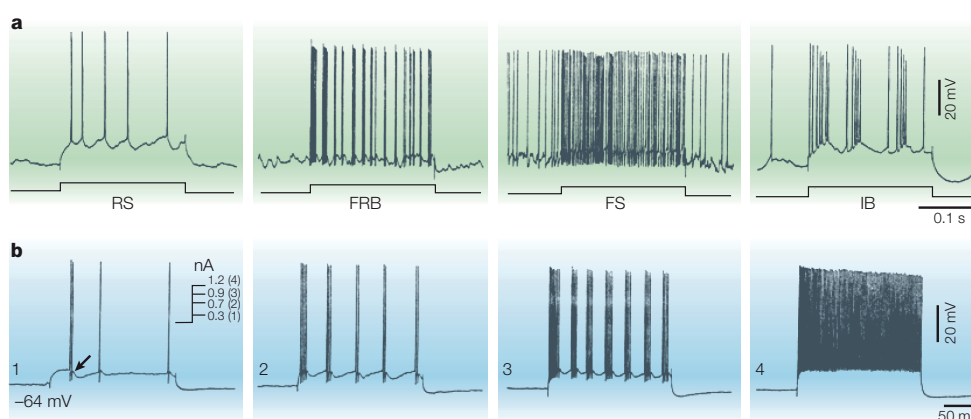


Fig. 3. a) Neurons amb diferents patrons de descàrrega: RS, descàrrega regular; FRB, neurones amb trens ràpids i rítmics; FS, descàrrega ràpida; IB, trens amb inactivació. **b)** Neurona cortical de l'àrea d'associació 7 de gat anestesiats. Els diferents polsos de corrent despolaritzant (indicats entre 1 i 2) canvien els patrons de descàrrega de la neurona. Modificat de Steriade [62].

² Interrupció de la descàrrega de potencials encara que la despolarització sigui constant i per sobre del llindar.

Interneurons GABAèrgiques

Les interneurons GABAèrgiques representen al voltant d'un 15-20% de la població neuronal cortical [63]. Els manquen gairebé per complet les espines dendrítiques i es troben repartides al llarg de totes les capes corticals. Aquest tipus neuronal mostra una gran diversitat morfològica, bioquímica, fisiològica i funcional [64-73].

Classificació morfològica

Santiago Ramón y Cajal va ser el primer en descriure diferents subtipus de neurones GABAèrgiques d'escorça cerebral i hipocamp [74]. Entre les diferents morfologies neuronals (Fig. 4), cal destacar:

- Neurones en cistell (*basket cells*). Formen el cistell de plexes de terminals axònics que envolten els cossos de les neurones piramidals.

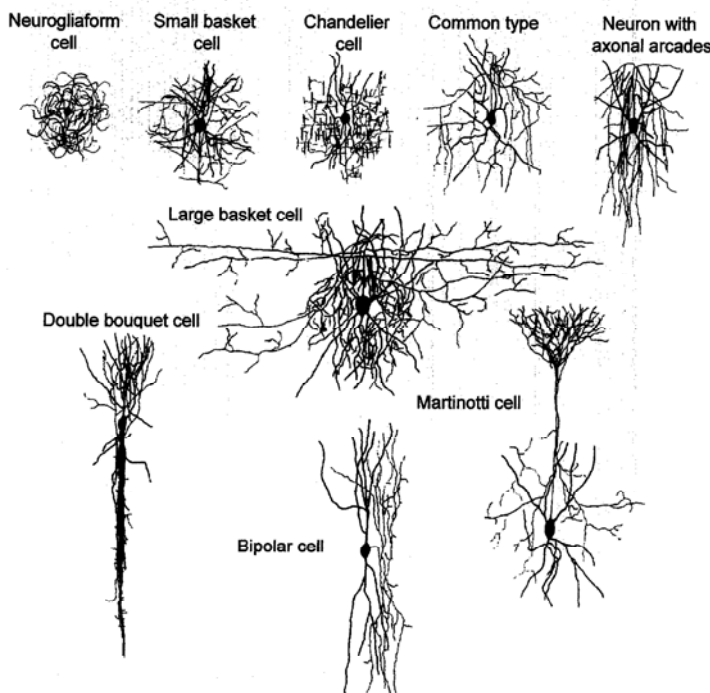


Fig. 4. Dibuixos de diferents tipus morfològics d'interneurons de capes II-VI. Modificat de DeFelipe [71].

- Neurones en canelobre (*chandelier cells*). Les úniques que realment es distingeixen per un patró de ramificació de l'axó clar, en aquest cas, en forma de terminals formant files curtes verticals de botons semblants a canelobres. Són comuns en una gran varietat d'àrees corticals i espècies [75, 76], per això podrien ser considerades elements bàsics dels circuits corticals.

- Neurones en doble ram (*double bouquet cells*). Són neurones multipolars o bipolars amb arboritzacions axòniques disposades en orientació vertical que formen paquets molt interconnectats de col·laterals verticals descendents.

Classificació neuroquímica

Les interneurons GABAèrgiques d'escorça es poden classificar pel seu contingut en neuropèptids, substàncies neurotransmissores que s'alliberen juntament amb el GABA (àcid

γ -amino-butíric): colecistoquinina (CCK), somatostatina (SS), polipèptid intestinal vasoactiu (VIP) i neuropèptid Y (NPY) [77].

A més, també es poden classificar pel seu contingut en proteïnes d'unió a calci: parvalbúmina (PV), calretinina (CR), calbindina (CB) [71, 78]. Les neurones en canelobre i la majoria de les neurones en cistell expressen PV. Les neurones en doble ram són pràcticament les úniques que expressen CB (tot i que també poden contenir CR).

Classificació electrofisiològica

Segons les característiques electrofisiològiques, podem distingir neurones de descàrrega ràpida (*fast-spiking*, FS) i no-FS [56, 78, 79]. També s'han observat cèl·lules en cistell que descarreguen en TPA ràpids i rítmics (FRB). Igual que les neurones piramidals, s'han descrit situacions de canvi d'un patró de descàrrega a un altre segons l'estat neuronal [62].

S'hipotetitzava que les neurones FS descarreguen potencials d'acció molt curts i mantenen freqüències de descàrrega molt altes (40-150 Hz) de manera tònica i sense adaptació gràcies a canals de K⁺ que contenen proteïnes Kv3.1-Kv3.2 [80, 81]. Anticossos contra el major producte gènic de Kv3.1 marquen específicament les cèl·lules PV+ [82].

Altres tipus neuronals

La neocorça conté també una capa d'interneurones excitatòries, localitzades principalment a capa IV. Són neurones espinoses estrellades amb un plexe de dendrites estelat que utilitzen glutamat com a neurotransmissor i formen sinapsis amb neurones properes al seu cos cel·lular. Actuen com a receptors primaris de la informació sensorial que rep el neocòrtex del tàlem. Han estat descrites principalment a escorces sensorials però també són presents a EPF [83].

Relació entre diferents tipus de neurones corticals

Tots els tipus d'interneurones GABAèrgiques estudiades formen sinapsis tant amb piramidals com amb GABAèrgiques [per revisió: 69]. Un principi bàsic de l'organització dels microcircuitos corticals és que diferents subtipus d'interneurones innerven preferentment diferents segments de l'arbre dendrític piramidal [69] (Fig. 5).

Les interneurones que formen sinapsis a la regió perisomàtica de la piramidal (axosomàtiques i axo-axòniques) exerceixen un control important sobre la descàrrega d'aquestes neurones. Les neurones en cistell fan sinapsi al soma i les dendrites proximals de les neurones piramidals, exercint un important control del potencial de membrana i, per tant, en la descàrrega de la neurona piramidal. Les neurones en canelobre tenen ramificacions axonals

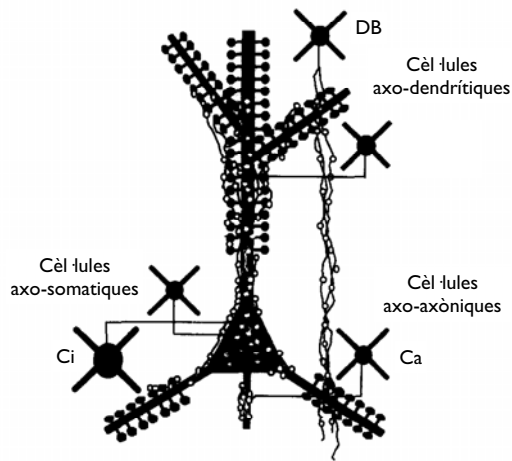


Fig. 5. Representació dels diferents tipus d'interneurones GABAèrgics segons els contactes amb la neurona piramidal. DB, *double bouquet*; Ci, cèl·lules en cistell; Ca, cèl·lules en canelobre, fins ara les úniques descrites com a axo-axòniques. Modificat de DeFelipe [71].

que formen un gran nombre de sinapsis axo-axòniques amb el segment inicial del con axonal de les neurones piramidals [84], àrea on s'integra la informació per donar lloc al potencial d'acció de la piramidal. D'aquesta manera, tenen un paper clau en la modulació de la sortida d'informació de la piramidal, podent produir un efecte de curtcircuit en la propagació del potencial d'acció.

A més, les interneurons també poden estar acoblades per sinapsis elèctriques (bidireccionals) a través d'unions tipus *gap* (*gap junctions*) [70, 85-92]. Al principi es creia que l'acoblament per unions *gap* es donava només entre cèl·lules de la mateixa classe, però hi ha estudis que demostren *gap junctions* entre diferents tipus d'interneurones [93-95]. Les connexions *gap* poden arribar a produir-se a més de 100 micròmetres del cos neuronal [96] i podrien contribuir a la sincronització de l'activitat elèctrica cortical a través de la formació de xarxes [91].

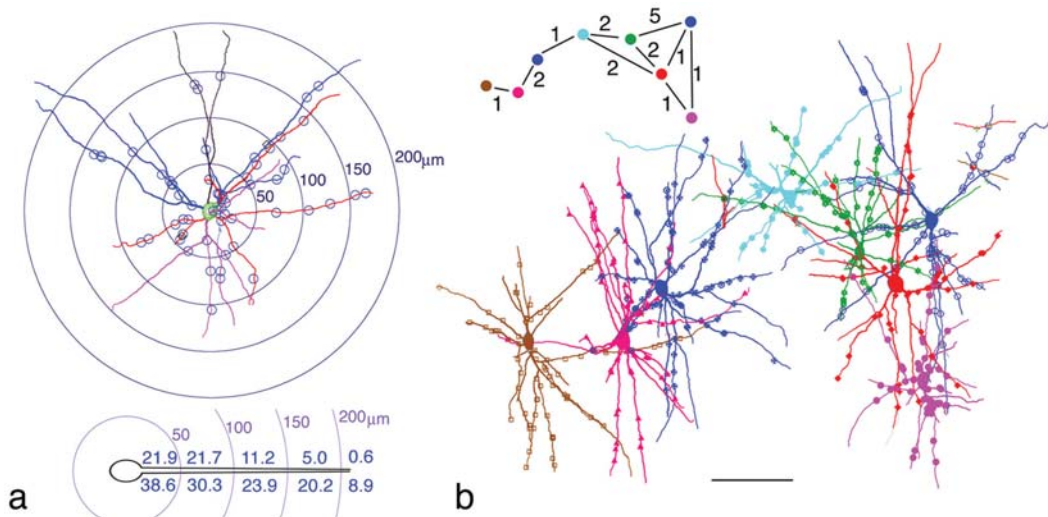


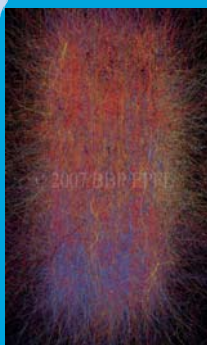
Fig. 6. a) Reconeixement d'una neurona PV+ de l'àrea 18 de gat. Els cercles de les dendrites indiquen immunoreactivitat per connexina 36. La part inferior mostra la distribució d'unions *gap*. Fila superior: mitjana de connexions en segments individuals (9 cèl·lules). Fila inferior: densitat de llocs de contacte per unitat de llargada (1mm). **b)** Reconeixement de xarxa dendrítica de cèl·lules PV+ unides per connexions *gap*. Barra d'escala, 100 μm. Modificat de Fukuda [96].

UNITAT FUNCIONAL

Les primeres idees respecte a divisions funcionals de l'escorça postulaven que les funcions cognitives es localitzaven en zones diferenciades de l'escorça. Es basaven en el fet que l'escorça està dividida en regions microscòpicament diferenciades, cadascuna amb diferents connexions, a més de les evidències que aportaven els estudis de lesions [97].

Per altra banda, sorgí una visió més holística de la funcionalitat cortical, aquella que proposa que les funcions cognitives estan basades en sistemes corticals àmpliament distribuïts de neurones interconnectades. Aquesta idea evolucionà cap al model connectivista: la proposta d'una xarxa cortical i els mapes de connexions/sistemes de connexions *network-like*, en els quals l'associació esdevé l'essència de la percepció, la memòria i les sensacions [97].

Es considera que la unitat funcional dels circuits és la columna cortical, base de la hipòtesi columnar cortical de Mountcastle [98]. La hipòtesi considera el neocòrtex com un conjunt d'unitats funcionals amb forma de mini columnes que creuen totes les capes corticals perpendicularment a la superfície i que contenen un conjunt de neurones interconnectades. El microcircuit bàsic, present en totes les àrees corticals i espècies examinades [99], estaria format per una neurona piramidal i les seves connexions d'entrada i sortida tant locals com externes. La sortida principal del circuit és a través de l'axó de les neurones piramidals, que al seu torn està influït per les cèl·lules GABAèrgiques que realitzen contactes axo-axònics específics dels circuits corticals.



El Blue Brain Project és el primer intent de fer enginyeria reversa del cervell de mamífers per tal d'entendre la funció cortical i els desordres cerebrals. Després d'una dissecció sistemàtica de la microanatomia, la genètica i l'electrofisiologia de la columna cortical, es construí el primer model computacional de la unitat bàsica cortical: la recreació a nivell cel·lular d'una columna neocortical (figura esquerra). Ara les simulacions computacionals proporcionaran medis per testar hipòtesis utilitzant models predictius de processos biològics complexos. L'últim objectiu del projecte seria permetre el modelatge, la simulació i l'experimentació de tot el cervell.

A banda de les interaccions dins dels microcircuit, el model connectivista de funció cortical fa èmfasi en les connexions intercolumnars que permeten l'establiment de xarxes paral·leles de processament coordinant l'activitat de diferents circuits [69, 97, 100, 101].

La visió actual de funcionament cortical considera tant les propietats cel·lulars individuals com les com les propietats emergents del circuit resultat de la interacció dels seus elements,

arribant a un compromís entre la segregació funcional i la integració global, trets característics d'un sistema complex [102].

ACTIVITAT CORTICAL

Un tret característic de la dinàmica cortical és la presència d'una activitat oscil·latòria en diferents ritmes, part essencial del processament cerebral i relacionada amb els estats de son/vigília i les tasques cerebrals [103]. Alteracions d'aquesta activitat oscil·latòria s'associen amb trastorns neuropsiquiàtrics com l'esquizofrènia [104-107], la depressió [108], l'Alzheimer [109-111], quadres epilèptics, etc. [112, 113], suggerint que una activitat oscil·latòria anormal seria la característica comú en patologies que impliquen alteracions cognitives.

Els mecanismes de generació d'oscil·lacions corticals impliquen un balanç homeostàtic entre excitacions i inhibicions en la xarxa que depèn alhora de les propietats intrínseques individuals dels seus elements. Alguns dels principals tipus neuronals i xarxes implicades en les oscil·lacions cerebrals són: i) les neurones corticotalàmiques, ii) el circuit inhibitori recurrent entre neurones reticulars (NRT) i talamocorticals (TC) i iii) les projeccions neuromodulatòries que arriben al tàlem [114].

Les oscil·lacions es podrien dividir en dos grans grups: els modes de processament global, que englobarien els ritmes de menor freqüència i que servirien per la integració entre diferents àrees corticals i els modes locals, que engloben els ritmes de més altes freqüències i estarien distribuïdes en àrees molt més limitades [115, 116].

Tradicionalment s'ha separat els diferents ritmes corticals segons la freqüència de les seves oscil·lacions i s'ha intentat associar funcions concretes a cada ritme. Actualment però, la tendència és pensar que els diferents ritmes interaccionen entre ells i d'aquesta interacció en resulta la funció [114].

Durant el son d'ones lentes (SWS, *Slow Wave Sleep*) hi ha tres ritmes característics: fusos/*spindles* (12-15 Hz), delta (1-4 Hz) i oscil·lacions lentes (<1 Hz). Durant els estats de vigília i el son REM (*Rapid Eye Movement*) els ritmes característics són theta (6-10Hz), beta (20-30Hz) i gamma (30-60Hz)[114, 117].

L'**oscil·lació lenta** observada durant el son o sota els efectes de l'anestèsia [118, 119] s'ha registrat tant en neurones piramidals com GABAèrgiques [120] i està format per una fase despolaritzant perllongada (*up*) seguida d'una fase d'hiperpolarització (*down*) [118]. Recentment s'ha proposat que l'oscil·lació lenta és resultat de la interacció d'oscil·ladors corticals, TC i NRT [121]. Tot i que cadascun d'aquests oscil·ladors és capaç de produir la seva

pròpia oscil·lació lenta, la total manifestació de l'oscil·lació a nivell d'electroencefalograma (EEG) requeriria la interacció dels tres oscil·ladors [121].

La importància d'aquestes oscil·lacions lentes resta en el fet que agrupen altres ritmes cerebrals tant d'alta com de baixes freqüències, organitzant-los en seqüències d'ones complexes [114, 117]. Juguen un rol important en el processat de la informació cortical, l'organització temporal de l'escorça i el manteniment de funcions cerebrals d'alt nivell en les que es requereix generalment la participació d'una activitat cerebral conjunta entre àrees. A més, les oscil·lacions lentes i les *spindles*, participarien en fenòmens de facilitació sinàptica, contribuint en processos de memòria i aprenentatge [122-128].

Hi ha dos components de les **ones delta**, el cortical, que sobreviu a la talemectomia [129, 130], i el talàmic generat a partir de corrents intrínseques de les neurones TC [131-133]. S'ha relacionat les ones delta amb presa de decisions i consolidació de memòria [112].

L'ona **theta** va ser estudiada primerament en hipocamp en relació amb la locomoció, l'orientació i comportaments voluntaris. Ara però, s'ha observat en elevat nombre d'àrees cerebrals, inclosa la neocorça i s'ha associat amb plasticitat sinàptica, codificació d'informació i memòria de treball, entre altres [per revisió: 134].

Els ritmes beta i gamma podrien englobar-se dins del nom de **ritmes ràpids** ja que les neurones passen de beta a gamma en períodes molt curts de temps amb una lleugera despolarització [135]. A més, totes dues oscil·lacions han estat associades amb tasques de memòria [136-140]. Els ritmes gamma proporcionen també una estructura temporal per les tasques d'atenció i processament sensorial [141-143]. Es creu que les oscil·lacions gamma són generades localment a l'escorça [135, 144] possiblement per xarxes de neurones FS PV+ [per revisió: 145, 146, 147] o cèl·lules FRB [59].

Interacció recíproca entre l'EPF i els sistemes moduladors ascendents

L'EPF rep projeccions dels nuclis monoaminèrgics del mesencèfal i dels nuclis acetilcolinèrgics (ambdós considerats sistemes moduladors) i alhora és una de les poques àrees corticals que els regula tancant un bucle de relació recíproca. Els sistemes de neurotransmissors moduladors influeixen l'activitat/dinàmica cortical i modulen les funcions que du a terme l'EPF. Pel propòsit d'aquesta tesi, aquest capítol es centrarà en la descripció del paper del sistema serotoninèrgic.

SISTEMES MODULADORS ASCENDENTS

Els sistemes moduladors ascendents inclouen les projeccions NA, 5-HT, DA i colinèrgiques del nucli mesencefàlic i del prosencèfal basal. Tradicionalment els neuromoduladors s'han definit per: 1) organització reticular dels somes i àrees de projecció limitades topogràficament, 2) nombrosos col·laterals en les projeccions a àrees del prosencèfal, els quals multipliquen el nombre de cèl·lules diana per aquests sistemes, 3) evidència d'efectes distribuïts espacialment i relativament uniformes, 4) evidència d'efectes que canvien lentament o tònic en les neurones diana gràcies en part a la transmissió extrasinàptica (*volume transmission*)³ [148][però: 149, 150, 151].

Sistema serotoninèrgic

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) és una amina biogènica sintetitzada a partir del triptòfan, aminoàcid essencial que només es pot obtenir de la dieta. La hidroxilació del triptòfan per la triptòfan hidroxilasa és el pas limitant de la síntesi de serotonina (Fig. 7) [per a revisió: 152]. La serotonina alliberada activarà receptors específics, tant a nivell presinàptic com postsinàptic, per finalment ser recaptada per un transportador específic que es troba tant en terminals serotoninèrgics [153, 154] com en cèl·lules glials [155, 156]. Una vegada recaptada, la degradació de la serotonina s'inicia amb l'acció de la monoaminoxidasa (MAO,

³ Sistema de comunicació complementari a la transmissió sinàptica clàssica que no requereix connexions entre cèl·lules.

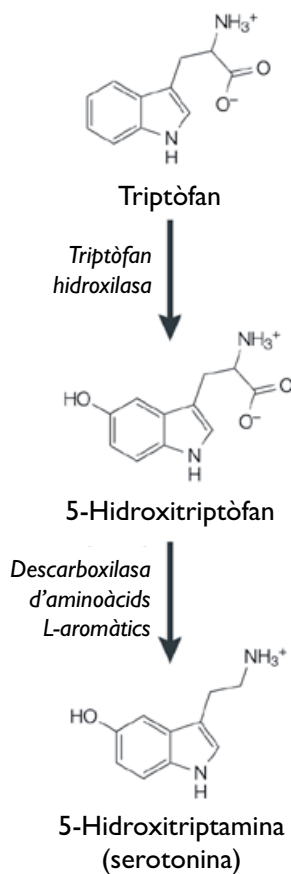


Fig. 7. Síntesi de serotonina a partir de triptòfan. Modificat de Goridis [850].

preferentment la MAO-A). L'àcid 5-hidroxi-indolacètic (5-HIAA) és el principal metabòlit de la serotonina al cervell.

Anatomia del sistema serotoninèrgic

El sistema serotoninèrgic està format per un conjunt de cèl·lules de morfologia diversa que s'agrupen envoltant la línia mitja del tronc de l'encèfal, principalment en els nuclis del rafe (NR). Els nuclis de neurones serotoninèrgiques s'anomenen del B1 al B9 [157], sent el B7 el NR dorsal (NRD) i el B8 el NR medial (NRM).

Cal destacar l'extensió i complexitat d'aquest sistema [158], que innerva la pràctica totalitat de l'encèfal.

Segons les eferències, els nuclis serotoninèrgics es divideixen en dos grups: un superior o rostral (B5-B9), que innerva el cervell anterior en les anomenades projeccions ascendents, i un segon grup inferior o caudal (B1-B4), on trobem un conjunt de neurones que projecten a la medul·la espinal en les anomenades projeccions descendents [159-163] (Fig. 8). A més, existeixen projeccions serotoninèrgiques cap als propis nuclis del rafe, on la serotonina regula la freqüència de descàrrega a través d'autoreceptors somatodendrítics [per a revisió: 164].

El NRD innerva l'escorça frontal, tempoparietal i piriforme; el tàlem i l'hipotàlem; la substància nigra; el nucli interpeduncular; els ganglis basals i el nucli accumbens. El NRM innerva les estructures medials del cervell anterior: sèptum, hipocamp i escorça cingulada [per a revisió: 164, 165].

L'activitat de les neurones serotoninèrgiques és regulada per nombroses aferències [164, 166, 167]. Cal destacar l'EPF [33, 45, 48, 168-171], l'habècula lateral [168, 172-174], les aferències adrenèrgiques [175-177] i dopaminèrgiques [172, 178-182].

A part de les neurones serotoninèrgiques, s'han descrit altres tipus cel·lulars minoritaris als nuclis del rafe, destacant les cèl·lules dopaminèrgiques [179, 183, 184], GABAèrgiques [185-187] i glutamatèrgiques [188, 189]. Tot i que al principi es va pensar que les úniques neurones de projecció dels nuclis del rafe eren serotoninèrgiques [165, 190], s'han descrit neurones de projecció que no ho són [191-193].

Taula 1. Resum de les principals característiques dels receptors de serotonina descrits actualment.

Receptor	Proteïna	Localització	Implicacions	Referències
5-HT _{1A}	G i/o	Rafe i estructures límbiques	Autoreceptor i receptor postsinàptic	Referir-se al capítol destinat a aquest receptor
5-HT _{1B}	G i/o	Substància nigra, Globus pàl·lid, Pàl·lid ventral, Nucli entopeduncular, Estriat	Autoreceptor i heteroreceptor a terminals axònics	[209, 210, 778, 779]
5-HT _{1D}	G i/o	Substància nigra, Globus pàl·lid, Caudat, Escorça, Hipocamp, Rafe	Inhibició alliberació de 5-HT	[780, 781]
5-HT _{1E}	G i/o	Àrees corticals, Caudat-Putamen, amígdala i hipocamp	Postsinàptic	[780, 782]
5-HT _{1F}	G i/o		Visual, cognitiva. Autoreceptor. Migranya	[783-785]
5-HT _{2A}	G q	Neocortex, escorça piriforme i entorhinal, claustre, caudat, acumbens, tubercle olfatiu, hipocamp	Al·lucinacions, antipsicòtics, termoregulació, respostes neuroendocrines	[786-793]
5-HT _{2B}	G q	Cerebel, hipotàlem, septum lateral, amígdala	Morfogènesi embrionària, motigènesi, ansietat	[794-799]
5-HT _{2C}	G q	Plexes coroideus, escorça olfactiva, piriforme, cingulada i retrosplenial, sistema límbic, ganglis basals. Nuclis del rafe medial i dorsal (GABA _n)	Postsinàptic. Locomoció, fàgia, ansietat, funció erèctil, hipertèrmia. Antipsicòtics, antidepressius	[800-806]
5-HT ₃	Canal iònic per Na ⁺ , K ⁺ i Ca ²⁺	Nucli tracte solitari, àrea postrema, nucli motor dorsal del nervi vagus, hipocamp, amígdala, capes superficials d'escorça cerebral	Vòmit, agressivitat, ansietat, síndrome intestí irritable, alcoholisme, cognició, LTP	[807-816]
5-HT ₄	G s	Hipotàlem, nucli accumbens, amígdala, pàl·lid ventral, hipocamp, ganglis basals, tubercle olfatori	Memòria, locomoció, recompensa, ansietat, estrès, nocicepció	[834-840]
5-HT ₅	G i/o?	Habènula, escorça, hipocamp, bub olfatori, cerebel		[817-819]
5-HT ₆	G s	Tubercle olfatiu, estriat, acumbens, hipocamp, escorça cerebral	Modulació Ach: aprenentatge i memòria, antipsicòtics	[830-833]
5-HT ₇	G s	Tàlem, hipotàlem, escorça, hipocamp, amígdala, nucli supraquiasmàtic	Modulació aprenentatge i memòria, ansietat, esquizofrènia, ritmes circadians, termoregulació, son REM, depressió	[820-829]

Receptors serotoninèrgics presents a l'EPF

Les neurones piramidals d'EPF expressen una gran varietat de receptors serotoninèrgics. Entre ells els més abundants són els receptors 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} [210-217]. Els receptors 5-HT_{2A} es trobarien preferentment a la dendrita apical de les neurones piramidals [214, 217, 218]. Per una discussió de la situació del receptor 5-HT_{1A} veure capítol destinat a aquest receptor. Diferents estudis *in vitro* i *in vivo* suggereixen la colocalització dels receptors 5-

HT_{1A} (hiperpolaritzants) i 5-HT_{2A} (despolaritzants) en les mateixes neurones piramidals [219-221].

Les interneurons GABAèrgiques d'escorça expressen diferents tipus de receptors de 5-HT, en particular, 5-HT_{2A}, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C} i 5-HT₃ [213, 215, 222-225]. El receptor 5-HT_{1A} s'ha detectat tant en neurones CB+ com en PV+ [225]. El 5-HT_{2A} s'ha detectat en interneurons GABAèrgiques PV+ d'escorça de rata [213] i en neurones CB+ d'escorça de mono [215]. Sembla estar especialitzat en interneurons GABAèrgiques perisomàtiques que controlarien la inhibició de les dendrites proximals i del soma de la neurona piramidal [215]. Les interneurons que expressen el receptor 5-HT₃ corresponen a CCK i CB+ i CR+ [222], tipus d'interneurons que preferentment controlen les dendrites apicals de les neurones piramidals [215].

CONNECTIVITAT ENTRE SISTEMES MODULADORS I L'EPF

L'EPF de rates i primats controla les entrades dels sistemes colinèrgics i monoaminèrgics a la resta de l'escorça [15, 226, 227] ja que, tot i que la pràctica totalitat de la neocorça rep entrades d'aquests sistemes moduladors, només l'EPF envia projeccions recíproques al prosencèfal basal [42, 228-230], al LC [49, 231], als NRM i NRD [48] i a l'ÀTV i la pars compacta de la substància nigra [232, 233]. El control de l'escorça sobre aquests nuclis moduladors és especialment important perquè a través d'ells és capaç d'influenciar àmplies zones del cervell d'una forma coordinada.

Per altra banda, la projecció directa dels nuclis moduladors a l'EPF modula aquesta àrea. Les fibres NA del LC [234, 235], les DA de l'ÀTV (via mesocortical) [236] així com els nuclis colinèrgics del prosencèfal basal i el nucli tegmental laterodorsal [237] innerven l'EPF.

La innervació serotoninèrgica d'EPF prové majoritàriament del NRD, com s'ha demostrat per estudis anatòmics [165, 238] i funcionals [239, 240]. Les terminacions serotoninèrgiques es distribueixen per totes les capes corticals, tot i que hi ha una major densitat de fibres a capa V [241]

A més de les connexions amb l'EPF, els sistemes moduladors també tenen projeccions (moltes vegades recíproques) entre ells: NRD i LC [242], LC i BFCS (sistema colinèrgic del prosencèfal basal) [243, 244], NR i BFCS [245], ÀTV i nuclis colinèrgics (Nucli basal de Meynert, Substància innominata) [246, 247]. Cal fer especial menció de les interaccions neuroquímiques, electrofisiològiques i funcionals entre el sistema 5-HT i el DA [per revisió completa: 248].

INTERACCIÓ ENTRE SISTEMES MODULADORS I L'EPF

Modulació de la fisiologia cortical

Els efectes dels sistemes moduladors depenen dels subtipus de receptors expressats i del balanç d'activació de diferents receptors, així com del tipus neuronal on estan expressats.

La serotonina i els seus agonistes modulen l'excitabilitat de les neurones corticals i la seva freqüència de descàrrega [219, 249-253]. Estudis *in vivo* i *in vitro* suggereixen que els receptors 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A} exerceixen efectes oposats en l'excitabilitat i la descàrrega de les neurones piramidals d'EPF [219, 221, 251, 253]. L'activació dels receptors 5-HT_{1A} hiperpolaritza les neurones piramidals, mentre que la dels 5-HT_{2A} resulta en una despolarització, reducció de la hiperpolarització post-espiga (AHP) i augment dels EPSCs [219, 221, 250-252, 254]. A més, la serotonina també pot activar receptors excitatoris (5-HT₂ i 5-HT₃) en cèl·lules GABAèrgiques [215, 222] fent que augmentin les entrades GABAèrgiques a les cèl·lules piramidals [224, 250, 252, 255].

Recentment s'ha mostrat que la serotonina té un rol important en el tràfic i funció dels receptors NMDA de neurones piramidals d'EPF a través de receptors 5-HT_{1A} i 5-HT_{2A}. L'activació del receptor 5-HT_{1A} inhibeix les corrents NMDA i a través d'un mecanisme que controla l'estabilitat dels microtúbuls i impedeix l'ancoratge dels receptors NMDA a la membrana, mentre que el receptor 5-HT_{2A} contraresta aquest efecte [256, 257].

Els efectes dels altres sistemes moduladors també depenen del balanç de receptors activats i de la situació d'aquests receptors [258-260]. El cas de la dopamina ha estat àmpliament estudiat [261-264].

Aquests efectes a nivell cel·lular es veuen reflexats a nivell de les oscil·lacions corticals. Per exemple, l'estimulació de NRD augmenta la freqüència d'ones lentes a EPF, fent-les més irregulars, promovent els estats *up* i disminuint-ne la potència [265].

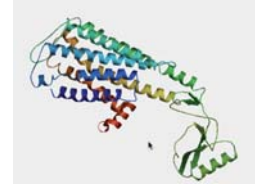
Modulació de les funcions corticals

Tots aquests efectes a nivell cel·lular i de dinàmica cortical es fan palès en la contribució dels sistemes moduladors (Ach, DA, NA, 5-HT) a les funcions prefrontals [per revisió: 266]. La flexibilitat comportamental [267], la consolidació de la memòria [268, 269], l'atenció i la impulsivitat [270-277] són exemples de funcions modulades per aquests sistemes. En molts casos aquesta modulació no segueix una funció lineal, sinó que hi ha nivells òptims de neurotransmissors en cada cas i l'excés o la manca són perjudicials.

Una de les funcions corticals que sembla estar fortament influenciada pels sistemes moduladors és la WM. Especialment hi ha evidència de modulació d'aquesta funció per la DA [278-288] i l'ACh [285, 289-291]. Williams [292] mostrà que la serotonina també estava implicada en la WM: l'aplicació d'antagonistes 5-HT_{2A} disminueix la freqüència de descàrrega de les neurones d'EPF durant el període intermedi entre la presentació de l'estímul i l'execució de la tasca. Per altra banda, una activació excessiva d'aquest receptor també sembla ser perjudicial, ja que agonistes d'aquest receptor com LSD o DOI són al·lucinògens.

La importància dels nivells òptims de moduladors prefrontals es fa palesa quan es té en compte l'elevat nombre d'hipòtesis sobre desordres psiquiàtrics que postulen que la funció prefrontal anormal és conseqüència d'una desregulació dels sistemes moduladors [293-296]. Per exemple, tot i els efectes contraproductius dels antagonistes 5-HT_{2A} descrits en WM [292], els antipsicòtics atípics són antagonistes d'aquest receptor i alguns milloren les disfuncions cognitives de l'esquizofrènia [297-299].

El receptor 5-HT_{1A}



DESCOBRIMENT, CLONATGE I DESCRIPCIÓ DEL GEN

El gen del receptor de serotonina 1A⁴ fou el primer que es va seqüenciar per complet i és el millor caracteritzat de la família de receptors 5-HT₁.

Tant el receptor 5-HT_{1A} d'humà [300, 301] com de rata [302, 303] i ratolí [304] foren identificats per cribratge de seqüències homòlogues a la del receptor β₂-adrenèrgic en llibreries genòmiques. Com el receptor β₂-adrenèrgic, aquest gen no contenia introns, sent un marc de lectura llarg ininterromput que codificava una possible proteïna amb tots els trets estructurals d'un receptor acoblat a proteïna G i s'identificà com el gen del receptor 5-HT_{1A}. El gen conté un lloc gt-ag que podria donar variants de la proteïna, però només hi ha un únic ARNm que codifica per una proteïna funcional, el receptor 5-HT_{1A} [305, 306].

DISTRIBUCIÓ ANATÒMICA DEL RECEPTOR AL SISTEMA NERVIÓS

Fora del cervell, el receptor 5-HT_{1A} es troba altament expressat en les capes superficials de l'asta dorsal de la medul·la espinal, especialment en el segment lumbar [307]. A més, també s'ha detectat la presència del missatger als ganglis cervicals superiors i ganglis simpàtics lumbar [308].

Al cervell, el receptor 5-HT_{1A} té fonamentalment una **localització anatòmica dual** (Fig. 9): a la pràctica totalitat de les neurones serotoninèrgiques dels nuclis del rafe [309] on actua com a autoreceptor somatodendrític [310], i postsinàpticament a àrees límbiques (formació hipocampal -especialment piramidals del CA₁ i granulars de gir dentat-, sèptum, EPF, escorça entorinal) i nucli interpeduncular [210, 211, 311].

Estudis d'hibridació *in situ* per l'ARNm del receptor [211, 302, 312-314], autoradiografia [210, 211, 315, 316] i neuroimatge [317-325] confirmen la correlació de l'expressió del missatger i la

⁴ El gen del receptor de serotonina 1A és conegut com a 5HT_{1a} (receptor de 5-hidroxitriptamina (serotonina) 1a); 5-HT_{1A}; ADRBRL1 (beta 2-adrenergic receptor-like protein) ; ADRB₂R1; HTR_{1A}; proteïna G₂₁; LOC3350.

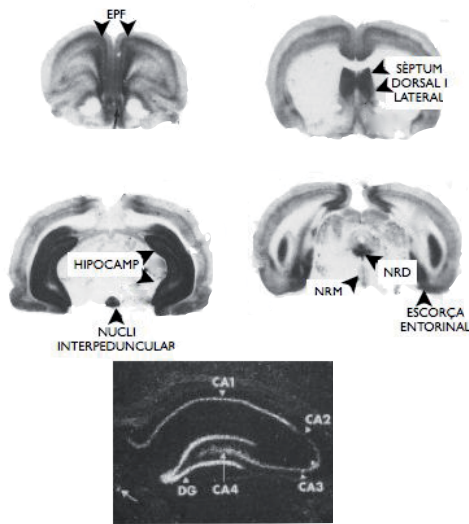


Fig. 9. Distribució de l'ARNm del receptor 5-HT_{1A}. Modificat de Pompeiano [211].

presència del receptor en les mateixes àrees cerebrals, suggerint que el receptor podria ser fonamentalment somatodendrític.

A l'EPF el receptor 5-HT_{1A} és expressat per un 80% de les neurones glutamaèrgiques de capes externes i al voltant d'un 50% a capa VI en humà i mono [326]. En rata, aproximadament un 60% de les neurones piramidals d'EPF expressa aquest receptor [223]. Mentre alguns autors el situen al soma i les dendrites basals de les neurones piramidals [211, 327, 328], altres l'han trobat fonamentalment al con axonal piramidal, on exerciria un fort control sobre l'excitabilitat neuronal [216, 329-331].

Un 20% de les interneurons GABAèrgiques d'EPF de rata, mono i humà expressa el receptor 5-HT_{1A} [223, 326]. En mono l'expressen un 43% de neurones CB+, mentre que és rarament expressat en les PV+ [326].

LA PROTEÏNA: EL RECEPTOR 5-HT_{1A} COM A GPCR

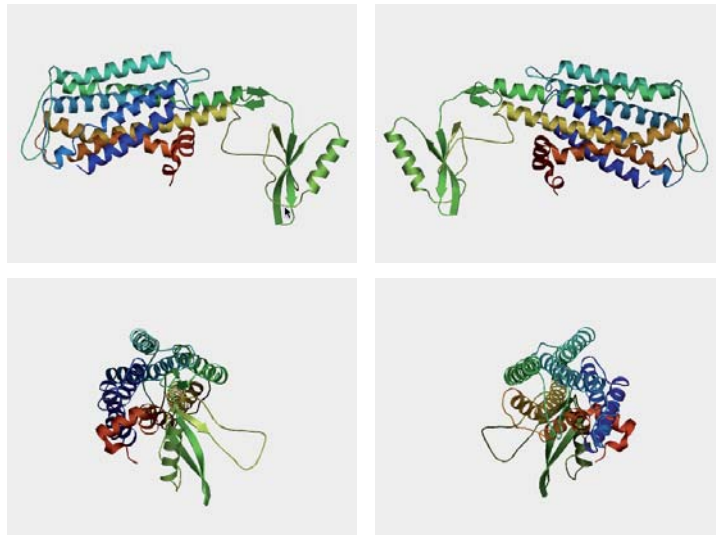


Fig. 10. Estructura en tres dimensions del receptor 5-HT_{1A}. Extret de Swissmodel.com

Segons la IUPHAR, el receptor 5-HT_{1A} pertany a la classe A dels receptors acoblats a proteïna G (GPCRs) amb 7 hèlix α transmembrana hidrofòbiques unides per tres bucles intracel·lulars i tres bucles extracel·lulars (Fig. 10). L'extrem carboxil terminal és intracel·lular i l'extrem amino terminal extracel·lular. Els dominis intracel·lulars permeten

l'acoblament del receptor a proteïnes G, que actuen com a mecanismes de transducció de senyal [302, 332].

Mecanismes de transducció de senyals

L'estimulació del receptor 5-HT_{1A} actua a través de diferents vies de senyalització que activen proteïnes G α_i /G α_o sensibles a toxina pertussis [333-336].

Els receptors 5-HT_{1A} interaccionen de manera diferencial amb subtipus de proteïnes G α segons la regió cerebral on es troben [337]. Diferents subunitats de proteïna G α poden mediar diferents efectes en els sistemes de transducció [338] (Fig. II). Aquestes diferències en transducció podrien explicar les diferències regionals en les respostes i les accions adaptatives dels receptors 5-HT_{1A} (veure *Desensibilització*).

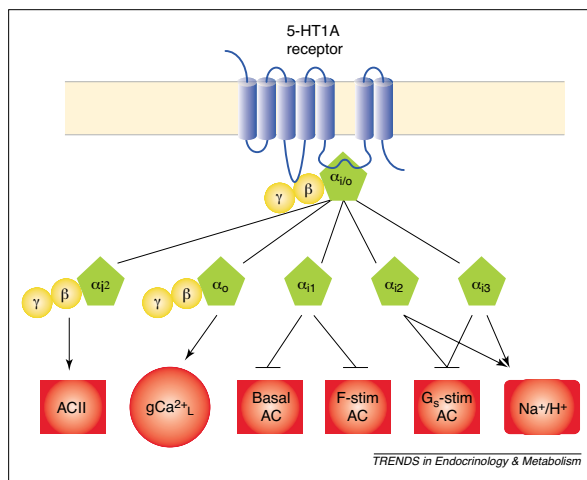


Fig. II. Senyalització específica de diferents G α_i que interaccionen amb el receptor 5-HT_{1A}. Les fletxes indiquen regulació positiva i les barres regulació negativa. Extret d'Albert i Tiberi [338].

hipocampals i de rafe medien la corrent de potassi *inwardly rectifying* activada per proteïna G (GIRK) [344-346] a través de les subunitats G $\beta\gamma$ [347]. D'aquesta manera, l'activació dels receptors 5-HT_{1A} provoca una hiperpolarització a les cèl·lules on s'expressa [348]. A banda de modificar la conductància pel potassi, les proteïnes G acoblades al receptors 5-HT_{1A} també poden inhibir canals de calci dependents de voltatge [349, 350].

A banda de les accions típiques inhibidores del receptor 5-HT_{1A}, també s'han descrit accions excitatòries. En teixits que expressen l'adenilil ciclasa II (AC II), com hipocamp, el receptor 5-HT_{1A} pot mediar l'activació de l'AC de manera constitutiva [351]. En cèl·lules mesenquimals i sistemes heteròlegs s'ha descrit una acció excitatòria del receptor 5-HT_{1A} produint l'activació de la fosfolipasa C β (PLC β) o la proteïna-quinasa activada per mitogen (MAPK) a través de les subunitats G $\beta\gamma$ i també per un mecanisme sensible a toxina pertussis, fet que suggereix que les proteïnes G α_i /G α_o medien tant la transducció de senyal inhibidora com excitatòria del receptor 5-HT_{1A} a través de segons missatgers [338, 352, 353].

Fins fa un temps, es creia que la inhibició de l'adenilil ciclasa (AC) en rosegadors es donava tan sols en àrees postsinàptiques com l'hipocamp com a resultat de l'activació de la proteïna G α_i [339] i no en els nuclis del rafe [340]. Actualment s'ha demostrat que agonistes diferents de la 8-OH-DPAT com la buspirona també són capaços d'inhibir l'AC en rates [341]. Per altra banda, en humà també s'ha observat la inhibició d'aquest enzim als nuclis del rafe tant per 8-OH-DPAT [342] com per buspirona [343]. A més, els receptors

Desensibilització del receptor

L'acció d'agonistes sobre GPCRs moltes vegades resulta en una atenuació de la resposta funcional del receptor. Aquest procés s'anomena *desensibilització* i pot donar-se per diferents mecanismes, entre ells, la fosforilació del receptor que provoca el desacoblament entre el receptor i la proteïna G, la internalització dels receptors o la modulació de proteïnes G.

Sembla que la desensibilització del receptor 5-HT_{1A} per diferents proteïnes quinases és selectiva per diferents vies de senyalització. Per exemple, la fosforilació del receptor per la proteïna quinasa C (PKC) bloqueja l'activació de la PLC però no afecta l'acció del receptor 5-HT_{1A} sobre l'AC [per revisió: 338, 354].

Per altra banda, hi ha selectivitat regional pel que fa a la desensibilització dels receptors 5-HT_{1A}. El tractament perllongat amb inhibidors selectius de la recaptació de serotonina (SSRIs)[355-358], l'administració d'agonistes 5-HT_{1A} [359, 360] o la disrupció del gen del transportador de serotonina [361] indueixen la desensibilització funcional dels autoreceptors 5-HT_{1A} de rafe però no modifiquen els receptors 5-HT_{1A} d'hipocamp, els quals fins i tot es poden hipersensibilitzar [362]. A rafe, aquesta adaptació és associada amb una alteració de l'acoblament entre el receptor i la proteïna G a nivell de regulació de la proteïna G [362, 363]. També s'ha observat per microscòpia electrònica [364] i tomografia d'emissió de positrons (PET) [365] la internalització del receptor 5-HT_{1A} després d'una injecció d'agonista 5-HT_{1A} a rafe però no a hipocamp.

Oligomerització

Estudis recents han mostrat que els GPCRs poden muntar complexes homo- i hetero-oligomèrics d'alt pes molecular que poden resultar en una alteració de la seva unió amb el lligand o la senyalització. En cèl·lules transfectades, el receptor 5-HT_{1A} és capaç de formar homodímers de manera constitutiva [366]. Lligands específics regulen el grau d'aquestes interaccions: l'agonista 8-OH-DPAT facilita la formació de dímers mentre que l'antagonista metisergida la disminueix [366]. En sistemes heteròlegs, el receptor 5-HT_{1A} és també capaç de formar hetero-oligòmers amb els receptors 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, EDG(I), EDG₃, GPR₂₆, i GABA_{B2} [367].

FUNCIÓ

El receptor 5-HT_{1A} ha estat implicat en elevat nombre de funcions que van des de termoregulació i regulació neuroendocrina [368, 369], comportament sexual [370], ingesta d'aliments [371] o processos immunològics [372] fins a memòria [373], nocicepció [374], ansietat [375], depressió [376] o cognició general [377].

Relació del receptor 5-HT_{1A} amb les funcions cognitives

Com hem vist, el sistema serotoninèrgic innerva àrees molt importants en la regulació de les funcions cognitives, com la memòria i l'aprenentatge, i el receptor 5-HT_{1A} és expressat en moltes d'aquestes àrees. Hi ha tant evidències en animals com en humans que involucren el receptor 5-HT_{1A} en funcions cognitives.

Estudis en animals

Sarnyai [378] mostrà que el KO del receptor 5-HT_{1A} presenta problemes en l'aprenentatge depenent d'hipocamp en tasques la memòria de treball espacial com el laberint de Morris.

Altres grups han mostrat recentment variacions en l'expressió del receptor 5-HT_{1A} després de l'entrenament en una tasca d'*autoshaping response*⁵ en vàries àrees cerebrals comparat amb controls no entrenats, indicant que aquesta expressió podria ser funció de la formació de memòria [379].

En estudis farmacològics, l'*antagonisme* del receptor 5-HT_{1A} reverteix problemes cognitius causats per lesions del fòrnix o antagonistes NMDA [380, 381]. Recentment, Hirst [382] mostrà que l'antagonista 5-HT_{1A} WAY-101405 millorava la retenció en el test de reconeixement d'objectes nous i que revertia els dèficits causats per l'escopolamina (antagonista muscarínic) en el test de reconeixement d'objectes i en el test de por condicionada a context. Misane i Ogren [383] mostraren que els antagonistes 5-HT_{1A} NAD-299 i WAY100635 revertien els dèficits cognitius causats per escopolamina en tests d'evitació passiva. Els resultats amb antagonistes del receptor 5-HT_{1A} però, són variats, amb un rang entre la millora i l'empitjorament cognitiu [384].

Per altra banda, estudis en animals utilitzant agonistes del receptor 5-HT_{1A} com la 8-OH-DPAT i la tandospirona o agonistes parcials com la bupirona en tasques cognitives també han mostrat un rang de respostes que va des de la millora fins a l'empitjorament. Alguns estudis donen suport a la idea que dosis baixes dels agonistes 5-HT_{1A} podrien augmentar la cognició, mentre que les dosis altes impedirien el rendiment cognitiu en tests d'aprenentatge espacial, evitació passiva o processament sensorial [385-390]. També s'ha observat la reversió dels efectes de l'administració subcrònica de fenciclidina després de l'administració de l'agonista parcial 5-HT_{1A} bupirona [391].

⁵ Tasca de condicionament clàssic en la qual l'animal aprèn a associar un comportament a una recompensa sense ajuda de l'experimentador.

Quan s'injecta 8-OH-DPAT al NRM hi ha una millora en el rendiment de tasques *delayed non-matching to position*⁶, indicant que una disminució de la serotonina alliberada milloraria el rendiment en aquest paradigma [392]. Per altra banda, infusions intraprefrontals de 8-OH-DPAT milloren l'atenció visuo-espacial i disminueixen la impulsivitat en rates durant la tasca anomenada *5-choice serial reaction time task* (5-CSRTT)⁷ [277].

Els agonistes 5-HT_{1A} com la 8-OH-DPAT disminueixen la descàrrega poblacional de les neurones piramidals i supprimeixen l'augment d'LTP a hipocamp provocat per antagonistes del receptor 5-HT_{1A} [393]. Per altra banda, els antagonistes 5-HT_{1A} com el WAY100635 també atenuen la LTP quan són injectats al gir dentat (GD) [394].

Resta per resoldre la qüestió de si els efectes vistos es deuen a l'activació dels receptors 5-HT_{1A} postsinàptics o dels autoreceptors. Tot i la varietat en els resultats, queda palesa la implicació dels receptor 5-HT_{1A} en funcions cognitives.

Estudis en humans

Diferents grups han mostrat que el receptor 5-HT_{1A} està disminuït en la malaltia de l'Alzheimer i en l'envelliment [395-397]. Estudis de neuroimatge han permès estudiar la relació entre el receptor 5-HT_{1A} i tasques cognitives [377], mostrant resultats variats entre els estudis (taula 2) .

Per altra banda, estudis farmacològics han permès investigar les accions de fàrmacs amb afinitat pel receptor 5-HT_{1A} en tasques cognitives en humans. L'agonista 5-HT_{1A} tandospirona administrat amb neurolèptics ha mostrat una millora en la memòria verbal i la funció executiva en pacients esquizofrènics [398-400]. Per contra, la memòria verbal explícita (però no la WM) sembla resultar perjudicada en una mostra de voluntaris sans [401]. Així sorgeix la possibilitat d'efectes diferencials dels agonistes 5-HT_{1A} sobre la cognició en mostres de voluntaris sans o amb malalties psiquiàtriques.

⁶ Tasca generalment emprada com a test de memòria espacial

⁷ Tasca emprada per mesurar diferents aspectes del control atencional (precisió, respostes precipitades, latència de resposta). Es du a terme en una cambra operant amb llocs de resposta múltiple i utilitzant reforç alimentari.

Taula 2. Estudis de PET que investiguen la relació entre el potencial d'unió (BP⁸, *binding potential*) pel receptor 5-HT_{1A} i les funcions cognitives. Modificat de Borg [377]. MCI: *mild cognitive impairment*; AD: Alzheimer; MMS: *mini-mental state*; NC: no correlació.

Estudi	Mostra		Radiolligand	MMS	Correlació entre BP pel receptor 5-HT _{1A} i...		
	Subjectes	N			Memòria verbal	Memòria no verbal	Funció executiva
[401]	Controls	16	[11C]WAY100635		Correlació negativa en HPC	Correlació negativa en HPC	
[849]	Controls	24	[11C]WAY100635		NC	NC	NC
[377]	Controls	54	[11C]WAY100635		NC	NC	NC
[842]	AD	8	[18F]MPPF	Correlació positiva en HPC i rafe	Correlació positiva en HPC i rafe post hoc		
	MCI	6					
[841]	AD	10	[18F]MPPF	NC	NC	NC	NC
	MCI	11					

⁸ Una mesura combinada de la densitat de receptors disponibles i l'afinitat d'un fàrmac per aquell receptor.

Esquizofrènia

INTRODUCCIÓ

Segons l'OMS, l'esquizofrènia és un desordre mental sever caracteritzat per alteracions profundes del pensament, que afecten els atributs humans fonamentals incloent el llenguatge, la percepció i el sentit de si mateix. Sovint inclou experiències psicòtiques i pèrdua de contacte amb la realitat. És un desordre psiquiàtric greu, que comença habitualment en l'adolescència tardana o l'edat adulta primerenca i pot inhabilitar profundament a la persona.

La malaltia afecta aproximadament a un 1% de persones arreu del món, la majoria en el grup d'edat de 15 a 35 anys i, segons l'OMS, està dins de les deu principals causes de discapacitat. Tot i que sembla que l'1% d'incidència de l'esquizofrènia es manté de forma constant entre cultures, països, grups racials i gèneres, estudis realitzats en els dos hemisferis han mostrat un modest excés de naixements en els mesos d'hivern i primavera entre malalts esquizofrènics [402], tot i que observacions semblants s'han fet també per trastorns depressius [403]. També s'adverteix una tendència per part d'individus esquizofrènics a pertànyer a un nivell socio-econòmic baix [404] i a determinades poblacions immigrants [405] i urbanes [406]. Cal destacar també que tot i que pateixen la malaltia igual nombre d'homes que de dones, algunes dades suggereixen que en el cas del gènere masculí s'observen unes manifestacions més greus del trastorn [407, 408].

SIMPTOMATOLOGIA I DIAGNOSI

L'esquizofrènia és un desordre complex amb diferents presentacions clíniques. A més, els diferents sistemes de diagnosi (ICD-10 i DSM-IV) difereixen a l'hora de definir la durada dels criteris per al diagnosi de la malaltia.

Els pacients esquizofrènics sovint presenten manifestacions premòrbides de la malaltia en l'adolescència. Aquests inclouen símptomes socials lleus i baix rendiment acadèmic, efectes en el llenguatge de l'individu, el pensament, la percepció i el sentit de si mateix. Els símptomes són sovint no reconeguts com els primers signes d'esquizofrènia en aquest estat, però poden empitjorar amb el temps fins incloure manifestacions psicòtiques com sentir veus o tenir al·lucinacions visuals. Una vegada la malaltia ha evolucionat fins al punt del primer episodi psicòtic, altres símptomes s'associen amb la malaltia.

Els símptomes es classifiquen en positius, negatius i cognitius (Taula 5). La disfunció cognitiva és un dels principals determinants del resultat de la malaltia [409, 410] i és present en un 75% de pacients, mostrant un impediment cognitiu en algun domini cognitiu, incloent atenció, memòria de treball, memòria declarativa, funció executiva, etc. [411].

Taula 5. Principals símptomes observats en pacients esquizofrènics

Presència de comportament anormal (Símptomes positius)	Absència de comportament normal (Símptomes negatius)	Disfunció cognitiva en
Al·lucinacions Deliris Pensament o parla desorganitzats Comportament desorganitzat Comportament catatònic	Retracció social Aïllament Pobra cura d'un mateix Estat d'ànim i expressió facial plans Manca de pensament espontani	Abstracció Funció executiva Memòria verbal i de treball Llenguatge Atenció

Les formes més comuns de la malaltia inclouen l'esquizofrènia paranoide (paranoies, símptomes delirants i al·lucinacions), l'esquizofrènia hebefrènica (símptomes negatius, comportament desorganitzat) i l'esquizofrènia catatònica (alteracions psicomotores, episodis de violència).

ETIOLOGIA, FISIOPATOLOGIA I HIPÒTESIS

La causa de l'esquizofrènia és desconeguda, ara bé, la vulnerabilitat de patir aquesta malaltia està clarament relacionada amb factors genètics [412-414]. Així, la incidència d'esquizofrènia d'un 1% en la població general va augmentant segons augmenta el grau de parentiu amb un malalt esquizofrènic [413]. Tot i això, la probabilitat mai arriba a ser del 100%, fet que deixa entreveure que també hi ha factors ambientals que condicionen el desenvolupament de la malaltia.

Després d'anys de recerca d'un sol gen causant de la malaltia, avui en dia s'accepta que és una malaltia poligènica [415]. S'ha relacionat amb l'esquizofrènia gens que influencien la funció de receptors de neurotransmissors o que controlen el desenvolupament cerebral [416-418].

Estudis de neuroimatge han caracteritzat un gran nombre d'alteracions anatomo-patològiques en el cervell dels esquizofrènics: reducció del volum cortical, hipocampal i talàmic i engrandiment dels ventricles, entre altres [419-421].

S'ha descrit múltiples perturbacions en l'activitat [422-425], el processament de la informació [426, 427], el funcionament de circuits [428] i l'EEG [112, 427, 429-431] de l'EPF de pacients esquizofrènics. A nivell cel·lular, s'ha descrit també diferents alteracions a l'EPF (Fig. 13)

[407, 432-437]. A més, els nivells de N-acetilaspargat, un marcador d'integritat neuronal [438], s'han trobat reduïts de manera significativa en l'EPF, l'hipocamp i el lòbul temporal [439] de pacients esquizofrènics.

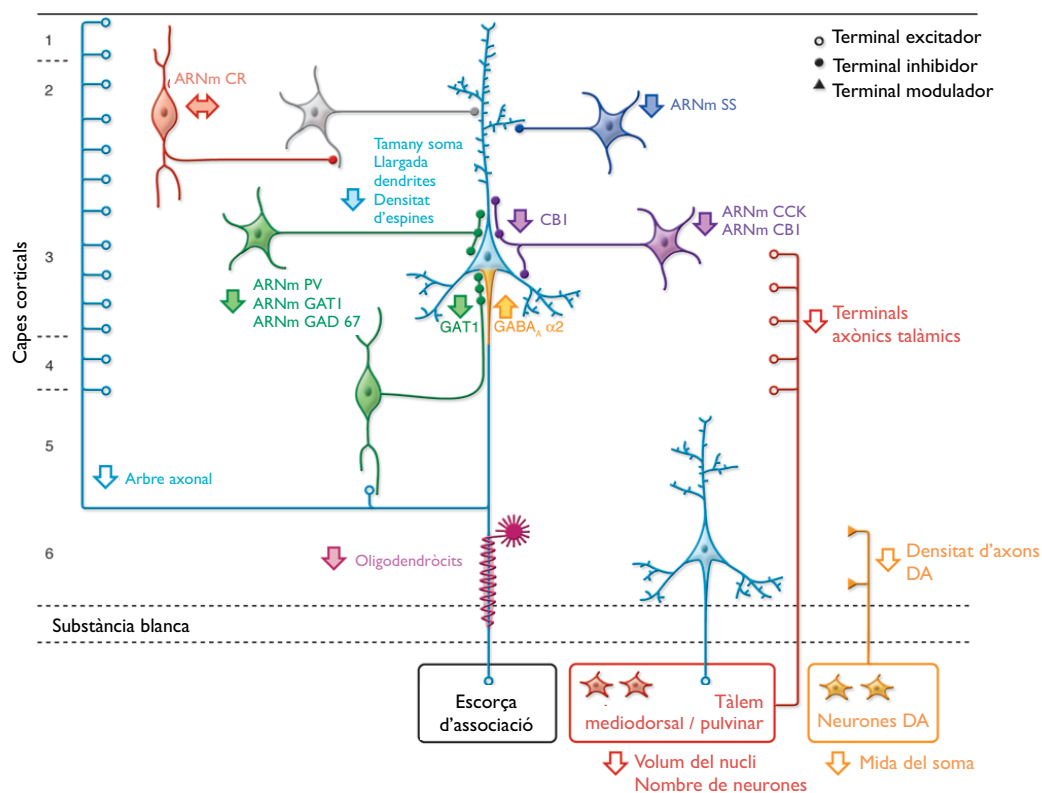


Fig. 13. Esquema de les possibles alteracions en l'EPF DL de pacients esquizofrènics. No totes les alteracions han estat replicades de manera consistent; aquelles que ho han estat estan indicades amb fletxes plenes. Modificat de Lewis [760].

La hipòtesi clàssica sobre la fisiopatologia de l'esquizofrènia era la que postulava un excés d'activitat dopaminèrgica [440, 441]. Un refinament posterior de la **hipòtesi dopaminèrgica** postula una hiperactivitat de la neurotransmissió dopaminèrgica en la via mesolímbica (suposadament responsable de la simptomatologia positiva) i una disminució de la neurotransmissió dopaminèrgica mesocortical (que contribuïria als danys cognitius i als símptomes negatius) [442-444]. Aquesta hipòtesi és recolzada pels efectes de drogues psicoestimulants així com antipsicòtiques amb efectes sobre la neurotransmissió dopaminèrgica [445-448].

Així mateix, altres drogues al·lucinògenes [449] i els nous antipsicòtics atípics [450-454] tenen afinitat pels receptors de serotonina. Això proporcionà una nova hipòtesi per explicar els símptomes de l'esquizofrènia: la **hipòtesi serotoninèrgica** que proposa un desequilibri en la transmissió serotoninèrgica.

La **hipòtesi glutamatèrgica** postula una disfunció glutamatèrgica cortical. Es basa en el fet que l'administració d'antagonistes del receptor glutamatèrgic N-metil-D-aspartat (NMDA) pot originar símptomes psicòtics, negatius i disfuncions cognitives en individus sans i exacerba les manifestacions ja existents en malalts esquizofrènics [455-458]. Per altra banda, les múltiples i replicades alteracions en el sistema GABAèrgic en pacients esquizofrènics [437, 459-461] ha portat a hipotetitzar que un **desequilibri en la transmissió cortical GABAèrgica** podria produir una desregulació en l'activitat de les neurones glutamatèrgiques corticals [434]. Cal indicar que aquestes dues hipòtesis són integradores i per tant, compatibles amb les hipòtesis monoaminèrgiques degut a les relacions entre EPF i sistemes moduladors [462, 463].

Una de les teories amb més bona acceptació a l'actualitat és la que considera l'esquizofrènia com una **alteració del neurodesenvolupament** [407], conseqüència d'una càrrega genètica encara poc coneguda i de possibles danys perinatals, possiblement relacionats amb la resposta inflamatòria [464-466], que podrien portar a les alteracions descrites en totes les altres hipòtesis.

TRACTAMENT

Hi ha intervencions farmacològiques i psicosocials efectives per tractar l'esquizofrènia. Tot i això, la majoria de persones amb esquizofrènia crònica abandonen el tractament, la qual cosa contribueix a la cronicitat de la malaltia. Igual que amb els casos reactius de la depressió, els pacients que no responen a tractament farmacològic o psicosocial són candidats per al tractament mitjançant TEC combinada amb psicofàrmacs [467, 468].

El tractament farmacològic tradicional de l'esquizofrènia es basa en la utilització d'antagonistes del receptor de dopamina D₂ com la clorpromazina [469] o l'haloperidol [470]. Aquests fàrmacs s'anomenen antipsicòtics clàssics o típics (AT) i reverteixen la simptomatologia positiva malgrat que no permeten la millora dels símptomes negatius/cognitius dels pacients [471-473]. D'altra banda produeixen reaccions adverses molt importants: el bloqueig de les accions motores de la dopamina en el circuit nigro-estriatal produeix discinèsies tardanes i un quadre similar al Parkinson (síntomes motors), a més del bloqueig dopaminèrgic a l'hipotàlem que produeix hiperprolactinèmia [474].

El descobriment als anys 70 de la clozapina [475] proporcionà un fàrmac amb un perfil farmacològic diferent, amb més afinitat pels receptors de serotonina 5-HT_{2A} que pels de dopamina D₂ i que no produïa els greus efectes secundaris motors dels AT. La clozapina va ser el primer d'una nova generació de fàrmacs neurolèptics que s'anomenen antipsicòtics atípics (AAT) i que tenen afinitat per una gran varietat de receptors (Taula 6). A banda de

resultar igual d'eficaços en tractar la simptomatologia positiva de la malaltia que els AT, els AAT també milloren els símptomes negatius i cognitius i estableixen l'estat d'ànim en alguns pacients [471, 476-478]. A més, no arriben a produir una ocupació dels receptors D₂ que doni lloc a la manifestació dels símptomes motors. No obstant, els AAT poden originar altres efectes secundaris, com p.ex. agranulocitosi [479].

Recentment s'estan desenvolupant fàrmacs antipsicòtics amb afinitats per altres receptors, com els metabotròpics de glutamat [480, 481], o fàrmacs antipsicòtics d'última generació com el bifeprunox [482], que combinen l'agonisme parcial pel receptor D₂ i l'agonisme pel receptor 5-HT_{1A} i que intenten suplir els dèficits en el tractament dels símptomes negatius i cognitius que encara mostren els antipsicòtics en mercat.

És d'interès remarcar que l'escorça prefrontal expressa tots els receptors pels quals tenen afinitat els fàrmacs antipsicòtics, així aquesta regió és una àrea diana molt important que pot estar implicada en el mecanisme d'acció d'aquests fàrmacs.

L'esquizofrènia és un desordre tractable, sent el tractament més efectiu en els estats inicials. Més del 50% de les persones amb esquizofrènia no estan rebent el tractament apropiat. El 90% de les persones amb esquizofrènia no tractada està en països en desenvolupament. El tractament pot ser proporcionat a nivell de comunitat, amb una família activa i implicació de l'entorn (www.who.int).

Taula 6. Afinitats *in vitro* pels receptors monoaminèrgics dels antipsicòtics més comuns. Ki expressades en nM. Dades amb receptors humans clonats. Modificat de Bishara [483].

Receptor	CLÀSSICS		ATÍPICS					ÚLTIMA GENERACIÓ	
	CLORPROMACINA	HALOPERIDOL	ARIPIPRAZOL	OLANZAPINA	RISPERIDONA	ZIPRASIDONA	CLOZAPINA	BIFEPRUNOX	NEMONAPRIDE
D ₁	19.95	210	265	31	430	525	85		
D ₂	1.25	0.7	0.34	11	4	5	125	3.2	0.16
D ₃		2	0.8	49	10	7	473	0.6	0.26
D ₄		3	44	27	9	32	9-12	1.6	0.31
5-HT _{1A}		1100	1.7	>1000	210	3	770	10	1.8
5-HT _{2A}	7.94	45	3.4	4	0.5	0.4	12	>>	9.4
5-HT _{2C}	12.59	>10 000	15	11	25	1	8	>>	
α ₁	1	6	57	19	0.7	11	7	>>	
H ₁		440	61	7	20	50	6	>>	
M ₁		>1 500	>>	2	>10 000	>1000	1.9	>>	

EL RECEPTOR 5-HT_{1A} EN LA FISIOPATOLOGIA I EL TRACTAMENT DE L'ESQUIZOFRÈNIA

Estudis en animals

En estudis de models animals d'esquizofrènia basats en l'administració de dosis subanestèsiques d'antagonistes NMDA s'observa hiperlocomoció, impediments en la interacció social, comportaments estereotipats i dèficits en el filtratge de la informació sensorial i en el processament cognitiu [484]. Utilitzant aquests models, s'ha vist que dosis baixes d'agonistes 5-HT_{1A} reverteixen els efectes causats per aquests fàrmacs en tests d'interacció social, inhibició prepols i hiperlocomoció, [390, 485].

Per altra banda, els agonistes del receptor 5-HT_{1A} atenuen la catalèpsia (una resposta predictiva d'efectes secundaris motors) produïda per antagonistes D₂ en rosegadors, [486]. També s'ha observat el bloqueig dels efectes motors per agonistes 5-HT_{1A} en primats [487].

Estudis en humans

Igual que en la depressió, l'al·lel G de l'SNP rs6295 (C/G-1019) del receptor 5-HT_{1A} també s'ha estudiat en relació amb l'esquizofrènia (per una descripció detallada de l'al·lel veure l'apartat *Variants del gen del receptor 5-HT_{1A}* en el capítol *Depressió*). Estudis de PET mostren que aquest al·lel disminueix el metabolisme a l'EPF i suggereixen que el polimorfisme del receptor 5-HT_{1A} prediu les característiques estructurals i funcionals de regions corticals que reben projeccions serotoninèrgiques [485].

Estudis postmortem i de PET han descrit una major densitat/potencial d'unió de receptors 5-HT_{1A} en escorces temporal i frontal de pacients esquizofrènics [488-496]. Aquest augment no sembla que sigui per compensar una disminució en la transmissió serotoninèrgica, ja que els receptors 5-HT_{2A} en aquests pacients es troben disminuïts [488].

Els antipsicòtics atípics com l'aripiprazol, la ziprasidona o la perospirona tenen una major afinitat pels receptors serotoninèrgics que els antipsicòtics típics, destacant el seu agonisme pels receptors 5-HT_{1A} [497]. El cas de la clozapina mereix especial menció ja que, tot i que la seva afinitat pel receptor 5-HT_{1A} *in vitro* no és massa alta, estudis *in vivo* demostren la seva unió a aquest receptor [498]. S'ha suggerit que l'estimulació del receptor 5-HT_{1A} millora els símptomes negatius i els dèficits cognitius de l'esquizofrènia mitjançant un augment de DA i ACh a l'EPF i l'hipocamp a través d'un mecanisme dependent dels heteroreceptors 5-HT_{1A} postsinàptics [452, 499-502]. Per altra banda, aquesta afirmació ha estat recolzada clínicament utilitzant l'agonista parcial tandospirona per millorar la funció cognitiva en pacients esquizofrènics tractats amb fàrmacs antipsicòtics [398, 399].

Depressió

El terme melancolia (bilis negra en grec) ja l'utilitzà Hipòcrates 400 AC. Molts dels símptomes que defineixen actualment la malaltia ja els havien identificat els nostres antecessors, però no va ser fins a mitjans del s. XIX que el cervell va ser el centre d'atenció per entendre aquest desordre [503].

INTRODUCCIÓ

Segons l'Organització Mundial de la Salut (OMS), la depressió és un desordre mental comú caracteritzat per tristesa, manca d'interès o plaer, sentiments de culpa o baixa autoestima, alteracions del son o la gana, manca d'energia i poca concentració. Aquests problemes poden esdevenir crònics o recurrents, implicant substancialment l'habilitat de l'individu de fer front a la vida diària. En els casos més severos, la depressió pot portar al suïcidi, una tràgica fatalitat associada amb la pèrdua de milers de vides cada any (www.who.int).

La depressió pot afectar a persones de tots els gèneres, edats i procedències. Segons l'OMS, és la principal causa de discapacitat, mesurada per YLDs⁹ i el quart principal contribuent a la càrrega mundial de morbiditat (DALYs¹⁰) el 2000. La prevalença¹¹ exacta de depressió és difícil d'establir per les diferents definicions de la malaltia. Alguns estudis situen la incidència de depressió al llarg de la vida en un 5-12% en homes i 12-20% en dones. Les dones semblen experimentar més factors de risc per patir depressió que els homes [504-506].

SIMPTOMATOLOGIA I DIAGNOSI

La depressió s'engloba dins del grup de Desordres afectius. Els símptomes de la depressió major inclouen anormalitats de l'estat d'ànim i l'humor, les funcions neurovegetatives, la cognició i l'activitat psicomotora [507]. Els símptomes de la depressió són variats entre els pacients i en certa manera arbitraris pel que fa referència a la durada dels criteris de diagnosi, el que fa que es puguin englobar sota el síndrom depressiu múltiples malalties amb diferent etiologia [503] (Taula 3).

⁹ YLDs: *Years Lived with Disability*, anys viscuts amb discapacitat.

¹⁰ DALYs: *Disability Adjusted Life Years*, anys de vida ajustats a la discapacitat. La suma d'anys de potencial pèrdua de vida degut a mortalitat prematura i els anys de pèrdua de vida productiva degut a discapacitat.

¹¹ Nombre de casos que presenten la malaltia, dividit pel nombre d'individus que componen el grup o la població en un determinat moment. D'altra banda, la incidència és una mesura de la probabilitat de desenvolupar alguna nova condició mèdica dins en un període definit de temps.

Taula 3.

Criteris de diagnosi per la depressió major
Estat d'ànim depressiu
Sentiment de desesperança, inutilitat i culpa
Irritabilitat
Baixa autoestima
Poca capacitat de concentració
Augment o disminució de la gana
Pèrdua o disminució de pes
Insomnia o hipersomnia
Manca d'energia, fatiga o augment de l'agitació
Poc interès pel plaer
Pensaments recorrents de mort i suïcidi
Es diagnostica depressió major quan un cert nombre dels símptomes mencionats es perllonga per més de dues setmanes i quan aquests símptomes afecten el contacte social i ocupacional normal

Es poden definir diferents subtipus de depressió segons si inclouen episodis de mania¹² (bipolar), si inclouen símptomes psicòtics (depressió psicòtica), etc.

Deteriorament cognitiu en depressió

El deteriorament cognitiu ha estat mostrat en un gran nombre de pacients amb depressió major [508-510]. S'ha observat que aquest deteriorament afecta diferents dominis cognitius, entre ells, la funció executiva [511-518], la memòria episòdica [512, 519-522], la memòria semàntica [517, 523-525], la memòria visuo-espacial [518, 526] i la velocitat de processament [516-518, 524].

La severitat de la depressió podria estar correlacionada directament amb un major deteriorament cognitiu general [527].

ETIOLOGIA, FISIOPATOLOGIA I HIPÒTESIS

Els estudis epidemiològics mostren que al voltant d'un 40-50% del risc de depressió és genètic [507]. Tot i això, els intents per trobar un gen causant de la malaltia han estat fallits i es considera que, com moltes altres malalties psiquiàtriques, és poligènica. Per altra banda, la vulnerabilitat a la depressió també depèn de factors no genètics com els traumes emocionals, infeccions per virus o processos estocàstics del desenvolupament i amb especial menció, l'estrès [503, 507].

Sembla probable que varies àrees cerebrals estiguin involucrades en els símptomes de la depressió. Estudis d'imatge [424, 528] i post-mortem [529-531] han mostrat alteracions en varies regions cerebrals en pacients depressius, incloent l'EPF i cingulada, l'hipocamp, l'estriat, l'amígdala i el tàlem (Fig. 12). La neoescorça i l'hipocamp podrien intervenir en els aspectes més cognitius de la depressió; l'estriat ventral i l'amígdala, en l'anhedonia i els aspectes motivacionals i l'hipotàlem en els aspectes més neurovegetatius.

¹² Els episodis maníacs inclouen autoestima inflada o grandiositat, activitat frenètica i parla augmentada, necessitat de son disminuïda, pensament accelerat.

La hipòtesi clàssica de la depressió és la **hipòtesi monoaminèrgica** [532] que postula una disfunció dels sistemes monoaminèrgics. Aquesta es basa en el descobriment que els fàrmacs antidepressius (AD) actuen augmentant la neurotransmissió d'aquests sistemes moduladors [533]. Els nivells disminuïts de metabòlits de serotonina al líquid cefaloraquídi [534], junt amb els efectes depressius de deplecions de triptòfan [535] i l'eficàcia dels antidepressius moduladors del sistema serotoninèrgic [536], van portar a la idea que una disfunció en el sistema serotoninèrgic és un factor de vulnerabilitat per a partir depressió major [per revisió: 537].

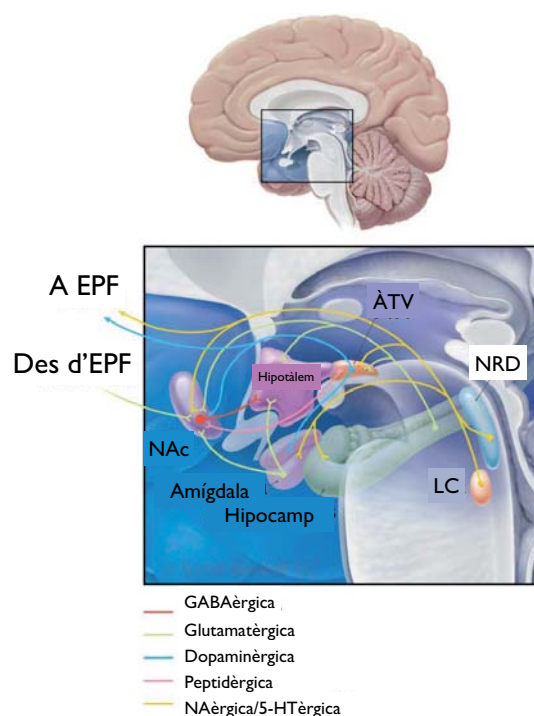


Fig. 12. Resum dels circuits cerebrals que podrien participar en la depressió. Modificat de Nestler [503].

Una altra de les **hipòtesis** de la depressió lliga directament l'**estrès** amb aquest trastorn psiquiàtric [503]. Durant l'estrès, un dels principals mecanismes de reacció és l'activació de l'eix hipotàlem-pituïtari-adrenal (HPA)[538]. En condicions patològiques, nivells elevats i sostinguts de glucocorticoïdes (GC) poden danyar les neurones hipocampals [539] i reduir-ne la proliferació [540-543], disminuint així la inhibició que l'hipocamp exerceix sobre l'HPA i entrant en un cicle de retroalimentació positiva. En almenys la meitat dels casos de pacients depressius s'ha observat hiperreactivitat [544-547] o hiperfunció de l'eix HPA [546-548].

La **hipòtesi neurotròfica** [549] de la depressió suggereix que una deficiència en factors neurotròfics podria contribuir a la patologia hipocampal durant el desenvolupament de la depressió. L'estrès agut i crònic disminueixen els nivells d'expressió de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) a hipocamp [550]. A més, l'administració crònica de pràcticament totes les classes d'AD augmenta l'expressió de BDNF en aquesta regió [551].

TRACTAMENT

Malgrat el desconeixement de l'etiologia de la depressió, els tractaments actuals són prou efectius, amb un 80% de resposta. Tot i això, les taxes de remissió completa només arriben al 50% dels pacients [503].

Les formes més lleus de depressió es poden tractar amb psicoteràpia. Les formes més greus poden ser tractades amb combinacions de psicoteràpia i farmacologia, que han mostrat efectes sinèrgics [503]. Si s'esgoten es opcions anteriors i no hi ha remissió, la teràpia electroconvulsiva (TEC) ha mostrat ser un dels tractaments més efectius [503].

El primer tractament farmacològic de la depressió foren els antidepressius (AD) tricíclics [552], els quals sembla que actuen inhibint els transportadors de serotonina [553] i noradrenalina [554] de la membrana plasmàtica [555]. Per altra banda, també basats en el mateix principi de potenciació dels sistemes monoaminèrgics, es desenvoluparen els inhibidors de la monoaminoxidasa (IMAOs) [556] i posteriorment els inhibidors selectius de la recaptació de serotonina (SSRIs) [557, 558], noradrenalina (NRIs) [559, 560] i la combinació d'ambdós (SNRIs) [561].

El problema d'aquests AD és que la seva acció antidepressiva només s'observa després de varies setmanes de tractament. Aquest retard temporal en l'eficàcia dels tractaments, podria ser degut a l'acció dual de la serotonina sobre autoreceptors i heteroreceptors 5-HT_{1A}, efecte que s'ha intentat evitar utilitzant antagonistes del receptor 5-HT_{1A} [562-564].

Recentment, amb les noves hipòtesis sobre la depressió, s'estan desenvolupant noves estratègies per al seu tractament [565], tot i que d'aquests fàrmacs encara no mostren resultats consistents [566] o sembla que els seus efectes també estiguin basats en accions sobre sistemes aminèrgics [567, 568]. Per altra banda, també s'ha mostrat efectiva la utilització de fàrmacs antipsicòtics atípics [569]. De tota manera, actualment els tractaments monoaminèrgics, tot i que no òptims, continuen regnant en el camp dels tractaments antidepressius [565, 570].

Els tractaments antidepressius i formes breus i estructurades de psicoteràpia són efectius pel 60-80% dels afectats i poden ser lliurats en atenció primària. Tot i això, menys del 25% dels afectats (en alguns països menys del 10%) rep aquests tractaments. Barreres per al tractament efectiu inclouen manca de recursos, manca de proveïdors entrenats i l'estigma social associat amb els desordres mentals com la depressió (www.who.int).

EL RECEPTOR 5-HT_{1A} EN LA FISIOPATOLOGIA I EL TRACTAMENT DE LA DEPRESSIÓ

El receptor 5-HT_{1A} ha estat associat àmpliament amb la depressió [per revisions: 376, 571].

Variants del gen del receptor 5-HT_{1A}

S'ha identificat un polimorfisme d'un nucleòtid (SNP) situat a la regió promotora del gen 5-HT_{1A} (HTR1A: -1019C/G; rs6295) [572] que regula la unió de factors de transcripció i per tant, l'expressió gènica del receptor [573]. Aquests factors de transcripció actuen de manera diferent en cèl·lules serotoninèrgiques i no-serotoninèrgiques i per tant modulen l'expressió del receptor 5-HT_{1A} de manera diferent a nivell pre- i post- sinàptic [573]. L'al·lel G augmentaria l'expressió de l'autoreceptor a rafe [573-576], reduint la neurotransmissió serotoninèrgica a les àrees de projecció. Per contra, a les zones postsinàptiques aquest al·lel provocaria una disminució de l'expressió del receptor 5-HT_{1A} [574, 577, 578].

La resposta al tractament antidepressiu és diferent segons el genotip per aquest SNP [579] i Lemonde [573] mostrà que la freqüència de l'al·lel G en pacients amb depressió major era el doble que en els controls i encara major en pacients amb intents de suïcidi.

Quantificació del receptor en pacients depressius

Per altra banda, la implicació del receptor 5-HT_{1A} en depressió s'ha fet palesa en estudis post-mortem de pacients depressius, on, tot i els resultats contradictoris [580-584], majoritàriament es veuen disminucions en el nombre/densitat de receptors en diferents àrees cerebrals (Taula 4).

Taula 4. Resum de resultats en articles que quantifiquen el receptor 5-HT_{1A} en pacients depressius post-mortem. AD, antidepressius; TEC, teràpia electroconvulsiva.

Zona	Pacients	Resultat 5-HT _{1A}	Medicats?	Referències
Hipocamp i Amígdala	Depressius víctimes de suïcidi	↓	6 amb AD	[848]
EPF ventrolateral, escorça temporal,	Depressius	↓	AD, tranquil·litzants o TEC	[843]
NDR	Depressius, víctimes de suïcidi en l'estudi d'Arango	↓	No en el moment de mort en l'estudi de Boldrini	[580, 847]
EPF DL i hipocamp	Depressius	↓	Sí, en el moment de la mort	[844]
BA10 en EPF de dones	Depressius	↓	No	[578]
Hipocamp	Depressius víctimes de suïcidi	↓	No de forma crònica	[845]
EOF	Depressius	↓	No AD almenys 2 mesos abans mort	[582]
EPF DL	Depressió severa	↓	* estudi antemortem per extracció DLPFC <i>in vivo</i>	[397]
EPF	Depressius lleus víctimes de suïcidi	Augment metilació gen 5-HT _{1A}		[846]

Els estudis de tomografia d'emissió de positrons (PET) mostren una disminució del potencial d'unió (BP) pel receptor 5-HT_{1A} en diverses zones cerebrals de pacients depressius, també en pacients no medicats [585-588][però: 576].

El receptor 5-HT_{1A} i la hipòtesi relacionada amb l'estrès

L'efecte d'una possible desregulació de l'eix HPA sobre la funció del receptor 5-HT_{1A} s'ha il·lustrat en estudis en animals [589-600] i humans [601, 602]. Aquests estudis mostren que l'exposició crònica a glucocorticoides (GC) atenua els efectes fisiològics dels agonistes 5-HT_{1A}. Sembla que el liti i el valproat podrien exercir la seva acció AD atenuant la senyalització GC i per tant, afavorint els receptors 5-HT_{1A} [603].

El receptor 5-HT_{1A} i la hipòtesi neurotròfica

Actualment també hi ha evidències que els estabilitzadors de l'estat d'ànim [604, 605] i alguns AD [606, 607] podrien actuar afavorint la proliferació neuronal [608], la neurogènesi [609] i l'augmentació de neurotrofines com el BDNF [607]. En aquest sentit, s'ha adjudicat als receptors 5-HT_{1A} postsinàptics accions com augmentar el creixement de dendrites a hipocamp [610], la proliferació neuronal al gir dentat [611-613], la supervivència neuronal hipocampal [610] o promoure la protecció contra apoptosi induïda per glutamat [256, 614-617].

El receptor 5-HT_{1A} i el tractament monoaminèrgic

Diverses setmanes de tractament amb els SSRI i IMAOs porten a la desensibilització dels autoreceptors 5-HT_{1A} de rafe (però no dels corticals o límbics), resultant en una facilitació estable de la transmissió serotoninèrgica postsinàptica [355, 359, 618-625].

El tractament a llarg plaç amb agonistes del receptor 5-HT_{1A} com la buspirona ha mostrat un efecte antidepressiu i ansiolític en estudis en animals i humans [376, 623, 626-628]. Per altra banda, estudis en models animals han mostrat que l'activació del receptor 5-HT_{1A} postsinàptic té efectes semblants als antidepressius comuns [627, 629].

L'antagonista 5-HT_{1A} pindolol s'uneix preferentment als receptors 5-HT_{1A} de rafe [630, 631]. D'aquesta manera ha mostrat accelerar la resposta AD dels SSRI i la buspirona bloquejant el *feedback* negatiu inicial mediat per l'acció sobre els autoreceptors somatodendrítics [562, 632-638].

S'ha hipotetitzat l'acció dels antidepressius tricíclics a nivell 5-HT_{1A} postsinàptic facilitant l'activació de les proteïnes G acoblades al 5-HT_{1A} i augmentant així la transmissió a través d'aquest receptor. Per tant, actuarien augmentant la sensibilitat del receptor postsinàptic en

comptes de desensibilitzar el receptor somatodendrític [355, 639, 640]. La sensibilitat augmentada dels receptors postsinàptics 5-HT_{1A} també s'ha mostrat en estructures límbiques com l'hipocamp després de l'administració repetida de TEC [641, 642] o d'inhibidors de la recaptació [362, 643].

Totes aquestes evidències recolzen la idea que l'activació dels receptors 5-HT_{1A} postsinàptics és particularment important per al tractament antidepressiu.

Dolor

INTRODUCCIÓ

La informació nociceptiva que incideix a l'asta dorsal de les medul·la espinal des de la pell, les vísceres i altres teixits, no és automàticament transferida a centres superiors [644]. La informació dels terminals de les fibres nociceptives i les fibres aferents primàries és processada i modificada (augmentada o disminuïda) a nivell medul·lar per aferències supraespinals. A més, la presència d'interneurons que interaccionen amb les fibres aferents i que també poden rebre tant aferències nociceptives com aferències moduladores complica encara més la modulació del dolor a nivell medul·lar [645].

El circuit processador de la informació del dolor (matriu del dolor) ha estat estudiat en estudis de neuroimatge i inclou les escorces sensorials primària i secundària (S1 i S2), l'escorça insular, l'escorça anterior cingulada (EAC),

l'amígdala, els nuclis talàmics i l'EPF [646-650]. L'S1 és generalment associada amb aspectes discriminatius sensorials, l'S2 té funcions més afectives/cognitives, mentre que l'ínsula i l'EAC són importants per aspectes afectius/motivacionals i certs aspectes cognitius. L'amígdala i l'EPF s'encarregarien de l'avaluació cognitiva i conscient del dolor [651], modulant el dolor emocional i cognitivament.

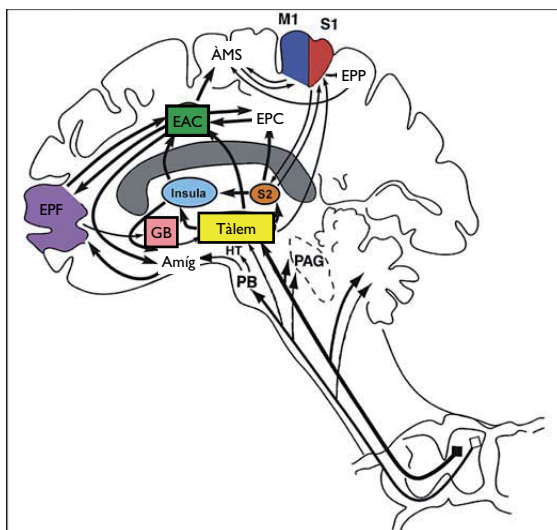


Fig 14. Principals regions corticals i subcorticals implicades en la percepció del dolor. GB, ganglis basals; Amíg, amígdala; HT, hipotàlem; PB, nuclis parabraquial; PAG, substància gris periaqüeductal; S1 i S2, àrees somatosensorials primària i secundària; M1 i ÀMS, àrea motora primària i suplementària; EAC, escorça anterior cingulada; EPP, escorça parietal posterior; EPC, escorça cingulada posterior. Modificat d'Apkarian [648].

S'ha observat hipoactivitat de l'EPF en pacients amb diferents desordres del dolor [652, 653]. Contràriament, estímuls nocius aguts en subjectes normals semblen estar associats a una activació de l'EPF [654, 655]. Estudis de registres unitaris extracel·lulars en rates anestesiades mostren que les neurones d'EPF són activades per

estímuls mecànics nocius [656]. Per altra banda, el dolor crònic indueix una disminució de matèria grisa a EPF i tàlem [657].

El dolor pot ser considerat com una experiència multidimensional, no només incloent nocicepció, sinó també components emocionals, afectius i cognitius [649, 650, 658-661]. El dolor pot portar a ansietat, depressió i símptomes cognitius com afectacions en la presa de decisions [662]. Alhora, els processos cognitius poden modular la percepció del dolor [663-665].

Estudis epidemiològics mostren que 8 de cada 10 pacients amb depressió major pateix dolor crònic o símptomes somàtics [666-668] i alternativament, persones que pateixen dolor crònic o condicions físiques doloroses tenen un major risc de desenvolupar depressió major [669, 670].

EL RECEPTOR 5HT_{1A} EN EL PROCESSAMENT I EL TRACTAMENT DEL DOLOR

Les projeccions descendents del NRD envien col·laterals a la medul·la espinal i al nucli trigeminal, l'equivalent funcional i estructural de l'asta dorsal [671-674]. Però la principal font d'aferències serotoninèrgiques a la medul·la espinal i al nucli trigeminal procedeix del Nucli del Rafe Magnus i la Medul·la Rostroventromedial (RVM) [675-677]. Existeixen contactes axo-somàtics i dendrítics de terminals serotoninèrgics a l'asta dorsal, alguns dels quals a neurones que després projecten a estructures superiors [678, 679]. Més de trenta anys enrera ja es mostrà que les lesions dels nuclis del rafe bloquejaven l'analgèsia induïda per morfina [680].

Exposicions agudes i cròniques a estímuls nocius activen les neurones serotoninèrgiques del RVM i acceleren l'intercanvi de serotonina a la medul·la espinal [681-684]. La influència de la serotonina sobre l'activitat de les neurones que responen a estímuls nocius a l'asta dorsal és heterogènia, amb inhibicions i (menys freqüentment) activacions [685-688].

Hi ha múltiples evidències que impliquen el receptor 5-HT_{1A} en la modulació del dolor i concretament hi ha un gran nombre d'evidències que recolzen la idea de que els agonistes del receptor 5-HT_{1A} tenen efectes antinociceptius. Estudis comportamentals i preclínics han mostrat efectes analgèsics dels agonistes del receptor 5-HT_{1A} com són la buspirona, la gepirona, la 8-OH-DPAT o l'F13640 [374, 689-691, per revisió: 692, 693-695]. Aquests resultats estarien d'acord amb una hiperpolarització causada per aquests fàrmacs en les neurones de projecció de l'asta dorsal de la medul·la.

Un estudi recent de PET amb ^{14}C -WAY100635 en homes sans [696] reportà que la intensitat del dolor per pressió de fred està inversament correlacionada amb el BP pel 5-HT_{1A} en rafe, amígdala, ínsula, escorça posterior cingulada i EPF. Els autors interpreten les dades suggerint que individus amb major disponibilitat de receptors 5-HT_{1A} en aquestes regions tenen major habilitat per suprimir el dolor.

Per altra banda, AD com els SSRIs o els inhibidors duals de la recaptació com la venlafaxina, s'han utilitzat amb moderat èxit per al tractament de la fibromiàlgia, i altres desordres del dolor [697]. Berrocoso i Mico [698] postulen que els efectes analgèsics dels AD com la venlafaxina poden ser parcialment atribuïts a la desensibilització dels autoreceptors 5-HT_{1A}, portant a un augment de la senyalització serotoninèrgica a les projeccions descendents espinals. Així, igual que en depressió una disfunció dels nuclis del rafe pot portar a una senyalització serotoninèrgica anormal en heteroreceptors 5-HT_{1A} postsinàptics a l'EPF i les regions límbiques, la mateixa disrupció del rafe pot portar a una disfunció en la senyalització serotoninèrgica a la medul·la espinal, permetent així un imput dolorós més permissiu procedent de la perifèria [699].

A diferència dels analgèsics opioides que produeixen una primera analgèsia resultat de l'acció directa sobre receptors opioides i, amb el temps, una sensibilització als estímuls nociceptius resultat indirecte de la primera analgèsia [700, 701], els agonistes 5-HT_{1A} podrien produir els efectes contraris, és a dir un primer dolor quan s'estimulessin els receptors nociceptius seguit d'una hipoalgèsia. Amb la cronicitat, al contrari del què passa amb els opioides, la hipoalgèsia cada vegada seria més important fins que l'analgèsia fos l'efecte majoritari, de manera que un estímul nociceptiu cooperaria amb altres per produir hipoalgèsia [702]. Així, l'ús d'agonistes 5-HT_{1A} mimetitzaria les accions de l'estimulació nociceptiva de receptors perifèrics per iniciar els mecanismes neuroadaptatius de tolerància inversa i cooperació nociceptiva. Aquesta tolerància inversa podria ser produïda per la desensibilització dels autoreceptors 5-HT_{1A} als nuclis del rafe sense alterar receptors postsinàptics com poden ser els receptors de la medul·la espinal, facilitant les accions de la serotonina a nivell postsinàptic [703, 704].

Hipòtesi de treball i objectius

La hipòtesi de treball general del grup postula que l'escorça prefrontal té un paper clau en el mecanisme d'acció de psicofàrmacs tals com els fàrmacs antipsicòtics i els antidepressius. Dins d'aquest marc general, la present tesi doctoral va ser basada en la hipòtesi que proposa que els psicofàrmacs modulen els circuits cortico-mesencefàlics que impliquen l'escorça prefrontal i els nuclis monoaminèrgics del mesencèfal, tenint un paper clau en aquesta modulació els receptors 5-HT_{1A} de l'escorça prefrontal.

Sota aquesta hipòtesi de treball, la present tesi va plantejar com a objectiu general l'estudi dels efectes produïts per fàrmacs agonistes i antagonistes del receptor de 5-HT_{1A} sobre l'activitat de neurones de l'escorça prefrontal que projecten als nuclis monoaminèrgics mesencefàlics i de neurones serotoninèrgiques del nucli del rafe dorsal.

Objectius concrets:

1. Caracteritzar l'efecte de l'administració sistèmica d'agonistes del receptor 5-HT_{1A} sobre l'activitat unitària i poblacional de l'escorça prefrontal medial.
2. Determinar les poblacions de receptors implicades en els efectes de l'agonista 5-HT_{1A} prototípic 8-OH-DPAT sobre l'activitat de l'escorça prefrontal medial.
3. Estudiar el lloc d'acció preferent de nous agonistes 5-HT_{1A} (F13640 i F15599) desenvolupats per al tractament de depressió i dolor.
4. Caracteritzar el nou antagonista 5-HT_{1A} DU 125530 a nivell electrofisiològic per tal d'examinar la possibilitat de la seva utilització per a la potenciació de la teràpia antidepressiva.

Materials i mètodes

MATERIALS

Animals

En els treballs d'aquesta tesi s'han utilitzat rates mascle albines adultes de la soca Wistar (*Rattus norvegicus*) de 230-320 g de pes, procedents d'Iffa Credo (Lyon, França).

Els animals han estat estabulats en grups d'un màxim de 4 almenys cinc dies abans de la seva utilització per permetre la seva aclimatació. L'ambient d'estabulació ha estat controlat amb un cicle de 12 hores de llum i 12 hores de foscor, a una temperatura estable de 22 ± 2 °C i aliment (pinso comercial) i aigua *ad libitum*.

Tots els procediments amb els animals s'han dut a terme seguint la legislació europea de "Protecció dels animals utilitzats per experiments i altres propòsits científics", d'acord amb les normes de la Unió Europea O.J. de E.C. L358/118/12/1986.

Fàrmacs

La Taula 7 mostra un resum dels fàrmacs utilitzats en aquesta tesi.

Taula 7. Resum dels fàrmacs utilitzats en la present tesi

Fàrmac	Activitat	Treball	Via	Proveïdor
8-OH-DPAT	Agonista 5-HT _{1A}	1, 4	Administració i.v.	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
R(+)-8-OH-DPAT	Agonista 5-HT _{1A}	1, 4	Administració i.v.	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
F15599	Agonista 5-HT _{1A}	2, 4	Administració i.v.	Pierre Fabre Medicament (Castres, França)
F13640	Agonista 5-HT _{1A}	3, 4	Administració i.v.	Pierre Fabre Medicament (Castres, França)
Fluoxetina	Inhibidor de la recaptació de 5-HT	5	Administració i.v.	Tocris (Bristol, UK)
DU 125530	Antagonista 5-HT _{1A}	5	Administració i.v.	Solvay Pharma (Brussel·les, Bèlgica)
WAY 100635	Antagonista 5-HT _{1A}	1, 2, 3, 4, 5	Administració i.v.	Sigma-RBI (St. Louis, MO)

Fàrmac	Activitat	Treball	Via	Proveïdor
Bicuculina	Antagonista GABA _A	1, 4	Elèctrode de registre, bloqueig local GABA _A	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Gabazina (SR 95531)	Antagonista GABA _A	1, 4	Elèctrode de registre, bloqueig local GABA _A	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Nomifensina	Inhibidor de la recaptació de NA i DA	1, 4	Administració i.p., protecció de lesió	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
PCPA	Inhibidor de la triptòfan-hidroxilasa	1, 4	Administració i.p., depleció de serotonina	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)
Citalopram	Inhibidor de la recaptació de 5-HT	1, 4	LCR artificial, canvia balanç alliberament/recaptació	H. Lundbeck A/S (Copenhagen-Valby, Dinamarca)

Excepte en el cas de la PCPA, es van preparar solucions mare alíquotades dels fàrmacs i es van congelar a -20°C fins al dia de la seva utilització. El dia de l'experiment, es van descongelar el nombre necessari d'alíquotes d'aquestes solucions i es prepararen les dissolucions.

REGISTRES ELECTROFISIOLÒGICS *IN VIVO* EN RATA ANESTESIADA

Preparació dels animals

L'anestèsia utilitzada en tots els experiments fou hidrat de cloral preparat en una solució salina al 0.9%. Els animals van ser anestesiats amb una dosi inicial d'hidrat de cloral (Merck, NJ, EUA) de 400 mg/kg i.p..

Quan l'animal estigué ben anestesiats es canulà la vena femoral dreta amb un catèter de polietilè (PE20, diàmetre intern 0.38 mm, diàmetre extern 1.09 mm, Becton Dickinson, NJ, EUA) acoblat a una xeringa d'1 ml per l'administració intravenosa de fàrmacs o, en cas necessari, de dosis extres d'anestèsia.

En els casos en què les condicions del registre demanaven una estabilitat superior (p.ex. registre d'interneurones GABAèrgiques i marcatge amb neurobiotina, treball 1) es realitzà una traqueotomia amb una cànula de polietilè (PE240, diàmetre intern 1.67 mm, diàmetre extern 2.42 mm, Becton Dickinson, NJ, EUA).

La temperatura de l'animal es mantingué estable a 37±0.5 °C gràcies a una manta termoreguladora situada entre l'animal i l'estereotàxic (RTM-1, Cibertec, Madrid).

L'anestèsia es va mantenir estable durant l'experiment administrant hidrat de cloral (50-70 mg/kg/h) amb una bomba de perfusió contínua i.p. (CMA, Suècia).

Seguidament es col·locà l'animal a l'estereotàxic (David Kopf, Turunga, CA, EUA) i la pell i els teixits que cobreixen la part posterior del crani van ser tallats per permetre la visió de Bregma i Lambda. Es va orientar el cap de l'animal de manera que aquests dos punts es trobessin anivellats.

Per minimitzar les pulsacions i la pressió intracerebral, es punxà la membrana atlanto-occipital. Posteriorment es va realitzar una petita craniotomia en les coordenades de l'àrea de registre i una altra en les coordenades de l'elèctrode d'estimulació, si era el cas. Les coordenades utilitzades en la present tesi es detallen en la Taula 8.

Taula 8. Coordenades (en mm) des de Bregma segons l'atles de Paxinos i Watson [851]. AP, anteroposteior; L, lateral; DV, dorsoventral.

Àrea	Acció	AP	L	DV	Angle
EPFm	Registre	+3.2 / +3.4	-0.5/-1	De -0.8 a -4	0
ÀTV	Estimulació	-5.8	-0.4	-8.2	0
NRD	Estimulació	-7.3	-3.1	-6.2	30°
NRD	Registre	Veure text		De -4.7 a -6.6	0
HPC	Registre	-6.3 / -7	-4	De -4 a -7	15°
EPFm	Estimulació	+3	-0.8	-3.5	0

En el cas dels registres de neurones serotoninèrgiques del NRD, la craniotomia fou una mica més gran que en els altres casos (un quadrat de 4 x 4 mm amb el centre a Lambda). La majoria de neurones serotoninèrgiques es troben properes a la línia mitja [202, 705] però anatòmicament trobem un eixamplament del sinus sagital just damunt d'aquesta àrea de registre. Per tal de permetre el descens de l'elèctrode de registre al NRD es va lligar el sinus sagital amb fil de seda i es va tallar i apartar de l'àrea de registre.

Preparació dels elèctrodes

Registre

Els elèctrodes de registre es van fabricar a partir de micropipetes de vidre capil·laritzades de 2.0 mm de diàmetre (Borosilicate glass capillaries, World Precision Instruments, Sarasota, FL, EUA) estirades amb un estirador de vidre vertical (Narishige PE-2, Narishige Scientific Instruments, Tokyo, Japó).

Els elèctrodes es van omplir amb NaCl 2 M o amb una solució de Pontamine Sky Blue en NaCl 2 M prèviament filtrats. Així vam obtenir elèctrodes amb una resistència inicial al voltant de 20 MΩ. En els treballs 1 i 4 i en els grups experimentals assenyalats, els elèctrodes contenien solucions de bicuculina 20 mM en NaCl 1M, gabazina 20 mM en NaCl 0.2 M (resistències inicials al voltant de 20 MΩ) per tal de bloquejar les entrades GABA_A a la neurona registrada o Neurobiotina 2% en NaCl 0.5 M (resistències inicials d'uns 40 MΩ) per tal de marcar juxtacel·lularment la neurona registrada al final de l'experiment.

La resistència inicial dels elèctrodes es va reduir *in vitro* formant un circuit tancat entre l'elèctrode i un fil de plata submergits en una solució salina 0.9% i connectats a un estimulador Cibertec CS-20 i una unitat d'aïllament de l'estímul Cibertec ISU 165 (Cibertec, Madrid). D'aquesta manera es van administrar polsos de corrent de 5 mA i 500 ms fins que la punta de l'elèctrode tingués una resistència d'entre 6 i 12 MΩ en els casos en què l'elèctrode contenia salí i pontamina, una resistència d'entre 10 i 12 MΩ en els casos en què l'elèctrode contenia bicuculina o gabazina i 15-22 MΩ en el cas dels elèctrodes amb Neurobiotina.

Estimulació

Els elèctrodes d'estimulació es van fabricar a partir de cables bipolars d'acer amb aïllant (California Fine Wire Company, Grover Beach, CA, EUA). Per l'extrem corresponent a l'àrea d'estimulació, es va treure l'aïllant de les dues puntes de l'elèctrode (400-600 μm) amb un bisturí i es van separar una distància de 100-150 μm. Per l'extrem utilitzat per a la connexió de l'elèctrode amb el sistema d'estimulació, l'aïllant es cremà aproximadament 1 cm permetent la separació de les dues puntes.

Una vegada posicionats en les coordenades adients gràcies a l'estereotàxic, la fixació dels elèctrodes d'estimulació al crani de l'animal es va realitzar mitjançant l'aplicació d'una primera capa de pegament de cianoacrilat (Super Glue-3 Gel, Loctite, Henkel, Düsseldorf-Holthausen, Alemanya) i una segona de resina autopolimeritzant de metil metacrilat (TAB 2000, Kerr, Salerno, Itàlia).

Sistemes

Registre extracel·lular *in vivo*

Quan l'animal estigué col·locat l'estereotàxic, la cirurgia acabada i, si s'escau, l'elèctrode d'estimulació fixat, es procedí a l'extracció de la *dura mater* visible en la craniotomia corresponent a l'àrea de registre mitjançant unes pinces de precisió (Dumont, Suïssa). En tot moment, l'àrea de cervell exposada es mantingué humida gràcies a l'aplicació de solució salina 0.9%.

Seguidament s'introduí dins el cervell de l'animal un elèctrode de registre baixat dorso-ventralment mitjançant un microposicionador hidràulic micromètric (David Kopf 640, Tujunga, CA, EUA) fins al DV escaient.

Es muntà un circuit tancat entre un fil de plata situat dins de l'elèctrode de registre i un terra col·locat en el teixit muscular del coll de l'animal. Tots dos cables porten el senyal a una cèl·lula receptora del senyal elèctric.

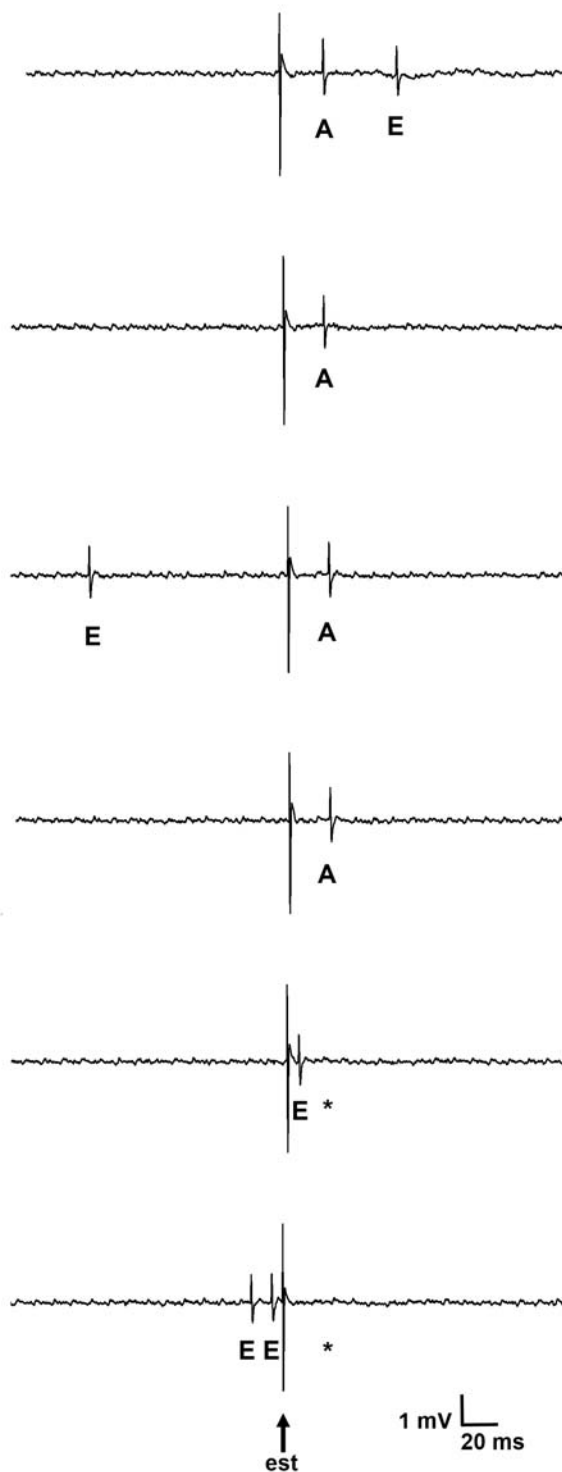
Breument, la senyal és amplificada deu vegades per un amplificador Neurodata IR283 (Cygnus Technology Inc., Delaware Water Gap, EUA). Seguidament la senyal es divideix per: i) l'observació directa de la senyal elèctrica en un oscil·loscopi (HM 205-3, HAMEG Instruments, Barcelona), ii) el processat de la senyal a àudio (AUMON 14, Cibertec, Madrid) i iii) la posterior amplificació i filtratge en un postamplificador Cibertec Ampli 63 AC (Cibertec, Madrid). Hi ha dues entrades al postamplificador que reben tractaments diferents per a permetre simultàniament el registre del potencial de camp (*local field potential*, LFP) i el registre unitari de la descàrrega neuronal. El postamplificador amplifica la senyal del LFP 100 vegades i la filtra per permetre el pas de senyal entre 0.1 i 100 Hz. En el cas del registre unitari de la descàrrega neuronal, la senyal és amplificada també 100 vegades, però en aquest cas és filtrada per permetre el pas de la senyal entre 30 Hz i 1 kHz. Per al registre unitari de les interneurons GABAèrgiques FS, es van ampliar el marge de senyal fins a 10 kHz per tal de facilitar la identificació i registre d'aquest tipus neuronal.

Posteriorment el senyal elèctric s'envia a la interfase (DAT Micro1401, Cambridge Electronic Design, CED; Cambridge, Anglaterra) que transformarà la informació analògica en digital per permetre l'adquisició (freqüència de mostreig de 25 kHz pel registre unitari i 2.5 kHz pel registre del LFP) i emmagatzematge de dades pel programa Spike2 (CED, Cambridge, UK). El processat i l'anàlisi de dades es du a terme de manera *off-line*.

Estimulació elèctrica

Per als experiments en els quals es du a terme la identificació antidròmica de les neurones (veure següent apartat) es connectà cadascun dels pols exteriors de l'elèctrode d'estimulació implantat a una unitat d'aïllament de l'estímul Grass SIU 5 (Grass Medical Instruments) connectada a un estimulador Grass S-48.

Identificació de les neurones



Neurones piramidals de projecció

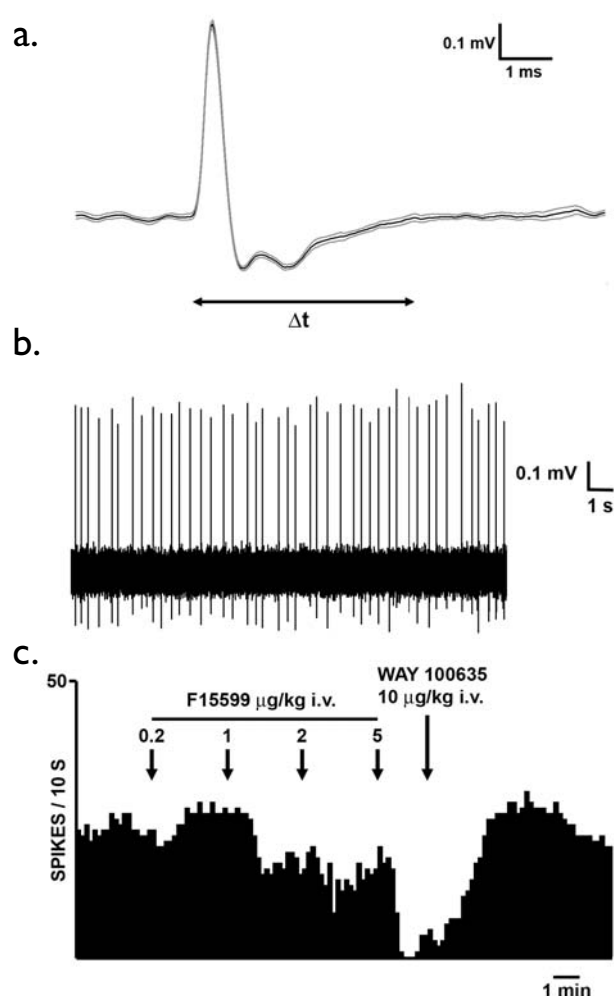
Les neurones piramidals d'EPFm i d'hipocamp es van identificar com a neurones de projecció a ÀTV o NRD i EPFm, respectivament. Un cop l'elèctrode de registre es trobà en l'àrea desitjada, la identificació es dugué a terme de manera sistemàtica gràcies a l'estimulació de l'àrea de projecció: l'observació de potencials antidròmics i la col·lisió d'aquests potencials amb descàrregues espontànies de la neurona foren criteris imprescindibles per a la identificació i per tant, per al registre de la neurona.

Amb aquesta metodologia [706], si la neurona registrada projecta a l'àrea d'estimulació, es genera un potencial antidròmic que viatja a través de l'axó de la neurona des de l'àrea d'estimulació fins al cos cel·lular situat a l'àrea de registre. El retard entre l'estímul i el potencial antidròmic registrat es manté constant. La descàrrega espontània (potencials d'acció) de la neurona podrà causar la supressió (col·lisió) del potencial antidròmic si aquests dos potencials coincideixen en algun punt de l'axó, impeding el registre del potencial antidròmic en l'àrea de registre (Fig. 15).

Fig 15. Exemple de registre d'una neurona piramidal d'EPFm de projecció a l'ÀTV. L'estimulació de l'ÀTV (est) provoca un potencial antidròmic (A) a una latència fixa, en aquest cas de 20 ms. La descàrrega espontània de la neurona d'EPFm (E) en l'interval de propagació del potencial antidròmic provoca la col·lisió dels potencials (*) i evita el registre del potencial antidròmic.

En el cas de les neurones piramidals d'EPF de projecció, s'estimulà l'ÀTV o el NRD amb polsos quadrats de 0.2 ms i intensitat de corrent de fins a 2mA, a una freqüència de 0.9Hz. En el cas de les neurones piramidals d'hipocamp de projecció a l'EPFm, s'estimulà l'EPFm amb polsos quadrats de 0.3 ms i intensitat de corrent de fins a 1 mA a una freqüència de 0.5 Hz. Cal destacar que aquestes neurones no descarreguen sota els efectes de l'hidrat de cloral, per aquest motiu, quan l'elèctrode s'acosta a una neurona d'hipocamp només se sent un increment del soroll de fons, que ens indicarà la presència d'una neurona i, per tant, que podem estimular l'EPFm per comprovar si és una neurona de projecció a aquesta àrea.

Neurones serotoninèrgiques de NRD



En els treballs 2 i 3, les neurones serotoninèrgiques es van identificar segons els criteris descrits per Wang i Aghajanian [202] (Fig. 16):

- Descàrrega espontània molt regular amb una freqüència de 0.3-3.4 Hz
- Potencials d'acció bi- o tri- fàsics de 2 a 5 ms de durada
- Ocasionalment, presència trens de 2 a 4 potencials d'acció separats menys de 20 ms [205, 707].

Un dels trets característics de les neurones serotoninèrgiques és la inhibició després de l'administració d'agonistes de l'autoreceptor 5-HT_{1A}.

Fig 16. Alguns trets característics de les neurones serotoninèrgiques de NRD. **a)** Línia negra, mitja de 10 potencials d'acció d'una neurona serotoninèrgica de NRD de més de 3 ms de durada (Δt). Línies grises, error estàndard. **b)** Registre de la mateixa neurona serotoninèrgica del NRD destacant la regularitat de la seva descàrrega. **c)** Histograma de freqüència mostrant la inhibició de la mateixa neurona serotoninèrgica davant de l'agonista 5-HT_{1A} F15599 i la posterior reversió per l'antagonista 5-HT_{1A} per WAY 100635. La freqüència de descàrrega basal de la neurona és d'uns 2.3 Hz.

Neurones GABAèrgiques FS d'EPFm de rata

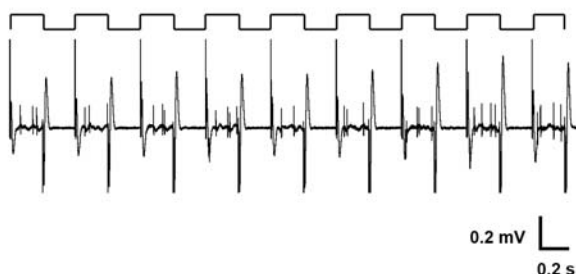
Les neurones GABAèrgiques d'EPFm s'identificaren a) electrofisiològicament i b) per tècniques histològiques.

La identificació electrofisiològica es dugué a terme primerament abans d'iniciar el registre i de manera més exhaustiva *off line* avaluant la freqüència de descàrrega i la durada del potencial d'acció. Les interneurones GABAèrgiques FS tenen freqüències de descàrrega elevades i potencials d'acció curts [708].

Per a la identificació per tècniques histològiques, després del registre es procedí al marcatge juxtacel·lular de la neurona registrada. En aquests casos, els elèctrodes de registre havien de contenir neurobiotina (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA). En acabar l'experiment, l'elèctrode de registre s'acostà tant com fos possible a la neurona i s'administraren polsos positius quadrats de 200 ms i 1-6 nA de corrent a través d'ell fins aconseguir que la descàrrega de la neurona fos dirigida per aquests polsos (Fig. 17), mantenint així la neurona durant 5-20 min. Això fa que la neurona es despolaritzi i permet l'entrada de la neurobiotina a l'interior de la cèl·lula. Posteriorment, per acotar l'àrea on es trobava situada la neurona, es canvià l'elèctrode per un elèctrode de registre amb Pontamina Sky Blue i es feren dues marques microiontoforèticament 200 μm per davant i per darrere del lloc de marcatge de la neurona (veure "Marcatge de l'àrea de registre").

La rata es sacrificà amb una sobredosi d'anestèsia i es va perfondre utilitzant 240 ml de solució salina i 240 ml de formalina 10%. S'extregué el cervell, es conservà durant almenys dues hores en solució de formalina 10% i es deixà tota la nit en solució de sucrosa 10% en PBS. Seguidament es va congelar en isopentà a -30°C i es conservà al congelador a -80°C fins al seu processat.

a.



b.



Fig 17. (pàgina anterior) Exemple de marcatge juxtacel·lular amb neurobiotina en una neurona piramidal d'EPFm. **a)** Traça de registre durant l'administració de polsos de corrent (línia superior) mostrant com la descàrrega de la neurona és dirigida pels polsos. **b)** Resultat del marcatge juxtacel·lular de la mateixa neurona piramidal d'EPFm. La neurobiotina en aquest cas va ser detectada en teixit no congelat amplificant el marcatge amb el kit ABC (Vector Labs), amb avidina acoblada a peroxidasa i utilitzant DAB i H₂O₂ com a substrats per produir un precipitat de color marró.

Detecció de neurobiotina i hibridació *in situ* per la identificació histològica de les neurones GABAèrgiques registrades

Per tal d'identificar histològicament les interneurons GABAèrgiques d'EPFm es va posar a punt, en col·laboració amb Giuseppe Mocchi, la combinació d'un assaig histoquímic per la detecció de neurobiotina (per tal de marcar la neurona registrada) amb una hibridació *in situ* per la GAD 65 i 67 (per comprovar que aquesta neurona era GABAèrgica). Per dur a terme aquesta combinació, el protocol inclou primerament els passos per a la hibridació *in situ* radioactiva seguit de la detecció de la neurobiotina per histoquímica i el posterior revelat de la radioactivitat.

Es van obtenir seccions histològiques coronals dels cervells de 14 µm utilitzant un micròtom-criòstat (Microm HM500 OM, Walldorf, Alemanya) i es van col·locar sobre portaobjectes pretractats amb Histogrip (Zymed Laboratories Inc., CA, EUA) per emmagatzemar-los a -20°C fins al moment de ser processats.

Les seccions es van descongelar, assecar i fixar amb paraformaldehid. Després de fer-los diferents rentats, es van tractar amb pronasa (24 U/ml, Calbiochem, Gibstown, NJ, USA), l'activitat de la qual es va parar per immersió en una solució de glicina (2 mg/ml en 1x PBS). Posteriorment els teixits es van rentar en PBS i es van deshidratar en etanol.

Per permetre la hibridació de les seccions amb l'oligonucleòtid per la detecció de la GAD, les seccions es van incubar tota la nit a 42°C en una cambra humida amb una solució tamponada que contenia aproximadament 2×10^7 cpm/ml d'oligonucleòtid, prèviament marcat amb [³³P] ([³³P]-dATP, >2500 Ci/mmol, PerkinElmer, Boston, EUA) i purificat per cromatografia (ProbeQuant G-50 Micro Columns, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Es realitzaren rentats per eliminar l'excés de sonda no hibridada o unida inespecíficament al teixit i seguidament es passà a fer l'assaig histoquímic per a la detecció de la neurobiotina mitjançant el kit comercial ABC (Vector Labs, CA, EUA). Aquest kit d'avidina-biotina amplifica la senyal formant grans complexos amb la neurobiotina. L'avidina té unida peroxidasa que en incubar-se amb peròxid d'hidrogen i DAB (diaminobenzidina, Sigma-

Aldrich, MO, EUA) produeix com a producte un precipitat de color marró, permetent la visualització de la neurona marcada amb neurobiotina.

Per detectar el marcatge a nivell cel·lular de l'ARNm de la GAD, es va procedir a la immersió de les seccions en emulsió fotogràfica líquida (*dipping*) de sals de plata (emulsió nuclear K5, Ilford, UK), en absència de llum i a 4°C durant dues setmanes. Passat aquest temps els portaobjectes van ser finalment revelats amb D-19 (Kodak, NY, USA) i fixats en Ilford Hypam (Ilford, Knutsford, Cheshire, UK). Posteriorment es van muntar en Mowiol (Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA).

Farmacologia

Administració intravenosa de fàrmacs

El dia de l'experiment, les alíquotes mare dels fàrmacs necessaris emmagatzemats a -20°C es van descongelar i dissoldre a les concentracions adequades per a l'administració i.v. amb volums d'injecció de com a màxim 1 ml / kg.

Un cop identificada la neurona desitjada, es registrà durant 5 minuts activitat unitària i de LFP basal i seguidament es procedí a l'administració de fàrmacs per la cànula de la vena femoral cada 3 minuts. En general els protocols contemplaren l'administració d'una o varies dosis d'un fàrmac i l'administració de l'antagonista adient per comprovar l'especificitat dels efectes observats.

Bloqueig local de receptors GABA_A

En els treballs 1 i 4 es va utilitzar el bloqueig local de receptors GABA_A com a eina experimental. En dos grups experimentals s'utilitzà o bé gabazina (20 mM en salí 0.2 M) o bé bicuculina (20 mM en salí 1 M) per omplir els elèctrodes de registre. El diàmetre de la punta dels elèctrodes (5-7 µm) permeté la sortida per difusió passiva d'aquests fàrmacs durant el registre i, per tant, el bloqueig local dels receptors GABA_A de la neurona registrada. Aquesta metodologia ja havia estat utilitzada anteriorment per diferents grups [709, 710].

Depleció de serotonina

En els treballs 1 i 4, es va tractar un grup experimental amb *p*-clorofenilalanina (PCPA). Aquest fàrmac és un inhibidor de la triptòfan hidroxilasa, enzim necessari per la síntesi de serotonina. L'administració d'una sola dosi de 300 mg/kg i.p. de PCPA produeix, segons la bibliografia [711], una disminució estable dels nivells de serotonina del voltant del 80% entre el segon i el quart dia després de la injecció.

Per tal de protegir la síntesi de catecolamines, s'administrà un inhibidor de la recaptació de NA i DA, reduint-se així els efectes de la PCPA sobre aquests sistemes [712].

El tractament va consistir en una administració de 300 mg/kg i.p. de PCPA (preparada al moment) una hora després de la protecció dels sistemes catecolaminèrgics amb una injecció de 10 mg/kg i.p. de nomifensina. Els experiments es van dur a terme entre 48 i 96 hores després de l'administració d'aquests fàrmacs.

Després dels experiments de registre, es va sacrificar els animals amb una sobredosi d'hidrat de cloral i van separar les dues EPFm dels dos hemisferis. Aquestes es van congelar a -80°C fins al dia del processament del teixit. Breument, s'afegí tampó d'homogeneïtzació i es sonicaren i centrifugaren les mostres per a l'extracció del sobrenedant. Aquest sobrenedant s'analitzà per obtenir la quantificació dels nivells de serotonina, dopamina, noradrenalina i els seus metabòlits en teixit mitjançant HPLC tal com descriu Adell et al. [198]. Els nivells es van calcular com el % de la mitja de diferents animals controls (n=9) no tractats amb PCPA. Els nivells de serotonina dels animals control foren del voltant de 2510 pmol/g de teixit, mentre que en el cas dels animals lesionats foren de prop de 130 pmol/g (aprox. 6% de serotonina respecte els animals controls; controls n=9, depletats n=10).

Histologia

Marcatge de l'àrea de registre

Al finalitzar els experiments, en els casos en que l'elèctrode de registre contenia Pontamine Sky Blue, es va marcar el punt de registre mitjançant un dipòsit iontoforètic d'aquest colorant. Es va administrar una corrent catiònica (20 mA) durant 30 minuts. D'aquesta manera, després del processat del cervell, s'observà una marca de 5-10 micròmetres visible per microscòpia òptica en el lloc on s'havia efectuat el registre. Aquest procediment també s'utilitzà després dels experiments de registre i marcatge juxtacel·lular amb elèctrodes plens de Neurobiotina, canviant l'elèctrode per un ple de Pontamine Sky Blue per tal d'acotar l'àrea on s'havia marcat la neurona.

Verificació de l'àrea de registre i estimulació

Al finalitzar els experiments els animals es van eutenasiar amb una sobredosi d'hidrat de cloral i es van perfondre amb solució salina seguida de formalina 10% (Toocris, Bristol, UK) conservant el cervell en solució de formalina 10% per una verificació més acurada o bé es va extreure el cervell i es va congelar amb neu carbònica per conservar-lo congelat a -80°C. Posteriorment, els cervells es van tallar de forma coronal en seccions de 70 µm amb vibràtom o en seccions de 50 µm amb un criòstat, respectivament.

Els talls obtinguts es van muntar en portaobjectes, es van assecar a l'aire entre 24 i 48 hores i es van tenyir amb Neutral Red. El procediment de la tinció consistí en incubar els portaobjectes en una solució de 5 g de colorant en 500 ml d'aigua durant 10-30 minuts. Seguidament s'efectuaren rentats consecutius en un gradient creixent d'etanol (70, 95 i 100%) i un últim tractament de xilol. Per últim, els portaobjectes es van cobrir amb un cobreobjectes i es van visualitzar al microscopi òptic (Fig. 18).

D'aquesta manera es va comprovar la situació dels elèctrodes de registre (en els casos en què s'havia marcat el punt de registre amb Pontamina) i la situació dels elèctrodes d'estimulació. Els casos en que es detectava que la situació de qualsevol dels elèctrodes no era l'apropiada foren descartats dels estudis.

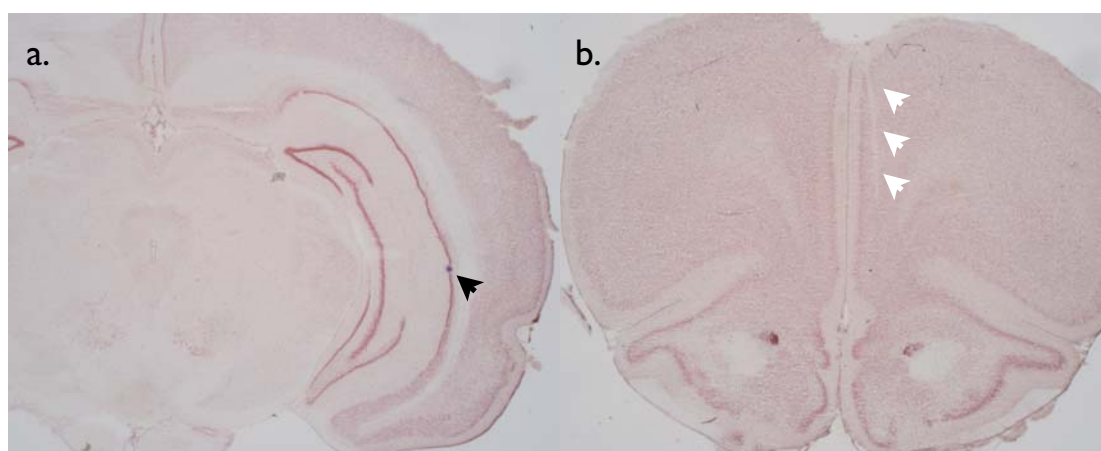


Fig 18. Talls histològics coronals de cervell de rata tenyits amb Neutral Red. **a)** Exemple de marcatge de l'àrea de registre amb Pontamine Sky Blue en l'hipocamp (punta de fletxa negra). **b)** Visualització de l'elèctrode d'estimulació en l'EPFm (puntes de fletxa blanques).

Anàlisi de dades

L'anàlisi de les dades obtingudes durant els registres es va dur a terme mitjançant el mateix programa Spike 2 (Cambridge Electronic Design, CED, Cambridge, UK).

Anàlisi de la freqüència de descàrrega

La freqüència de descàrrega correspon al nombre de potencials d'acció per segon i es pot representar en un histograma de freqüències.

La freqüència de descàrrega basal es calculà fent la mitja dels 5 minuts d'activitat basal abans de l'administració de qualsevol fàrmac. L'administració de fàrmacs es va dur a terme cada 3 minuts i s'utilitzà el tercer minut després de la injecció per calcular la freqüència de descàrrega resultat de l'administració i.v. del fàrmac.

S'han considerat respostes al tractament augments o disminucions de la freqüència de descàrrega majors del 30% de la freqüència basal.

Anàlisi del patró de descàrrega

En aquesta tesi vam analitzar el patró de descàrrega de les neurones d'EPFm segons el mètode utilitzat per Laviolette (2005). Es defineix un tren de potencials d'acció (TPA) com la descàrrega de dos o més potencials d'acció amb intervals entre ells (*interspike interval, ISI*) menors de 45 ms (Fig. 19).

Es va calcular el nombre de potencials descarregats en TPA en un minut, el nombre mig de potencials dins d'un TPA, el percentatge de potencials descarregats en forma de TPA, la durada dels TPA i l'interval entre ells amb dades corresponents al mateix interval temporal que l'utilitzat per a l'anàlisi de la freqüència de descàrrega.

En el cas de les neurones serotoninèrgiques del NDR s'analitzà la regularitat de la descàrrega quantificant el coeficient de variació.

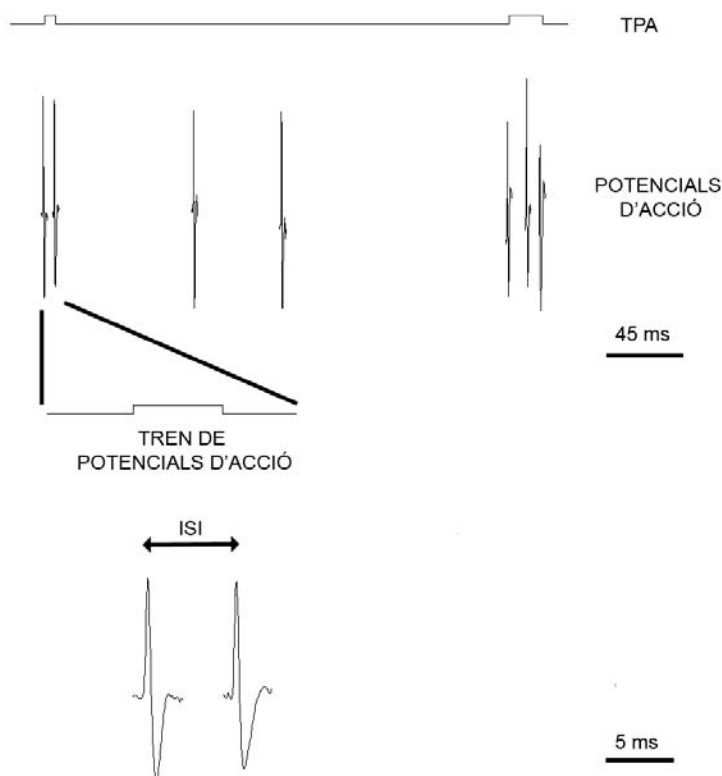


Fig 19. Exemple de patró de descàrrega d'una neurona piramidal d'EPFm de projecció a l'ÀTV. La línia superior marca dos trens de potencials d'acció (TPA) de dos i tres potencials. Sota d'aquesta tenim la detecció del potencials d'acció pròpiament dits i l'amplificació d'un dels TPA, mostrant com l'interval entre espigues (ISI) es menor de 45 ms (criteri que vam utilitzar per a definir un TPA).

Anàlisi dels paràmetres del potencial d'acció

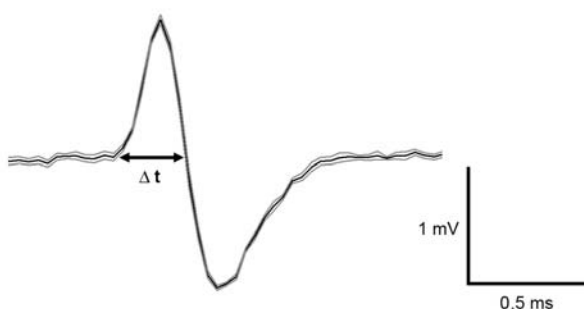


Fig 20. Exemple del potencial d'acció d'una interneurona GABAèrgica. Per al càlcul de durada de la fase despolaritzant del potencial d'acció es va fer la mitja de la forma de 10 potencials d'acció i es va determinar Δt . La línia negra il·lustra la mitja de 10 potencials d'acció i les línies grises l'error estàndard.

La transformada ràpida de Fourier (*Fourier Fast Transform*, FFT) que permet quantificar la composició freqüencial de la senyal.

La FFT és una eina matemàtica que transforma un bloc de dades a un grup d'ones cosinus. Vam limitar la mida dels blocs que s'havien de transformar a 8192 (mida de FFT) i la resolució a 0,3 Hz.

Les dades de l'ona poques vegades es repeteixen cíclicament; per evitar les discontinuïtats entre el final d'un bloc i el començament del següent s'ajusten tant el principi d'un bloc com el final del següent a zero, modificant les finestres de dades. Hi ha diferents maneres de fer les finestres, de les quals nosaltres vam utilitzar l'anomenada Hamming.

Vam representar les dades com espectres de freqüència, calculant l'àrea sota la corba de les freqüències de 0,3 a 4 Hz.

MICRODIÀLISI INTRACEREBRAL *IN VIVO* EN RATA ANESTESIADA

En aquest apartat detallarem els mètodes utilitzats en els experiments de microdiàlisi intracerebral del laboratori on s'ha dut a terme en aquesta tesi, per tant, els corresponents als treballs 1 i 4.

Preparació de les sondes de microdiàlisi

Per una descripció detallada de la metodologia utilitzada per fabricar sondes de microdiàlisi i del procediment per al seu implant, podem referir-nos a Adell i Artigas [713].

En el treball 1 es va calcular la durada del potencial d'acció tant de neurones piramidals com de neurones GABAèrgiques per tal d'identificar-les electrofisiològicament. Es va calcular fent la mitja dels 10 últims potencials d'acció del basal i mesurant la durada de la fase despolaritzant (Fig. 20).

Anàlisi del potencial de camp

Per l'anàlisi espectral del potencial de camp es va aplicar l'algoritme de la

Preparació dels animals

Per a la implantació de les sondes, els animals es van anestesiar amb pentobarbital sòdic (60 mg/kg i.p.) i es van col·locar en un aparell estereotàxic, mantenint la temperatura estable gràcies a una manta elèctrica. Es va fer una craniotomia a la zona adient, en aquest cas a les coordenades corresponents a EPFm (AP +3.2 mm; L -0.8 mm), i tres petites craniotomies per a col·locar-hi dos cargols. Es baixà una sonda de microdiàlisi amb una membrana de 4 mm de llargada fins al DV corresponent (DV -6 mm) i seguidament, es fixà la sonda amb ciment dental tot cobrint també la zona dels cargols.

Obtenció de mostres

Les mostres es van obtenir 18-20h després de l'implant de la sonda per permetre la recuperació de l'animal després de la cirurgia i l'estabilització dels nivells basals de serotonina [714].

Els animals es van anestesiar amb una dosi inicial d'hidrat de cloral de 400 mg/kg i.p. i se'ls va canular la vena femoral utilitzant el mateix protocol que en els experiments d'electrofisiologia. Igual que en els experiments d'electrofisiologia, els nivells d'anestèsia es mantingueren constants amb una bomba de perfusió (50-70 mg/kg/h d'hidrat de cloral i.p.) i la temperatura gràcies a una manta elèctrica.

Tot seguit, es va perfondre el sistema amb líquid cefaloraquidi (LCR) artificial (en mM: NaCl 125; KCl 2.5; MgCl₂ 1.18; CaCl₂ 1.26). En alguns casos (veure Taula 9), es va afegir citalopram 10 µM a l'LCR artificial per tal de magnificar les diferències entre l'alliberament i la recaptació de serotonina [715, 716]. L'LCR artificial passa fins a la membrana de diàlisi on es produeix la diàlisi pròpiament dita i es recull la mostra posteriorment en un vial de polietilè de 250 µl.

Taula 9. Procediments emprats en diferents experiments de microdiàlisi intracerebral.

Experiment	Citalopram	Flux	Volum mostra	Temps recollida	Nombre de basals	Administració de fàrmacs
I	10 µM	3 µl/min	12 µl	4 minuts	20	Cada 12 minuts
II	10 µM	3 µl/min	36 µl	12 minuts	7	Cada 12 minuts
III	No	1.65 µl/min	33 µl	20 minuts	6	Cada 7 minuts
IV	No	1.65 µl/min	33 µl	20 minuts	6	Cada 5 minuts

Els primers 10 minuts de perfusió el flux es mantingué a 100 µl/min per tal de netejar i omplir els tubs i connexions del sistema. Seguidament, el flux es reduí al flux corresponent a l'experiment per tal d'estabilitzar l'intercanvi a la membrana de diàlisi. Després de 60 minuts d'estabilització, es procedí a la recollida de mostres en intervals variables segons l'experiment, obtenint-se així diferents volums de mostra.

Es van recollir un nombre variable de fraccions corresponents a la situació basal segons l'experiment i es procedí a l'administració dels mateixos fàrmacs (8-OH-DPAT i WAY 100635) utilitzats en els experiments d'electrofisiologia també per via intravenosa.

Histologia

Un cop acabat l'experiment, es va sacrificar els animals mitjançant una sobredosi d'anestèsia i es passà a través de la sonda de diàlisi una solució de colorant Fast Green (Sigma Chemical, UK) per tal de marcar la zona de diàlisi. Després d'uns minuts, es va extreure el cervell i es va congelar a -20°C.

Per tal de comprovar la correcta situació de les sondes es van realitzar talls coronals als nivells adequats mitjançant un bisturí i visualització directa.

Anàlisi de mostres

Les mostres es van analitzar mitjançant un sistema de cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) segons el mètode descrit per Adell i Artigas [713].

Per la separació de les mostres es va utilitzar una columna de 3 µm de tamany de partícula, 10 cm de longitud i 2 mm de diàmetre (Waters, Spherisorb EUA). Es va analitzar els nivells de serotonina i àcid 5-hidroxiindolacètic (5-HIAA) mitjançant un detector electroquímic HP 1049A (Hewlett-Packard, CA, EUA) amb un potencial d'oxidació de 0.6 V. El flux de treball fou de 0.3 ml/min. El temps de retenció per la serotonina va ser de 4.5 min i el del 5-HIAA de 3.4 min. El límit de detecció fou de 3 fmols. Els cromatogrames obtinguts es van processar amb el programa informàtic TotalChrom Navigator (Perkin Elmer, MA, EUA).

Els resultats dels anàlisis de les mostres mitjançant l'HPLC es van obtenir en forma de fmols/fracció i es van expressar en forma de percentatge de la mitja de basals.

ANÀLISI ESTADÍSTIC

L'anàlisi estadístic dels resultats es va realitzar generalment amb el programa Statistica (StatSoft inc, versió 4.5). El programa GraphPad (GraphPad Software Inc., versió 4.0) s'ha utilitzat per calcular les ED₅₀ d'inhibició de les neurones serotoninèrgiques (treballs 2 i 3) i

el programa Primer of Biostatistics (Stanton A. Glantz, McGraw-Hill Inc., versió 3.01) per a l'anàlisi de χ^2 (treball 1).

En general, per mesurar els efectes del tractament s'han utilitzat anàlisis de la variància (ANOVA) d'una via o t-Student de dades aparellades. Per mesurar efectes entre grups tractats diferents, s'han utilitzat anàlisis de la variància múltiples (MANOVA). En tots els casos, s'establí un grau de significació de 0.05 (límit de confiança major del 95%).

Resultats

TREBALL 1

L'agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT provoca excitacions de les neurones piramidals d'EPFm a través de l'acció preferent sobre les interneurons GABAèrgiques

Resum

Antecedents i objectiu: Els receptors inhibitoris 5-HT_{1A} són expressats en moltes regions cerebrals, incloent l'EPF, àrea clau en la fisiopatologia i el tractament de l'esquizofrènia. L'activació d'aquests receptors pels antipsicòtics atípics sembla ser crucial pels avantatges d'aquests fàrmacs en el tractament dels símptomes negatius i els dèficits cognitius. La serotonina endògena inhibeix les neurones piramidals d'EPF mentre que els agonistes 5-HT_{1A} paradoxalment activen aquestes neurones. En aquest treball examinem les diferents possibilitats per explicar l'efecte diferencial de la serotonina i els agonistes 5-HT_{1A} sobre les neurones piramidals de l'EPF.

Aproximació experimental: Registres extracel·lulars unitaris, experiments de microdiallisi intracerebral i estudis d'expressió de *c-fos*, tots ells *in vivo* en rata anestesiada amb hidrat de cloral.

Resultats clau: La (\pm)8-OH-DPAT (0.75-60 μ g/kg i.v.) produí patrons de resposta bifàsics en les neurones piramidals d'EPFm en la situació control, majoritàriament amb excitacions a dosis baixes i inhibicions a dosis més altes. L'administració de l'isòmer (+)R-8-OH-DPAT va provocar patrons similars. L'efecte excitador de la (\pm)8-OH-DPAT (7.5 μ g/kg i.v.) va anar en paral·lel a un augment en l'expressió de *c-fos* a les neurones piramidals d'EPF, però no a les interneurons GABAèrgiques. Els receptors 5-HT_{1A} de l'hipocamp o els autoreceptors del rafe semblen no participar en l'efecte excitador de la (\pm)8-OH-DPAT. El bloqueig local de les entrades GABA_A a les neurones piramidals registrades alterà els patrons de resposta, reduint el percentatge d'activacions a dosis baixes i fent les neurones més insensibles a (\pm)8-OH-DPAT. La (\pm)8-OH-DPAT provocà una inhibició significativa de les interneurons GABAèrgiques *fast-spiking* d'EPFm a les dosis que les neurones piramidals d'EPFm s'excitaren.

Conclusions i implicacions: Aquests resultats recolzen la idea que les interneurons GABAèrgiques estan implicades en els efectes de l'administració sistèmica de 8-OH-DPAT sobre les neurones piramidals d'EPFm. Fàrmacs amb acció preferent sobre aquestes interneurons GABAèrgiques podrien ser una diana interessant per al tractament dels dèficits cognitius i els símptomes negatius de l'esquizofrènia gràcies a l'activació del bucle EPF-ÀTV-EPF.

**The 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT excites prefrontal cortex
pyramidal neurons through a preferential activation of 5-HT_{1A}
receptors on GABA interneurons**

L. Lladó-Pelfort^{1,2}, N. Santana^{2,1}, V. Ghisi^{1,2}, G. Mocci¹, R. Cortés^{1,2,3,4},
F. Artigas^{1,2,3} and P. Celada^{1,2,3}

¹Department of Neurochemistry and Neuropharmacology

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), IDIBAPS

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)

³Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades

Neurodegenerativas (CIBERNED)

Barcelona, Spain

Abbreviated title: Actions of 8-OH-DPAT on cortical activity

9 figures, 0 tables; 42 pages

Abstract: 250 words; Introduction: 562 words; Discussion: 1725 words

Keywords: antipsychotic, dopamine, prefrontal cortex, schizophrenia, serotonergic1A receptor, ventral tegmental area

Corresponding author: Pau Celada, PhD; Dept. of Neurochemistry, Institut d' Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), IDIBAPS, Rosselló, 161, 6th floor,

08036 Barcelona, Spain. Phone: +3493-363 8314; Fax: +3493-363 8301; e-mail: pcpnqi@iibb.csic.es

Acknowledgements

Work supported by grants SAF 2007-62378, FIS PI060264 and FIS PI09/1245. L.L-P is supported by a JAE fellowship from CSIC. P.C. is supported by the Researcher Stabilization Program of the Health Department of the Generalitat de Catalunya. We thank Leticia Campa, Mónica Gutiérrez, Noemí Jurado and Verónica Paz for skilful technical assistance.

Abstract

Serotonin (5-HT) plays a major role in the pathophysiology and treatment of several psychiatric disorders. 5-HT_{1A} receptors (5-HT_{1A}R) are the main inhibitory 5-HT receptors and are expressed in many brain regions, including the prefrontal cortex (PFC), a key area in schizophrenia. Activation of 5-HT_{1A}R by atypical antipsychotics like clozapine appears to be critical for the superior effects of these agents on negative symptoms and cognitive deficits compared with classical antipsychotics. 5-HT_{1A}R are expressed by pyramidal neurons and GABAergic interneurons in PFC. Endogenous 5-HT inhibits PFC pyramidal neurons via 5-HT_{1A}R whilst systemic administration of 5-HT_{1A} agonists paradoxically increases their activity, an effect that appears to be critical for the enhancement of cortical dopaminergic transmission induced by atypical antipsychotics. Here we examined potential reasons accounting for the differential effect of 5-HT and 5-HT_{1A}R agonists on pyramidal neuron activity by examining the effect the prototypical 5-HT_{1A}R agonist 8-OH-DPAT on PFC pyramidal neurons projecting to the ventral tegmental area (VTA) and fast-spiking GABAergic interneurons using single unit extracellular recordings. GABAergic neurons were identified by their firing characteristics, in some experiments they were also identified and by juxtacellular labeling with neurobiotin and further *in situ* hybridization of GAD₆₅ mRNA.

(±)8-OH-DPAT (0.75-60 µg/kg i.v.) evoked a bell-shaped dose-response curve in the control situation (n = 32), mainly with excitations at low doses and inhibitions at higher doses. The main excitatory effect of 8-OH-DPAT (7.5 µg/kg i.v.) on PFC pyramidal neurons was accompanied by an increase in *c-fos* expression in the same neuronal type, but not in GABA interneurons, as assessed by double *in situ* hybridization. Activation of 5-HT_{1A} autoreceptors or postsynaptic hippocampal 5-HT_{1A}R do not appear to contribute to the excitatory action of 8-OH-DPAT. The more active enantiomer (+)8-OH-DPAT also exerted a bell-shaped dose response. However, the local blockade of GABA_A inputs onto recorded pyramidal neurons with gabazine (SR-95531) markedly altered response patterns, reducing the percentage of excitations at low doses and making neurons less responsive to (±)8-OH-DPAT (control n = 15, gabazine n = 14; X² p<0.01). Moreover, (±)8-OH-DPAT administration

significantly inhibited the cell firing of fast-spiking GABA interneurons (n =20) at the doses exciting pyramidal neurons ($p < 0.02$). Overall, these results indicate that GABAergic interneurons are involved in the effects of systemically administered 8-OH-DPAT in PFC pyramidal neurons and subsequent downstream changes in subcortical structures receiving excitatory inputs from PFC, such as the VTA dopaminergic neurons.

Abbreviations: 5-HT, 5-hydroxytryptamine or serotonin; DA, dopamine, dopaminergic; mPFC, medial prefrontal cortex; VTA, ventral tegmental area

Introduction

Schizophrenia is a devastating illness that affects about 1% of the population worldwide. Classical antipsychotic drugs are dopamine (DA) D2 receptor blockers which display severe motor side effects and lack efficacy for negative / cognitive symptoms. Second generation (atypical) antipsychotic drugs (APD) show less or no motor side effects due to lower blockade of DA D2 receptors and are superior to classical drugs for treating non-psychotic symptoms, particularly clozapine, the prototypical APD (Woodward et al., 2005, Kern et al., 2006, Sumiyoshi et al., 2006; Leucht et al., 2009). This superiority may derive from the preferential targeting of several 5-HT receptors by APDs, including 5-HT_{2A/2C} receptors (Bymaster et al., 1996; Arnt and Skarsfeldt; 1998). In particular, the activation of 5-HT_{1A} receptors (5-HT_{1A}R) in prefrontal cortex (PFC) appears critical for the rise in cortical DA induced by APDs (Rollema et al., 1997; Ichikawa et al., 2001; Díaz-Mataix et al., 2005; Bortolozzi et al., 2010), an effect likely involved in their therapeutic superiority on negative symptoms and cognitive deficits (Sumiyoshi et al, 2001a, 2001b; see Meltzer and Sumiyoshi, 2008 for review). Moreover, the chronic administration of tandospirone or buspirone (5HT_{1A} agonists) enhanced verbal memory, executive function and augmented antipsychotic action in patients with schizophrenia (Sovner et al., 1989; Goff et al., 1991; Sumiyoshi et al., 2000; Sumiyoshi et al., 2001a; Sumiyoshi et al., 2001b, Sirota et al., 2001; Sumiyoshi et al., 2007). As a result, some last generation antipsychotic drugs, such as aripiprazole, SLV313 or bifeprunox incorporate, among other properties, partial agonism for 5-HT_{1A}R.

5-HT_{1A}Rs are widely expressed in mammalian brain. They are located presynaptically on the soma and dendrites of serotonergic neurons, where they play an autoreceptor role, and are also located in pyramidal and GABAergic neurons of the neocortex and limbic system (Cruz et al, 2004; Kia et al, 1996; Martinez et al, 2001; Pazos and Palacios, 1985; Pompeiano et al, 1992; Riad et al, 2000; Santana et al, 2004), where they mediate inhibitory actions of 5-HT (Andrade and Nicoll, 1987; Innis and Aghajanian, 1987; Araneda and Andrade, 1991; Blier and de Montigny, 1987b; Puig et al, 2005).

Preclinical data show that administration of the selective 5HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT is involved in working memory (Meneses, 2007), a PFC-based process (Fuster, 2008). This agent also improves visuospatial attention and decreases impulsivity on the 5 choice serial reaction time task in rats (Winstanley et al., 2003). Likewise, low 8-OH-DPAT doses reverse the deficit in pre-pulse inhibition evoked by the NMDA antagonist MK801, used as a pharmacological model of schizophrenia (Bubeníková-Valesová et al., 2007).

Consistent with the inhibitory nature of 5-HT_{1A} (Andrade and Nicoll, 1986; Innis and Aghajanian 1987), endogenous 5-HT hyperpolarizes and inhibits PFC pyramidal neurons through the activation of 5-HT_{1A} both *in vitro* and *in vivo* (Araneda and Andrade, 1991; Amargós-Bosch et al., 2004, Puig et al., 2005). However, the systemic administration of 5HT_{1A} agonists paradoxically increases the activity of mPFC pyramidal neurons (Borsini et al., 1995; Hajós et al., 1999; Díaz-Mataix et al., 2006) and VTA dopaminergic neurons (Díaz-Mataix et al., 2005). This paradoxical effect suggests the involvement of brain networks in which 5-HT_{1A} are present.

Given the potential therapeutic usefulness of 5-HT_{1A} activation in PFC, we undertook the present study to understand the mechanism(s) and neuronal elements by which 5-HT_{1A} agonists can increase pyramidal neuron activity in mPFC balancing monoamine neurotransmission in this area and facilitating the activity of mPFC in tasks such as working memory (Fuster, 2008).

Materials and Methods

Animals and treatments.

Male albino Wistar rats (230-320 g; Iffa Credo, Lyon, France) were kept in a controlled environment (12 h light-dark cycle and 22±2°C room temperature) with food and water provided ad libitum. Animal care followed the European Union regulations (O.J. of E.C. L358/1 18/12/1986) and was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. All experiments were done in chloral hydrate anesthetized animals, initial dose 400 mg/kg i.p. and

maintenance dose ~1 mg/kg/min i.p. with a perfusion pump. Stereotaxic coordinates (in mm) were taken from bregma according to the atlas of Paxinos and Watson (1998). Body temperature was maintained at 37°C throughout the experiment with a heating pad.

WAY-100635 (5-HT_{1A} antagonist), (±) 8-OH-DPAT (5-HT_{1A} agonist, referred onwards as 8-OH-DPAT), R(+)-8-OH-DPAT (active enantiomer, 5-HT_{1A} agonist), gabazine (SR95531, GABA_A antagonist), bicuculline (GABA_A antagonist), nomifensine (norepinephrine-dopamine uptake inhibitor) and 4-chloro-DL-phenylalanine methyl ester hydrochloride (pCPA, tryptophan hydroxylase inhibitor) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Neurobiotin (intracellular label) was from Vector Labs (Burlingame, CA) and citalopram (serotonin reuptake inhibitor) from H. Lundbeck A/S (Copenhagen-Valby, Denmark). Concentrated stock solutions of WAY100635, 8-OH-DPAT and R(+)-8-OH-DPAT were prepared and aliquots were stored at -20°C. Working solutions were prepared daily by dilution in saline and were injected i.v. (up to 1 ml/kg) through the femoral vein. Gabazine (20 mM dissolved in 0.2 M NaCl), bicuculline (20mM dissolved in 1M NaCl) and neurobiotin (20% dissolved in 0.5 M NaCl) were prepared and stored at -20°C until the day of the experiment. They were used to fill the recording micropipette in specific experimental groups. Nomifensine was prepared at 2 mg/ml in saline, stored at -20°C and injected i.p. at 10 mg/kg. pCPA was prepared daily at 150 mg/ml and injected at 300 mg/kg i.p. Citalopram was prepared at 10 μM in artificial CSF (aCSF) and was used as the perfusion media in the microdialysis experiments.

Electrophysiological recordings

We performed single unit extracellular recordings in anesthetized animals (chloral hydrate 400 mg/kg i.p. followed by 50-70 mg/kg/h using a perfusion pump) to analyze the responses of mPFC neurons elicited by the systemic administration of 8-OH-DPAT. The specificity of the responses was evaluated by the subsequent administration of the selective 5-HT_{1A} antagonist WAY100635 at 50-100 μg/kg i.v. Recordings were essentially performed as previously described (Kargieman et al., 2007; Lladó-Pelfort et al., 2010) in the following experimental groups:

Control and R(+)-8-OH-DPAT experimental groups. Recording electrodes were filled with saline 2M or Pontamine Sky Blue in saline 2M for the identification of the recording site (resistances between 6 and 12 M Ω). We recorded the single unit activity of mPFC pyramidal neurons (AP +3.2 to +3.4, L -0.5 to -1, DV -1 to -4 mm) projecting to the VTA, identified by antidromic stimulation (0.4-1.5 mA, 0.2 ms, 0.9 Hz) from the VTA (AP -5.8, L -0.4, DV -8 mm), collision test (Fuller and Schlag, 1976) and verification of the stimulation sites. 8-OH-DPAT was administered i.v. at 0.75-60 μ g/kg (free base) in the control group and R(+)-8-OH-DPAT at the dose of 0.375-30 μ g/kg.

Gabazine and bicuculline experimental groups. Recording electrodes were filled with either gabazine (20 mM) in 0.2 M NaCl or bicuculline methiodide (20 mM) in 1M NaCl, (Tepper et al., 1997). The tips of the electrodes were broken to a final resistance of 9-15M Ω , (electrode tip 5-7 μ m diameter). Both drugs were administered locally to recorded neurons by passive diffusion through the recording micropipette as described (Steward et al. 1990). The correct leaking of gabazine and bicuculline was verified by the higher discharge rate of the recorded pyramidal neurons. mPFC pyramidal neurons were identified as above (e.g., antidromic stimulation from VTA and collision test). 8-OH-DPAT was administered i.v. at 0.75-60 μ g/kg (free base).

GABAergic interneurons. Recording electrodes were filled with Neurobiotin 2% in 0.5M NaCl (resistances 15-22M Ω). We recorded the activity of mPFC single unit, fast-spiking GABAergic interneurons (AP +3.2 to +3.4, L -0.5 to -1, DV -1 to -4 mm) identified by a) electrophysiologic characteristics as described by Tierney et al., 2004 -average depolarization duration (10 spikes) of the action potential and basal firing rate- and b) subsequent staining with Neurobiotin and *in situ* hybridization for GAD₆₅ (see below). 8-OH-DPAT was administered i.v. at 0.75-60 μ g/kg (free base).

After the experiment, neurons were juxtacellularly labeled with Neurobiotin as described (Pinault 1996; Mallet 2005). Briefly, positive current pulses (200ms on 200 ms off) of 1-6 nA were applied. The current was increased until it drove cell firing for 5-20 min. Pontamine Sky Blue was injected 200 μ m anterior and posterior to the recording site to optimize the identification of the recorded cell placement.

Histochemical detection of neurobiotin and GAD67 mRNA. GAD67 mRNA was detected by *in situ* hybridization using an oligonucleotide probe (Access number: NM_017007, Base pairs: 1600-1653). The probe (2 pmol) was labeled at its 3'-end with [³³P]α-dATP (>2500 Ci/mmol; Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) using terminal deoxynucleotidyltransferase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and then purified by centrifugation using QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Neurobiotin was visualized using an amplification system (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories).

Brains were cut using a microtome-cryostat (Microm HM 560 OM, Walldorf, Germany) into 14 μm thick sections that were thaw-mounted onto microscope glass slides pretreated with Histogrip (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA). The protocol for *in situ* hybridization was based on previously described procedures (Tomiyama 1997) and already published (Abellan et al., 2000). Briefly, frozen tissue sections were first brought to room temperature, washed in 3x Dulbecco's phosphate buffered saline (3x PBS; 1x PBS: 8 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 136 mM NaCl, 2.6 mM KCl), 2 times in 1x PBS, incubated at 20 °C in a solution of predigested pronase (Calbiochem, San Diego, CA) at a final concentration of 24 U/mL in 50 mM TrisHCl pH 7.5, 5 mM EDTA. The enzymatic activity was stopped by immersion for 30 s in 2 mg/mL glycine in 1x PBS. Tissues were finally rinsed in 1x PBS and dehydrated through a graded series of ethanols. For hybridization, the labeled probes were diluted in a solution containing 50% formamide, 4x SSC (1x SSC: 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate), 1x Denhardt's solution (0.02% Ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone, 0.02% bovine serum albumin), 10% dextran sulfate, 1% sarkosyl, 20 mM phosphate buffer pH 7.0, 250 μg/mL yeast tRNA and 500 μg/mL salmon sperm DNA. Tissue sections were covered with hybridization solution containing the labeled probe, overlaid with Nescofilm coverslips (Bando Chemical Ind., Kobe, Japan) and incubated overnight at 42°C in humid boxes. Sections were then washed 4 times (45 min each) in washing buffer (0.6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5) at 60°C and once in the same buffer at rt for 15 min. After the *in situ* hybridization protocol, tissue sections were kept for 15 min in buffer B (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5 containing 1 M NaCl, 2 mM MgCl₂·6H₂O). The sections were incubated for 30 min in

Vectastain Elite ABC solution (Vector Laboratories) in the same buffer B at 37°C, then washed 3 times, and finally immersed in a solution of 0.5 mg/mL 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma-Aldrich) in Tris-HCl 0.05 M, pH 7.5, containing 1 µL/mL H₂O₂ during 10 min. The sections were then washed three times in buffer B, briefly dipped in 70 and 100% ethanol, air-dried and dipped into Ilford K5 nuclear emulsion (Ilford, Mobberly, Cheshire, UK) diluted 1:1 with distilled water. They were exposed in the dark at 4°C for 2 weeks and were finally developed in Kodak D19 (Kodak, Rochester, NY) for 5 min, fixed in Ilford Hypam fixer (Ilford) for 5 min, washed, and coverslipped using Mowiol (Merck).

Hippocampus experimental group. The recording electrodes were filled with 2% Pontamine Sky Blue in saline 2M for the identification of the recording site. We recorded the single unit activity of hippocampal CA1-Subiculum pyramidal neurons (AP -6.3 to -7, L -4, DV 15° -4 to -7 mm) projecting to the mPFC identified by antidromic stimulation (1mA, 0.5Hz, 300ms) from the mPFC (AP +3, L-0.8, DV -3.5 mm). 8-OH-DPAT was administered i.v. at 0.75-60 µg/kg (free base).

pCPA group. To examine whether pyramidal neuron excitation in mPFC was due to the removal of an inhibitory tone secondary to the activation of raphe 5-HT_{1A} autoreceptors, a group of rats was subjected to 5-HT depletion with the tryptophan hydroxylase inhibitor pCPA. Rats were treated at day 0 with nomifensine one hour before the injection of pCPA to protect catecholamine neurons. Recordings of single mPFC pyramidal neurons projecting to the VTA were performed at days 2, 3 or 4 as in the control group (maximal inhibition of 5-HT synthesis occurs at day 2 post-administration, followed by a slow recovery; Cortés et al., 1993). 5-HT depletion was assessed by HPLC of PFC homogenates, as described (Adell et al., 1989). 8-OH-DPAT was administered i.v. at 0.75-60 µg/kg (free base).

In vivo microdialysis

Microdialysis procedures in rats were conducted essentially as previously described in Amargós-Boch et al., (2004). Anesthetized rats (sodium pentobarbital, 60 mg/kg i.p.) were stereotaxically implanted with concentric microdialysis probes equipped with a Cuprophan membrane (4 mm long) at the following coordinates (in mm) mPFC: AP +3.2, L -0.8, DV -6.0. Animals were left to recover from anesthesia in their home cages. On the following day (e.g., ~20 h after probe implant) they were anesthetized with chloral hydrate to mimic exactly the conditions of electrophysiological recordings. Probes were perfused at 3 μ l/min with aCSF containing 10 μ M of citalopram. After a 100-min stabilization period, dialysate samples were collected every 4 min. 8-OH-DPAT and WAY100635 were injected i.v. at the same doses than in control electrophysiological experiments. The concentration of 5HT in dialysate samples was determined by HPLC with amperometric detection (Hewlett-Packard 1049 detector, set at +0.7 V) as described previously (Amargós-Bosch et al., 2004; Lopez-Gil et al., 2007) with a detection limit of 2 fmol/sample.

Histology

After experimental procedures were completed, animals were killed by an anaesthetic overdose. The brains were quickly removed, frozen in dry ice and kept at -80°C before being sectioned (50 μ m) with a cryostat in coronal planes. Brain sections were then stained with neutral red, according to standard procedures to verify the recording (if recording electrode was filled with Pontamine Sky blue) and stimulation sites. In microdialysis experiments, sections were examined to verify the correct placement of probes in the mPFC.

The analysis of neuronal activity in PFC evoked by 8-OH-DPAT was also assessed by the expression of c-fos mRNA using double in situ hybridization, as described previously (Kargieman et al., 2007). Two groups of anesthetized rats were administered i.v. with saline or 8-OH-DPAT (7.5 μ g/kg) and killed after 30 min by anaesthetic overdose and decapitation. The brains were rapidly removed, frozen on dry ice, and stored at -20°C. Brain tissue sections, 14- μ m thick, were cut using a microtome-cryostat (Microm HM500 OM,

Walldorf, Germany), thaw-mounted onto APTS (3-aminopropyltriethoxysilane, Sigma, St Louis, MO, USA)-coated slides and kept at -20°C until use. The oligodeoxyribonucleotide probes used were complementary to the following bases: *c-fos*, 131–178 (GenBank accession no. NM_022197); vesicular glutamate transporter vGluT1 (a glutamatergic cell marker), 127–172 and 1756–1800 (GenBank accession no. U07609); GAD65 isoform of the enzyme glutamate decarboxylase (GAD, to label GABAergic cells), 514–558 (GenBank Accession No. NM_012563); GAD67 isoform, 191–235 (GenBank Accession No. NM_017007). Probes were synthesized on a 380 Applied Biosystems DNA synthesizer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

c-fos oligonucleotide was always labeled at its 3'-end with [^{33}P]-dATP (>3000 Ci/mmol; DuPont-NEN, Boston, MA, USA) with terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT, Calbiochem, La Jolla, CA, USA) and purified with ProbeQuantTM G-50 Micro Columns (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, UK). vGluT1 and GAD oligonucleotides were individually labeled with Dig-11-dUTP (Boehringer Mannheim) using TdT (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), and purified as above.

The protocols for double-label *in situ* hybridization were based on previously described procedures (Amargós-Bosch et al., 2004; Santana et al., 2004).

Micrography and cellular counting were performed in an Olympus BX51 Stereo Microscope equipped with an Olympus Microscope Digital Camera DP71, with the aid of Visiopharm Integrator System software (Olympus). Cells were counted in three adjacent sections of each rat and averaged to obtain individual values. Results are given as mean \pm SEM of 3 rats. The figures were prepared for publication using Adobe Photoshop software (Adobe Software, Mountain View, CA, USA).

Data and statistical analysis

Changes in firing rate were quantified by averaging the values in the third minute after each drug injection. Excitations were defined as increases $\geq 30\%$ of basal firing rate and inhibitions as decreases of $\geq 30\%$ of basal firing rate. The effects of 8-OH-DPAT and WAY100635 were assessed by one-way repeated measures ANOVA.

Cell counting was performed manually at the microscope with the help of analysis Software. Only cellular profiles showing great abundance of both transcripts were considered to co-express both mRNAs. A semiquantitative measure of the optical densities was conducted for *in situ* hybridization studies with the AIS^R computerized image analysis system (Imaging Research Inc, St Catharines, Ontario, Canada). For each rat, individual values of optical densities in prelimbic area of PFC were calculated as the mean of 3 adjacent sections of 3 rats per treatment group. Statistical analysis was performed using a statistical software package (GraphPad Prism 4, GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Comparisons between groups were assessed by two way ANOVA or χ^2 . Data are expressed as the mean \pm SEM. Statistical significance has been set at the 95% confidence level (two tailed).

Results

Effects of 8-OH-DPAT on pyramidal neuron firing: biphasic dose-response curve

8-OH-DPAT administration evoked an overall biphasic dose-response curve on the firing rate of mPFC pyramidal neurons ($n=30$; Fig. 1A), with excitations at low doses (0-7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.; $F(2,36)=5.47$, $p<0.01$, $n=19$) and inhibitions at higher doses of 8-OH-DPAT (7.5-60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.; $F(2,28)=3.91$, $p<0.04$, $n=15$). A detailed analysis of the response patterns evoked by 8-OH-DPAT indicated the existence of distinct response patterns (Fig. 1B): a) activations, b) inhibitions, c) inhibitions at low doses followed by excitations at higher doses, and d) excitations at low doses followed by inhibitions at higher doses. The most common pattern was an excitation at low doses of 8-OH-DPAT followed by inhibition at higher doses (Fig. 1B and 1C), with significant increases in the firing rate at 0.75 and 7.5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ i.v. and decreases at 60 $\mu\text{g} / \text{kg}$ i.v. ($F(4,36)=5.32$, $p<0.002$, $n=10$) (Fig. 1D). Very few pyramidal neurons responded with inhibitions to 8-OH-DPAT administration (Fig. 1E).

Excitations and inhibitions evoked by 8-OH-DPAT (mean cumulative doses 43.4 ± 15.3 and 75.8 ± 15.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v., respectively; $n = 7$ each), were reversed by the subsequent administration of the 5HT_{1A} antagonist WAY100635 (mean doses 92.9 ± 13.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v., $n = 14$) (Fig. 1F).

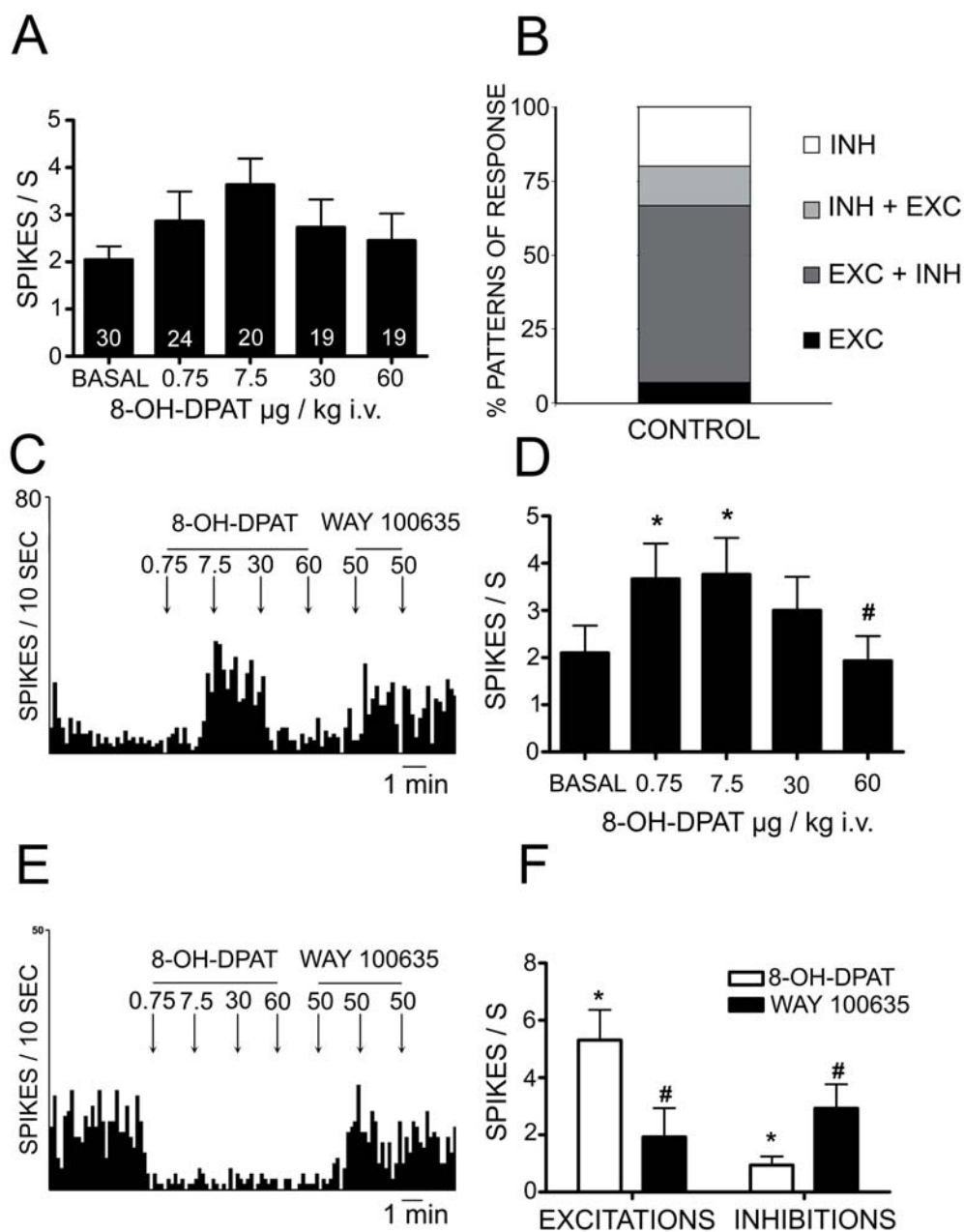


Figure 1 (previous page). Effect of the administration of 8-OH-DPAT (0.75-60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) on the firing rate of mPFC pyramidal neurons. **A)** Bar graph showing the overall dose-response relationship of the firing rate of mPFC pyramidal neurons recorded in control conditions after the administration of increasing doses of 8-OH-DPAT. Numbers within bars are the number of neurons recorded in each group. **B)** Proportion of response patterns of mPFC pyramidal neurons after the administration of increasing doses of 8-OH-DPAT (n=15). INH, inhibitions; INH+EXC, inhibitions followed by excitations; EXC+INH, excitations followed by inhibitions; EXC, excitations. **C)** Representative example of the most common pattern of response shown by mPFC pyramidal neurons after the systemic administration of 8-OH-DPAT (0.75-60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.; injections shown by vertical arrows) and its reversal by WAY 100635 (50 and 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.). **D)** Bar graph showing the dose-response relationship for the most common response pattern (excitations at low doses of 8-OH-DPAT and inhibitions at higher doses) * $p < 0.02$ vs basal; # $p < 0.02$ vs 8-OH-DPAT at 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. . As observed, the maximal excitatory effect was produced by 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. **E)** Representative example of a pure inhibitory response of a mPFC pyramidal neuron after the systemic administration of 8-OH-DPAT. The 8-OH-DPAT-induced inhibition is maintained at all doses and is reversed by the administration of WAY 100635. **F)** Bar graph showing the reversal by WAY-100635 of the excitations and inhibitions produced by 8-OH-DPAT. * $p < 0.05$ vs 8-OH-DPAT.

Given the inhibitory nature of 5-HT_{1A} receptors (see Introduction), we focused our attention on the excitatory responses evoked by low 8-OH-DPAT doses (e.g., 0.75-7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.) in pyramidal neurons. The drug produced a significant increase in the firing rate of mPFC pyramidal neurons at the dose of 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.: from 2.0 ± 0.3 spikes/s to 3.4 ± 0.5 spikes/s (239 ± 54 % basal firing, n=19; $F(2,36)=5.47$, $p < 0.01$) (Fig. 2A). This excitatory response was observed in 84% of the recorded neurons (Fig. 2B and C).

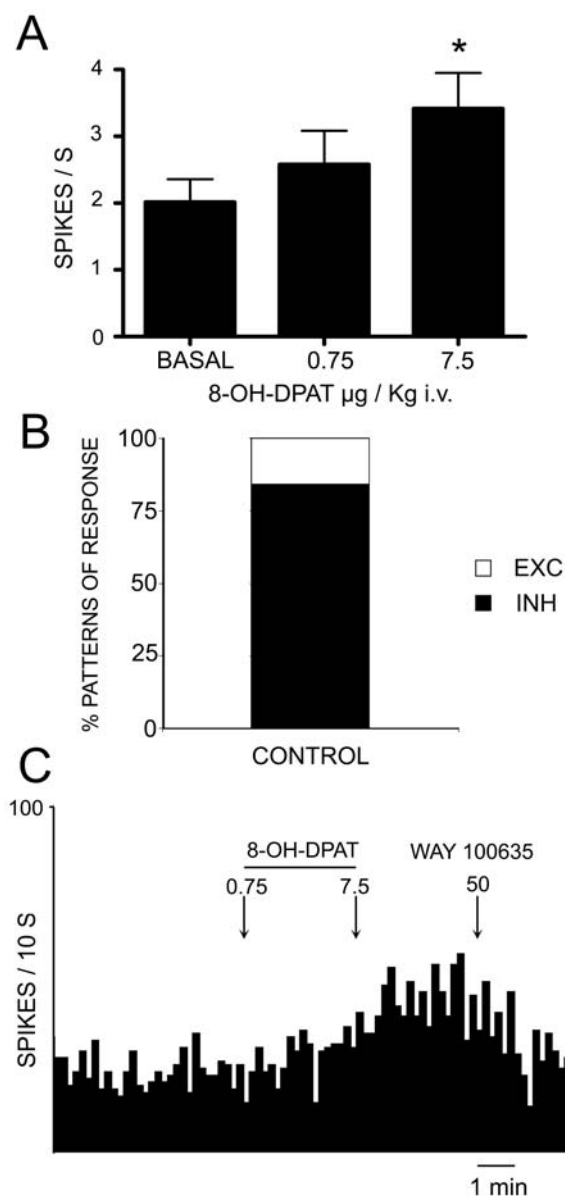


Figure 2. A) Excitation of mPFC pyramidal neurons produced by low doses of 8-OH-DPAT. **B)** Proportion of neurons excited by low doses of 8-OH-DPAT. (N=19). **C)** Representative example of a neuron excited by low doses of 8-OH-DPAT and the reversal of the effect by WAY 100635.

The more active (+)R-8-OH-DPAT enantiomer also produced significant excitations of mPFC pyramidal neurons at the dose of 7.5 $\mu\text{g/kg}$ i.v. (n=10, $F(2,18)=5.46$ $p<0.02$) (Fig. 3A). Biphasic dose-response curves (e.g., excitations at low doses and inhibitions at higher doses) were also present in this experimental group (Fig. 3B).

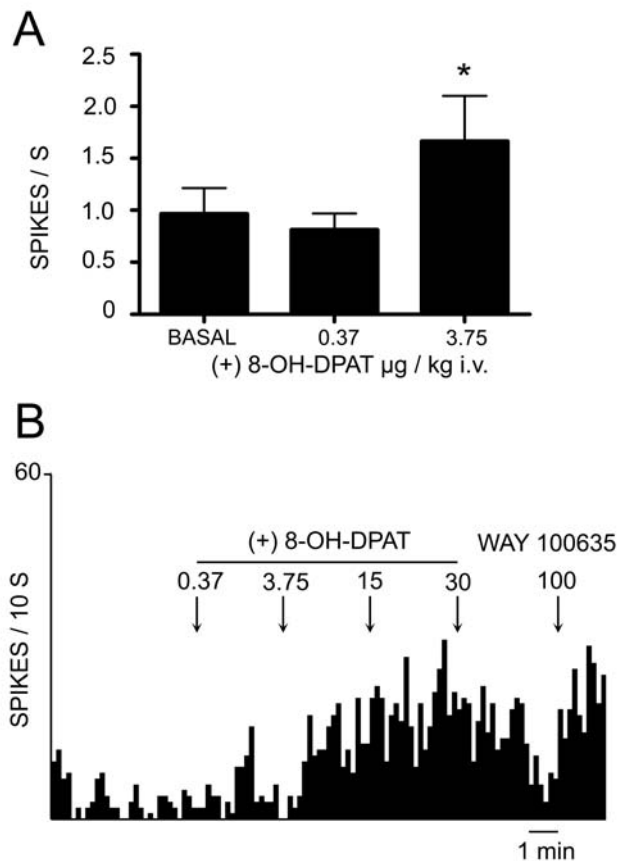


Figure 3. The active (+)-R-8-OH-DPAT enantiomer induced similar responses on mPFC pyramidal neuron firing activity than the racemic compound. **A)** Excitation of mPFC pyramidal neurons produced by low doses of the R(+)-8-OH-DPAT enantiomer. **B)** Integrated firing rate histogram showing a neuron with a biphasic dose-response relationship to the administration of R(+)-8-OH-DPAT.

Role of 5HT_{1A} autoreceptors on the 8-OH-DPAT induced excitation of mPFC pyramidal neurons

Previous observations using microiontophoretic application of 5-HT_{1A} receptor agonists indicated a preferential sensitivity of 5-HT_{1A} located on DR serotonergic neurons compared with those in the hippocampal formation (Sprouse and Aghajanian, 1988). We therefore tested whether the excitatory effect of low 8-OH-DPAT doses on mPFC pyramidal neurons could be due to a secondary excitation after the removal of the serotonergic tone. To this end, we performed two different sets of experiments. In one of them, we examined the effect of increasing doses of 8-OH-DPAT on 5-HT release in mPFC using exactly the same experimental conditions than in electrophysiological

recordings, (i.e., i.v. drug administration, chloral hydrate anesthetized rats) together with a high flow rate and short collection time to quickly estimate drug effects on 5-HT output. In the second set of experiments, we examined the effect of 8-OH-DPAT in rats depleted of 5-HT with the 5-HT synthesis inhibitor pCPA, under the working hypothesis that, should 8-OH-DPAT-mediated excitations be due to a removal of a serotonergic inhibitory tone on other 5-HT receptors, this effect would disappear in animals depleted of 5-HT.

Baseline 5-HT values in dialysate samples of anaesthetised rats were 20.5 ± 6.7 fmol/4-min fraction. 8-OH-DPAT administration induced a dose-dependent reduction of 5-HT output in mPFC ($F(21,42) = 31.4$; $p < 0.0001$, $n = 4$; Fig. 4A). The 5HT output fell to 47 ± 6 % of baseline at the dose of $7.5 \mu\text{g}/\text{kg}$. Higher doses of 8-OH-DPAT further reduced 5-HT release to 32 ± 7 % ($30 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.) and 27 ± 4 % of baseline ($60 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.). WAY100635 ($50 \mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) significantly reversed the 8-OH-DPAT-induced decrease of the extracellular 5-HT concentration in the mPFC (Fig. 4A; $n = 4$, $F(24,48) = 10.52$; $p < 0.00001$).

In 5-HT-depleted rats (pCPA; $300 \text{ mg}/\text{kg}$ i.p. 2-4 days before recordings) the tissue concentration of 5-HT in mPFC was ~ 5 % of control rats (134 ± 14 pmol/g vs. 2512 ± 115 pmol/g; $n=10$ and 9 , respectively; $p < 0.00001$; Student's *t* test). 5HT depletion by pCPA did not avoid neither the excitations of pyramidal neurons induced by low doses (up to $7.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.) of 8-OH-DPAT ($F(2,18)=4.09$ $p < 0.04$; $n=10$,) (Fig. 4B) nor the biphasic dose-response curve (Fig. 4C).

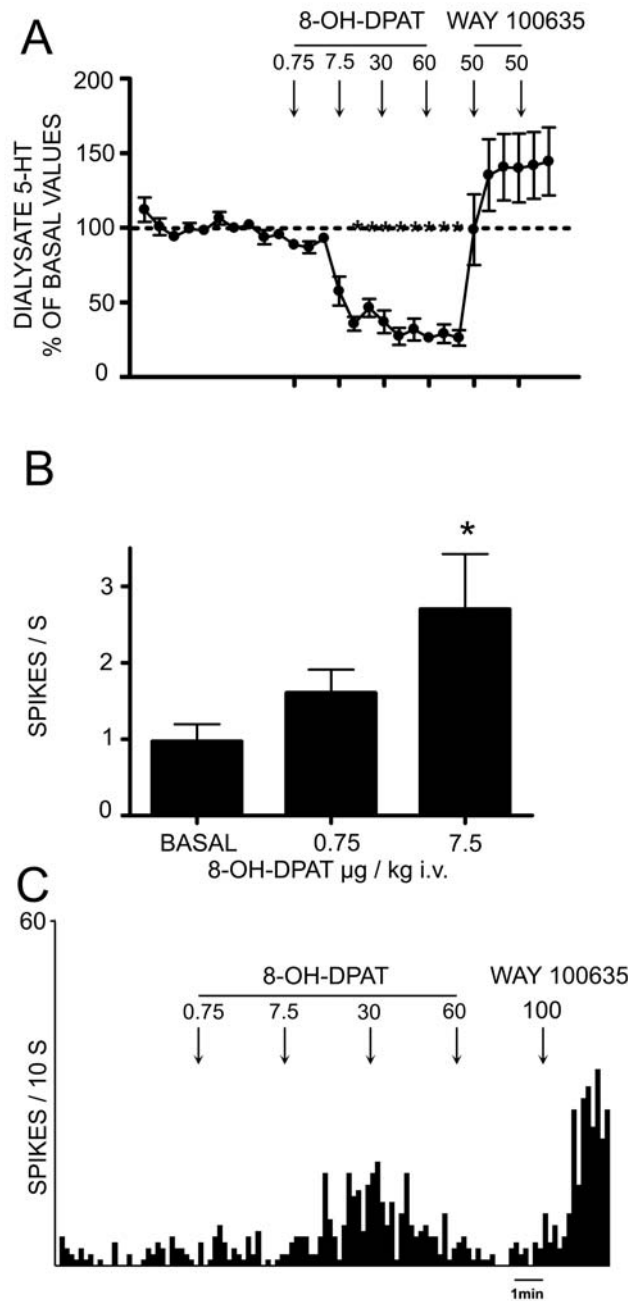


Figure 4. A) Effect of the intravenous administration of 0.75, 7.5, 30 and 60 $\mu\text{g} / \text{kg}$ of 8-OH-DPAT on extracellular 5-HT in the mPFC of anesthetized rats. 8-OH-DPAT significantly decreased 5-HT, with a maximal effect at 30-60 $\mu\text{g}/\text{kg}$, an effect reversed by the subsequent administration of WAY-100635 (50 $\mu\text{g} / \text{kg}$ i.v.) (* $p < 0.001$ vs baseline). Pannels **B)** and **C)** show the effect of the intravenous administration of 8-OH-DPAT on the firing rate of mPFC pyramidal neurons in pCPA-treated rats. **B)** Bar graph showing the mean \pm SEM values of firing rate in basal conditions and after the administration of increasing doses of 8-OH-DPAT. Note the similar excitation of mPFC pyramidal neurons produced in control conditions (Fig. 2A) and in pCPA-treated rats. **C)** Integrated firing rate histogram showing a biphasic dose-response curve of a mPFC pyramidal neuron after 8-OH-DPAT administration in a pCPA treated rat.

Role of hippocampal pyramidal neurons

Given the presence of 5-HT_{1A} receptors in hippocampal pyramidal neurons (Pompeiano et al., 1992) and the existence of a projection from the hippocampal formation to the prelimbic subdivision of the mPFC (Jay et al., 1989) we examined whether activation of hippocampal 5-HT_{1A} receptors could contribute to the observed effects in mPFC.

Hippocampal pyramidal neurons projecting to the mPFC, identified by antidromic activation from the mPFC, are silent in chloral hydrate anesthetized rats. The administration of 8-OH-DPAT does not evoke any increase in the discharge rate (n=7). A representative example of an antidromically identified hippocampal neuron projecting to mPFC is shown in figure 5A as well as some examples of recording and stimulation sites in CA1/S (Fig. 5B).

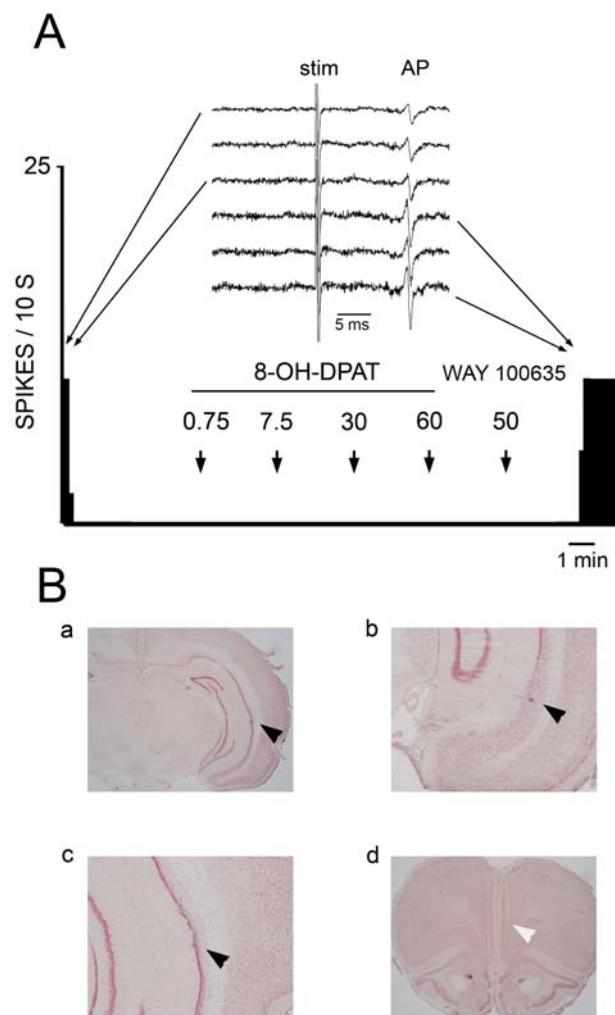


Figure 5 (previous page). A) Effect of the systemic administration of 8-OH-DPAT on the firing rate of a CA1/Sub hippocampal neuron projecting to mPFC. Note the absence of spontaneous discharges in chloral hydrate anesthetized rats. The administration of 8-OH-DPAT or WAY 100635 did not change the firing rate of the neuron. The neuron was identified by antidromic stimulation (stim) before recording basal condition and after the administration of the drugs as shown in the traces above the integrated firing rate histogram. AP, antidromic potentials after stimulation from mPFC. **B) (a-c)** Examples of recording sites (black arrowheads) of hippocampal pyramidal neurons projecting to the mPFC. **(d)** Stimulation site (white arrowhead) in the mPFC.

Role of GABAergic interneurons

5-HT_{1A} receptors are located in a substantial proportion of PFC GABAergic neurons (Santana et al., 2004) and these make extensive cortical networks via electrical synapses (Hestrin and Galarreta, 2005). We therefore tested the hypothesis that the excitatory phase of 8-OH-DPAT action could in fact be a disinhibition produced by the activation of 5-HT_{1A} receptors on GABA neurons. To this end, we performed two sets of experiments. Thus, we examined the effect of systemic 8-OH-DPAT administration on pyramidal neurons whose GABA_A inputs were blocked by a local leak of a selective GABA_A antagonist (gabazine). In the second set of experiments, we directly examined the effect of systemic 8-OH-DPAT administration on the firing rate of fast-spiking GABA interneurons.

Effects of local blockade of GABA_A inputs on responses of pyramidal neuron to 8-OH-DPAT administration. The local blockade of GABA_A inputs onto the recorded pyramidal neurons produced three main effects: a) an increase of the basal firing rate of mPFC pyramidal neurons (control n=30, mean firing rate 2.0±0.3 spikes/s; gabazine n=16, mean firing rate 4.4±0.7 spikes/s; p<0.001; Student's *t*-test); b) it changed response patterns of mPFC pyramidal neurons to 8-OH-DPAT administration, being pyramidal neurons less sensitive to the drug (control n=15, gabazine n=14; χ^2 p<0.01; Fig. 6A-C) and c) prevented the excitatory effect of 8-OH-DPAT (control n=19, gabazine n=14; gabazine effect F(1,31)=5.66 p<0.03; 8-OH-DPAT effect F(2,62)=2.98 p=0.06 n.s; 8-OH-DPAT / gabazine interaction F(2,62)=3.29 p<0.05) (Fig. 6D-F). The local blockade of the GABA_A inputs with bicuculline produced similar results than those obtained with gabazine (results not shown).

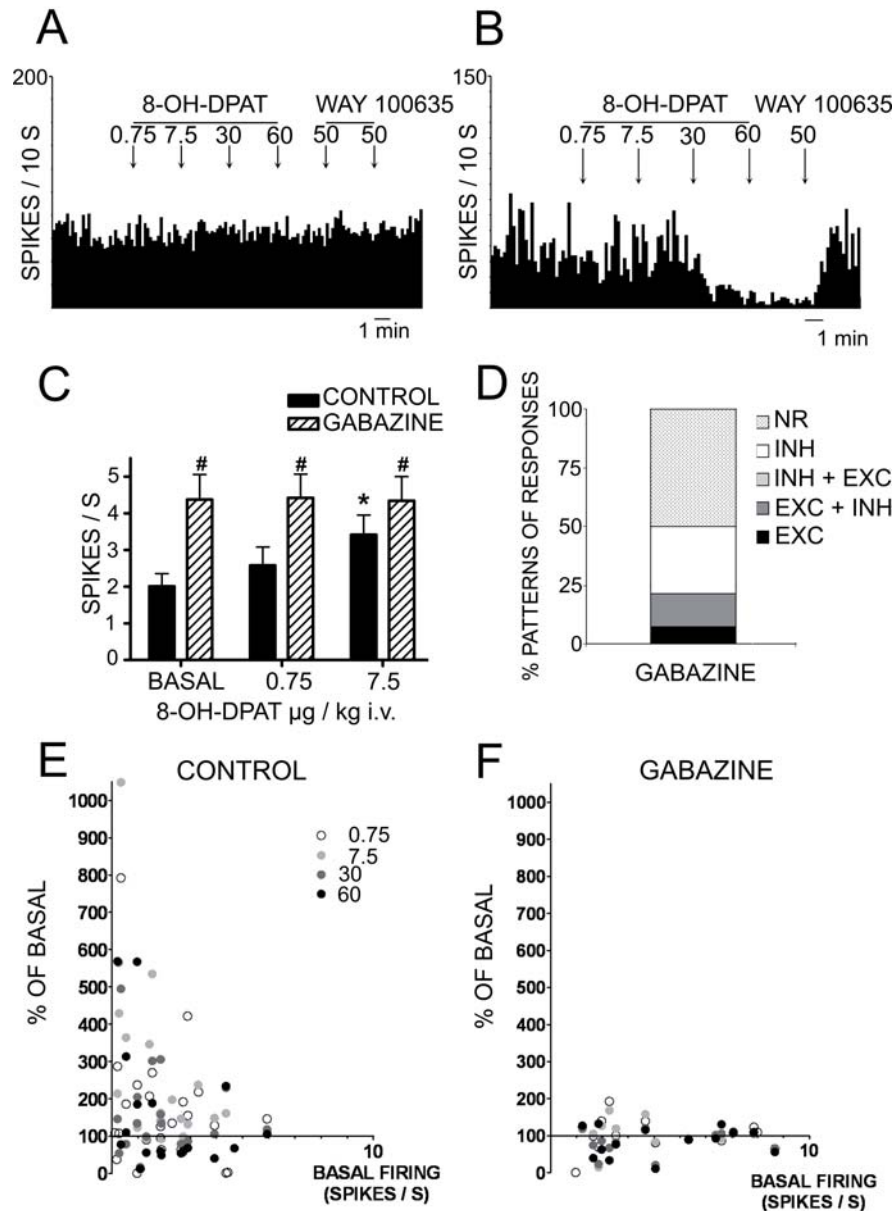


Figure 6. Effects of the local application of gabazine (GABA_A antagonist) through the recording electrode on the responses of mPFC pyramidal neurons to 8-OH-DPAT administration. **A)** and **B)** show examples of the two most common patterns of response produced by 8-OH-DPAT on mPFC pyramidal neurons after the local blockade of GABA_A inputs: lack of response and inhibition. The inhibition is reversed by the subsequent administration of WAY 100635. **C)** Bar diagram showing the change in the firing rate of pyramidal neuron produced by 8-OH-DPAT in control conditions and during blockade of GABA_A inputs with gabazine. * $p < 0.01$ vs basal ; # $p < 0.03$ vs control. **D)** Proportions of response patterns produced by 8-OH-DPAT on mPFC pyramidal neurons after the local blockade of GABA_A inputs by gabazine ($n = 14$). NR, no-response; INH, inhibitions; EXC+INH, excitations followed by inhibitions; EXC, excitations *compare with Fig. 1B). **E** and **F)** Plots of the change in firing rate (percentage of baseline) induced by 8-OH-DPAT vs. the pre-drug firing rate (E, control conditions; F in presence of gabazine)

Effects of 8-OH-DPAT on fast-spiking GABAergic interneurons. Fast-spiking mPFC GABAergic interneurons were identified by their electrophysiological features (see Methods; Fig. 7A) and subsequent histological characterization using immunohistochemistry for neurobiotin and *in situ* hybridization for GAD (Fig. 7B). GABAergic interneurons showed a mean higher basal firing rates than pyramidal neurons (GABA neurons n=21, 10.4±1.6 spikes/s; pyramidal neurons –control group- n=30, 2.0±0.3 spikes/s Student's *t*-test p<0.0000001; Fig. 7C) and shorter action potentials (GABA neurons n=21 duration 0.39±0.03 ms, pyramidal controls n=27, duration 0.75±0.05 ms Student's *t*-test p<0.0000001; Fig. 7D). This permitted to group pyramidal and GABAergic neurons in two clusters (Fig. 7A). Moreover, some recorded GABAergic interneurons were identified by juxtacellular labeling with neurobiotin and further characterization of the presence of GAD mRNA by *in situ* hybridization (Fig. 7B).

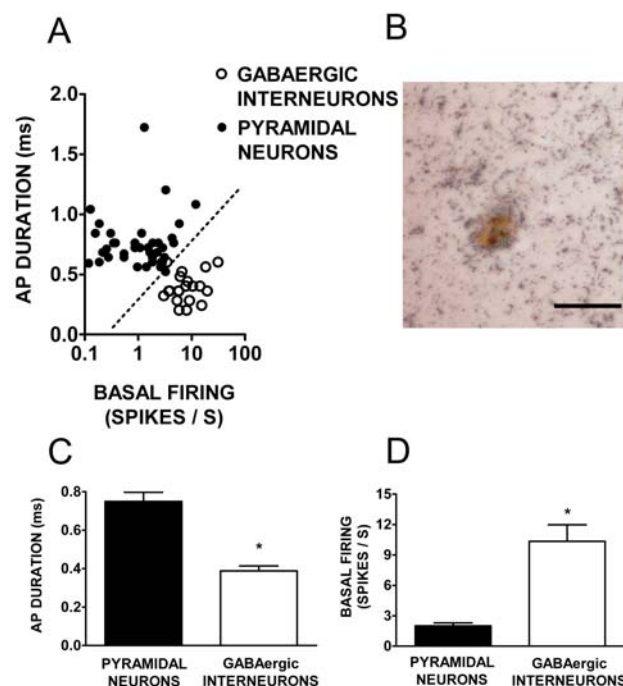


Figure 7. Characterization of fast spiking GABAergic interneurons in mPFC. **A)** Plotting the action potential duration vs. the basal firing rate creates two separate clusters grouping pyramidal neurons on one side and fast-spiking GABAergic interneurons on the other. **B)** GABAergic interneuron labeled with juxtacellular injection of neurobiotin (brown) and positive for the *in situ* hybridization for GAD. (horizontal line: 100µm). **C)** Putative fast spiking interneurons show shorter action potential duration compared to mPFC pyramidal neurons *p<0.0000. **D)** Putative fast spiking interneurons show significantly higher firing rates than mPFC pyramidal neurons *p<0.0000.

8-OH-DPAT reduced the firing rate of fast-spiking mPFC GABAergic interneurons, from 10.0 ± 1.9 (baseline) to 9.5 ± 1.8 ($0.75 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.), 7.3 ± 1.5 ($7.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.v), 6.9 ± 1.3 ($30 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.v) and 6.7 ± 1.5 spikes/s ($60 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.v) ($F(4,60)=5.00$ $p < 0.002$; $n = 16$; significant differences of doses of 7.5, 30 and $60 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.v vs baseline; post hoc Newman-Keuls test). These inhibitions were reversed by the subsequent administration of the 5HT_{1A} antagonist WAY100635 ($F(2,22)=12.07$ $p < 0.001$, $n=12$; Fig. 8A-C).

The decrease in firing rate of fast-spiking interneurons induced by 8-OH-DPAT occurred at doses that excited pyramidal neurons (Fig. 8D). Two-way ANOVA revealed a significant effect of cell type factor ($F(1,37)=18.86$ $p < 0.0001$) as well as a significant interaction between both 8-OH-DPAT and cell type ($F(2,74)=8.44$ $p < 0.0005$; pyramidal neurons, $n=19$; GABAergic neurons, $n=20$). In some instances, a pyramidal and a GABAergic neuron were simultaneously recorded, as in the example shown in Fig. 8E, which shows a decrease of the discharge rate of the GABAergic neuron together with an increase of the activity of the pyramidal neurons following the administration of 8-OH-DPAT.

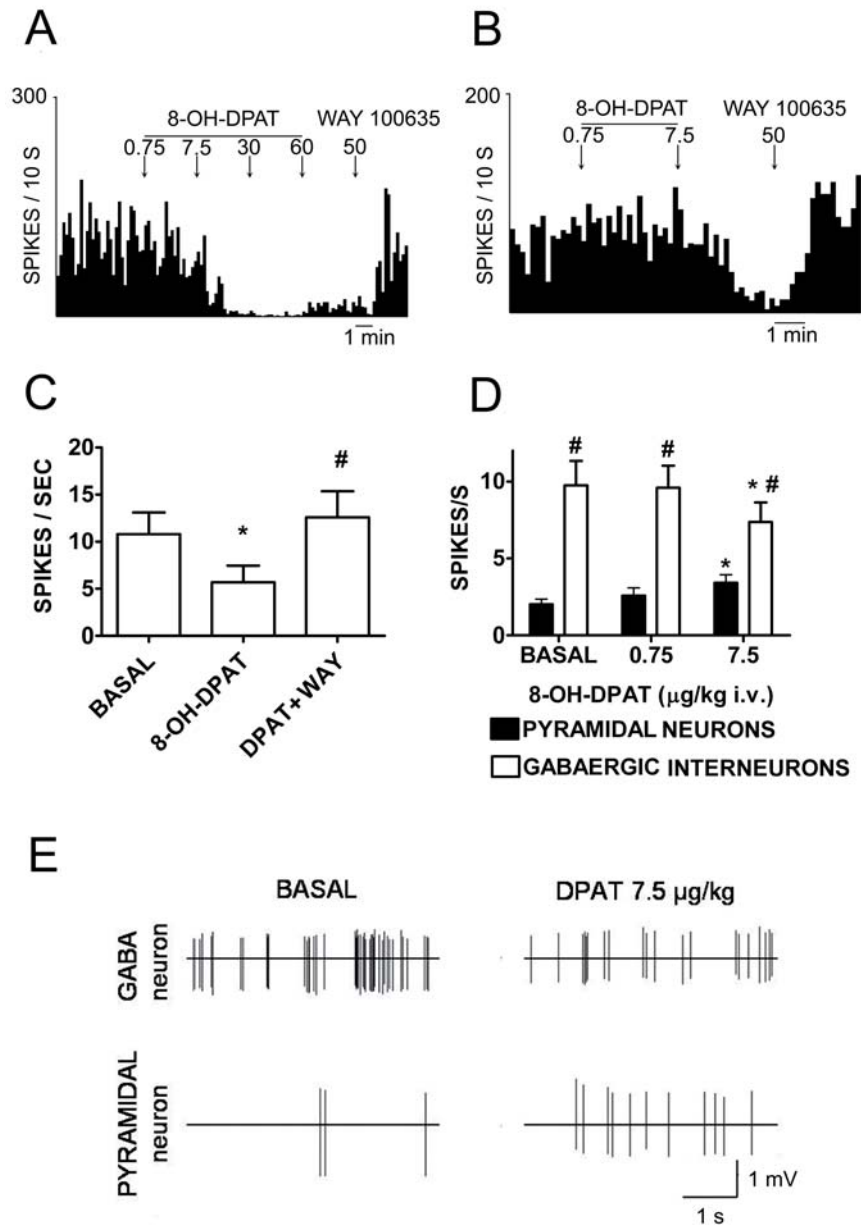
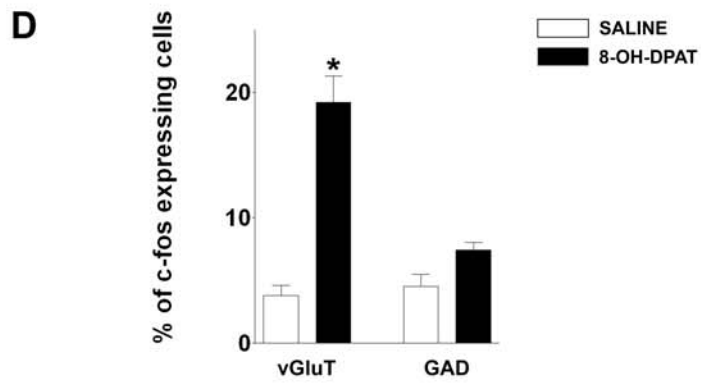
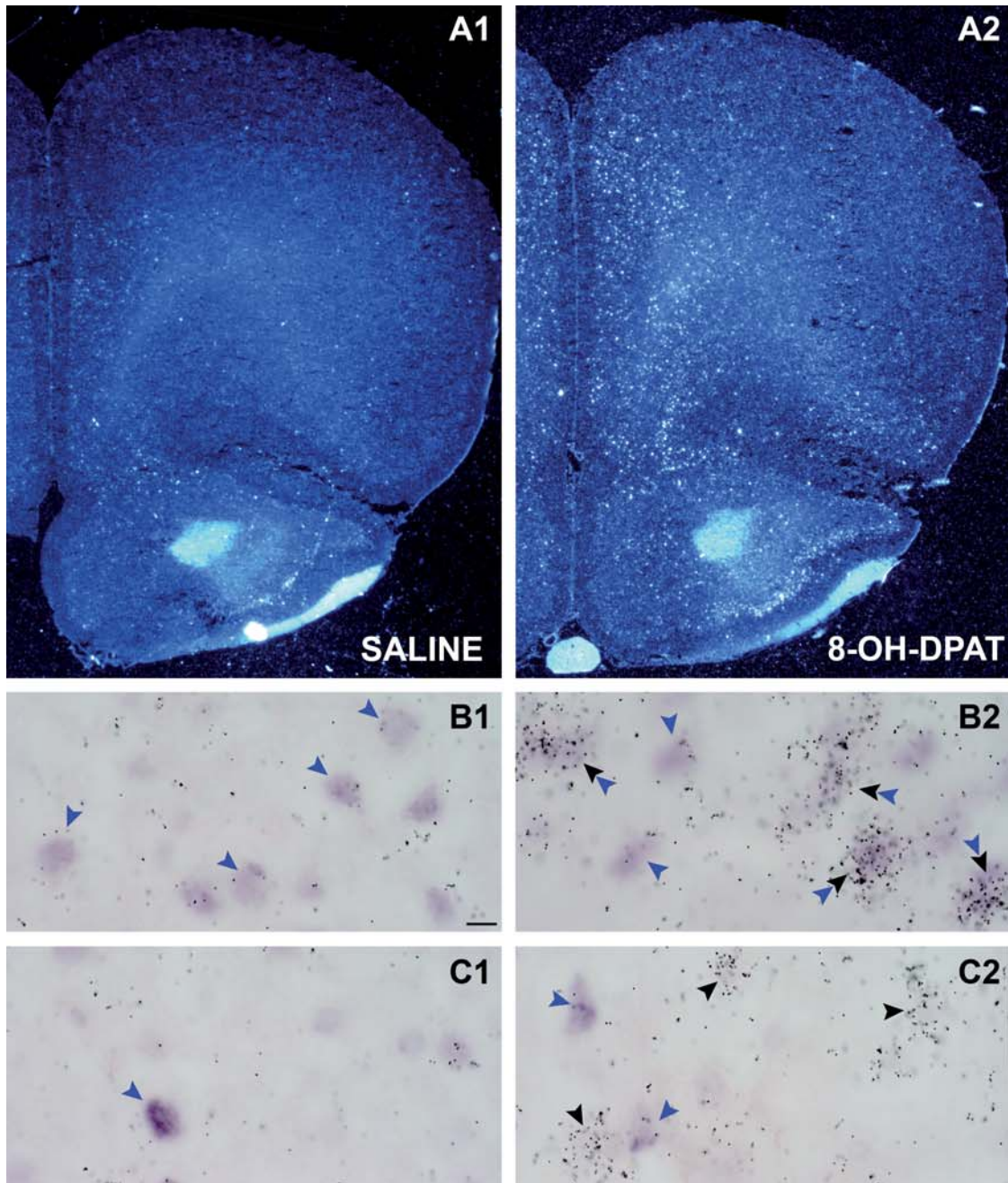


Figure 8. **A, B)** Representative examples of the effect of the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT (0.75-60 µg/kg i.v.; injections shown by vertical arrows) on the activity of fast spiking mPFC GABAergic interneurons and its reversal by the subsequent administration of WAY 100635. **C)** Bar graph showing the inhibitory effect of 8-OH-DPAT on mPFC fast spiking GABAergic interneurons and the reversal by WAY100635 of these inhibitions. **p*<0.001 vs baseline; # *p*<0.001 vs 8-OH-DPAT. **D)** Bar graph showing the opposite and simultaneous effect of 8-OH-DPAT on the activity of mPFC pyramidal neurons (control group) and fast spiking GABAergic interneurons. **E)** Dual recording of a pyramidal neuron and a putative GABAergic interneuron showing the temporal coincidence of the inhibition of mPFC GABAergic interneuron and the excitation of the pyramidal neuron.

Induction of c-fos in mPFC by 8-OH-DPAT

The i.v. administration of 7.5 µg/kg 8-OH-DPAT to chloral hydrate anesthetized rats (as in electrophysiological experiments) induced a marked increase in the expression of the immediate early gene *c-fos* (Fig. 9). The expression of *c-fos* was notably more marked in all subdivisions of the mPFC where extracellular recordings were made. Double *in situ* hybridization experiments revealed that the increase in *c-fos* expression occurred in glutamatergic (vGluT1-positive) but not GABAergic (GAD-positive) neurons (Figs. 9B-9D). Cell counting indicated that 8-OH-DPAT induced the expression of *c-fos* in ~20% of all pyramidal cells in the mPFC without any significant effect on the expression in GABAergic (GAD-positive) neurons.

Figure 9 (next page). Effects of the i.v. administration of 7.5 µg/kg of 8-OH-DPAT on *c-fos* expression in PFC. **(A)** Macroscopic dark-field images from emulsion-dipped coronal sections at the level of PFC (AP +3.2 mm) from control (A1) and treated (A2) rats showing the localization of cells expressing *c-fos* mRNA. Note the 8-OH-DPAT-induced expression of *c-fos* in various areas of the PFC, notably in its medial part, where the extracellular recordings were made. **(B)** High magnification photomicrographs showing the detection in mPFC (prelimbic area) of *c-fos* mRNA by using ³³P-labeled oligonucleotides (silver grains) in pyramidal cells, visualized by hybridization with digoxigenin-labeled oligonucleotides complementary to vGluT1 mRNA (dark precipitates). Note the increase in the number of *c-fos* positive cells induced by 8-OH-DPAT treatment. (B1: saline; B2: 8-OH-DPAT). Blue arrowheads mark some cells positive for vGluT1 mRNA, black arrowheads mark some cells positive for *c-fos* mRNA. Double labeled cells are marked by both arrowheads. **(C)** High magnification photomicrographs showing the expression of *c-fos* mRNA (silver grains) in GABAergic cells of the prelimbic PFC, visualized by GAD mRNA (dark precipitate). Note the increase in the number of *c-fos* positive cells not expressing GAD mRNA in the 8-OH-DPAT group (C2) (black arrowheads). **(D)** Bar graphs showing drug effects on the percentage of pyramidal [vGluT1-positive (*left*)] and GABAergic neurons [GAD-positive (*right*)] expressing *c-fos* mRNA after treatment. Bars show mean ± SEM of 3 rats/group. **P* < 0.01 vs. saline. (Scale bar: 10 µm.).



Discussion

The present study shows that the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT produces a biphasic dose-response curve on the activity of mPFC pyramidal neurons projecting to the VTA, with excitations at low doses and inhibitions at higher doses. Our results suggest that the excitation on mPFC pyramidal neurons produced by low doses of 8-OH-DPAT is secondary to the action of this drug on mPFC fast-spiking GABAergic interneurons. The involvement of 5-HT_{1A} receptors in the hippocampus or raphe 5-HT_{1A} autoreceptors as well as unspecific actions of 8-OH-DPAT on other receptors or differential actions of the (+)enantiomer vs. the racemic compound seem to be discarded to explain the 8-OH-DPAT-induced excitations of mPFC pyramidal neurons. The present observations may be relevant for the treatment of negative symptoms and cognitive deficits in schizophrenia which are poorly treated by current antipsychotic drugs, as an increase of pyramidal neuron activity in mPFC may balance monoamine neurotransmission in this area and facilitate the activity of mPFC in tasks such as working memory (see Fuster, 2008 for review). Moreover, although 8-OH-DPAT is not available for human use, recent 5-HT_{1A} agonists in development with a preferential action on postsynaptic 5-HT_{1A} receptors, like F15599, also increase pyramidal neuron activity at low doses (Lladó-Pelfort et al., 2010). This excitatory effect was previously seen with other compounds displaying 5-HT_{1A} receptor affinity (Borsini et al., 1995; Diaz-Mataix et al., 2006), which suggests a similar mechanism of action.

8-OH-DPAT exerted a biphasic dose-response curve on mPFC pyramidal cell firing activity. The inhibitions produced by 8-OH-DPAT can be accounted for by a direct action through 5-HT_{1A} receptors located on mPFC pyramidal neurons (Kia et al., 1996; Czyrak et al., 2003), as 50-60 % pyramidal neurons in mPFC express this receptor (Santana et al., 2004). These results are also in agreement with previous studies showing that local application of 5-HT_{1A} agonists inhibits putative cortical pyramidal neurons (Araneda and Andrade, 1991; Ashby et al., 1994; Rueter and Blier, 1999). They are also consistent with the inhibitory effect of endogenous serotonin on mPFC pyramidal neurons through 5-HT_{1A} receptors (Amargós-Bosch et al., 2004; Puig et al., 2005).

Since 8-OH-DPAT is a racemic mixture, the biphasic dose-response curve could theoretically be due to differential actions of the two enantiomers. Some studies have shown the possibility of agonist-directed trafficking at 5-HT_{1A} receptors (Newman-Tancredi et al., 2009; Valdizán et al., 2009). Hence, a differential action of the two enantiomers on different signalling pathways (being the (+)enantiomer the full agonist) could elicit such a biphasic dose-response. Our results do not support this hypothesis as the administration of the (+)enantiomer also evoked the same type of biphasic dose-response, with excitations at low doses of (+)8-OH-DPAT. Moreover, despite 8-OH-DPAT shows also affinity for 5-HT₇ receptors (Ruat et al. 1993) both the inhibitory and excitatory actions were reversed by the selective 5-HT_{1A} antagonist WAY-100635, which rules out the involvement of 5-HT₇ receptors. On the other hand, 8-OH-DPAT shows more than one order of magnitude of selectivity for 5-HT_{1A} than for 5-HT₇ receptors (<http://pdsp.med.unc.edu/pdsp.php>), suggesting that any effect mediated through 5-HT₇ receptors should occur at high doses of the agent.

The lack of an appropriate pharmacological reason to account for the biphasic effect of 8-OH-DPAT suggests that it may be due to network properties, inasmuch as 5-HT_{1A} receptors are expressed at medium-high density in other cell types and brain areas projecting to the mPFC, such as the raphe nuclei –where cell bodies of serotonergic neurons are located- and the hippocampal formation, which projects to mPFC (Jay et al., 1989).

8-OH-DPAT inhibits the activity of dorsal raphe serotonergic neurons with an ED₅₀ of 0.8µg/kg i.v. using the same experimental conditions than in the present study (Romero et al., 2003; Lladó-Pelfort et al., unpublished observations). Similar ED₅₀ values have been reported by other groups (Blier et al., 1987a; Hajós et al., 1999). Thus, the excitatory effect of 8-OH-DPAT could potentially be due to a loss of serotonergic tone on other 5-HT receptors in mPFC, thus resulting in an increase of pyramidal discharge. The present results do not support this hypothesis, as a) maximal inhibition of 5-HT release induced by 8-OH-DPAT occurred at doses higher than those evoking pyramidal excitations using the same experimental conditions, and b) pyramidal excitations occurred as well in rats with a dramatic depletion of 5-

HT. Both observations indicate that pyramidal excitations induced by 8-OH-DPAT cannot be due to a fall of 5-HT release secondary to 5-HT_{1A} autoreceptor activation at low 8-OH-DPAT doses.

The hippocampal formation is the brain area with the highest density of 5-HT_{1A} receptors (Pazos and Palacios, 1985; Pompeiano et al., 1992). Moreover, excitatory projections from the hippocampus reach the mPFC and exert a phasic control on mPFC pyramidal and GABAergic neurons (Dégenétais et al., 2003; Tierney et al., 2004). Both observations raise the possibility that an 8-OH-DPAT action on hippocampal 5-HT_{1A} receptors may translate into a parallel change on mPFC neurons. However, in the present experimental conditions, pyramidal hippocampal neurons projecting to mPFC are silent and the i.v. administration of 8-OH-DPAT did not elicit any increase in discharge rate, thus suggesting that hippocampal 5-HT_{1A} receptors do not play a role in the effects of 8-OH-DPAT on mPFC pyramidal neurons.

In addition to the hippocampus and raphe nuclei, the mPFC contains a high density of 5-HT_{1A} receptors, which are located in pyramidal and GABAergic neurons (Santana et al., 2004), thus raising the possibility that local network properties can account for the excitatory effect of 8-OH-DPAT. This hypothesis was also driven by the observation that the local effect of the 5-HT_{1A} agonist BAYx3702 on mPFC dopamine release was also biphasic (e.g., increase at low concentrations, decrease at high concentrations; Díaz-Mataix et al., 2005) and the excitatory effect was abolished by the concurrent perfusion of the GABA_A antagonist bicuculline (Díaz-Mataix et al., 2005). The dopamine increase in mPFC depends on the activation of 5-HT_{1A} receptors on mPFC neurons projecting to the VTA, which activates mesocortical dopamine neurons (Carr and Sesack, 2000; Díaz-Mataix et al., 2005). Moreover, GABAergic inputs onto GABA_A receptors have been shown to have a major impact on the function of brain networks (Steward et al., 1990; Tepper et al., 1995).

The present results give full support to the involvement of local GABAergic interneurons in the excitatory effect of 8-OH-DPAT on pyramidal neurons. First, the local blockade of GABA_A inputs with a leak of gabazine markedly altered the response of mPFC pyramidal neurons to 8-OH-DPAT, mainly avoiding its

excitatory effect. This was accompanied by an increase of the basal firing rate of pyramidal neurons, indicating an alteration of the balance between excitatory and inhibitory inputs onto the recorded neurons. The inability of 8-OH-DPAT to further increase pyramidal discharge rate is not due to an upper threshold since mPFC pyramidal neurons projecting to VTA can discharge at much higher rates (Puig et al., 2003; Kargieman et al., 2007).

A second evidence supporting the involvement of GABAergic interneurons in the excitatory effect of 8-OH-DPAT on pyramidal neurons is the reduction of cell firing of fast-spiking interneurons induced by the doses of the drug that excite pyramidal neurons. Fast spiking interneurons have been described as parvalbumin-expressing cells making synapses with the body, basal dendrites and axon hillock of the pyramidal neurons (De Felipe et al., 2001). The special location and synaptic connectivity of these neurons allows them to exert a tight control of pyramidal neuron activity. Therefore, the observed inhibition of fast-spiking GABAergic interneurons by low doses of 8-OH-DPAT could immediately translate into a disinhibition of pyramidal neurons in mPFC. Indeed, 5-HT_{1A} receptors are expressed by only 20% of GABAergic neurons in mPFC (Santana et al., 2004). However, cortical GABAergic interneurons (but not pyramidal neurons) are connected via electrical synapses (Galarreta and Hestrin, 1999; Galarreta and Hestrin, 2001; Hestrin and Galarreta, 2005; Fukuda, 2007). These GABAergic networks occur between different classes of interneurons (Simon et al., 2005), one of which are parvalbumin-positive, fast-spiking interneurons (Galarreta and Hestrin, 2002; Hestrin and Galarreta, 2005) and can extend for hundreds of microns in the neocortex (Fukuda, 2007). Thus, the activation of 5-HT_{1A} receptors in a single cell of a given GABAergic network can immediately result in an overall hyperpolarization of the whole network with the subsequent disinhibition of pyramidal neurons controlled by the network.

The mechanism by which 5-HT_{1A} agonists exert their preferential action on GABAergic interneurons remains to be elucidated. The recent demonstration that 5-HT_{1A} receptors can be coupled to different G proteins in different brain areas (Valdizán et al., 2009) opens the possibility that agonist-directed trafficking occurs also in different cell types. Moreover, since 5-HT_{1A} receptors

are coupled to GiRK channels (Andrade and Nicoll, 1987) among other signalling pathways, their activation may have a greater impact on fast-spiking interneurons, firing at greater rates than pyramidal neurons. This functional distinction may add to the potential existence of different transduction mechanisms for 5-HT_{1A} receptors in GABAergic and pyramidal neurons.

The selectivity of the excitatory action of 8-OH-DPAT on pyramidal neurons is also supported by histological experiments showing a very large increase in the number of vGluT1-positive (e.g., pyramidal) cells in mPFC without any significant effect on GABAergic cells. Since the expression of *c-fos* reflects increases in neuronal activity (Dragunow and Faull 1989; Konkle and Bielajew 2004), the inhibition of GABAergic activity induced by 8-OH-DPAT was not paralleled by a change in *c-fos* expression in this cell type. However, the absence of a *c-fos* increase in GABAergic cells permits to give further strength to the lack of involvement of hippocampal inputs as a source of the change observed in mPFC. Indeed, hippocampal axons synapse simultaneously on pyramidal and GABAergic cells in PFC (Tierney et al., 2004). Thus, in case of a hippocampal origin of the 8-OH-DPAT-induced excitation, a simultaneous activity increase should have been observed in pyramidal and GABAergic cells, both in electrophysiological recordings and in histological experiments measuring *c-fos* expression.

In summary, the present results support the view that 5-HT_{1A} receptor agonists exert their activation of mPFC pyramidal neurons by reducing GABA_A-mediated inputs. This action possibly involves local GABAergic networks, given the relatively low percentage of GABAergic neurons expressing 5-HT_{1A} receptors, in contrast with the predominant excitatory action of 8-OH-DPAT and other 5-HT_{1A} receptor agonists on mPFC pyramidal neurons. Given the role of mPFC 5-HT_{1A} receptors in the control of –among others- the ascending dopamine pathways, the present results may help to identify new targets for the development of drugs acting on negative symptoms and cognitive deficits in schizophrenia and related disorders.

References

Adell A, Sarna GS, Hutson PH, Curzon G (1989). An in vivo dialysis and behavioural study of the release of 5-HT by p-chloroamphetamine in reserpine-treated rats. *Br. J. Pharmacol.* 97: 206-212.

Abellán MT, Adell A, Honrubia MA, Mengod G, Artigas F (2000). GABA_B-RI receptors in serotonergic neurons: effects of baclofen on 5-HT output in rat brain. *Neuroreport.* 11:941-945.

Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G, Artigas F (2004) Co-expression and in vivo interaction of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14: 281-299.

Andrade R, Nicoll RA (1987) Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurons of the rat hippocampus recorded in vitro. *J Physiol* 394: 99–124.

Araneda R, Andrade R (1991) 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 40: 399-412.

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

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

Blier P, de Montigny C, Tardif D (1987) Short-term lithium treatment enhances responsiveness of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors without altering 5-HT autoreceptor sensitivity: an electrophysiological study in the rat brain. *Synapse.* 1:225-232.

Blier P, de Montigny C (1987b) Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT_{1A} agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain. *Synapse* 1987;1:470–480.

Borsini F, Ceci A, Bietti G, Donetti A (1995) BIM17, a 5-HT_{1A} receptor agonist/5-HT_{2A} receptor antagonist directly activates postsynaptic 5-HT inhibitory responses in the rat cerebral cortex. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 352: 283-290.

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*. 2010 Feb 17:1-16

Bubeníková-Valesová V, Votava M, Páleníček T, Horáček J (2007) The opposite effect of a low and a high dose of serotonin-1A agonist on behavior induced by MK-801. *Neuropharmacology* 52:1071-1078.

Bymaster FP, Calligaro DO, Falcone JF, Marsh RD, Moore NA, Tye NC, et al. (1996): Radioreceptor binding profile of the atypical antipsychotic olanzapine. *Neuropsychopharmacology* 14:87–96.

Carr DB, Sesack SR (2000) Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons. *J Neurosci* 20: 3864-3873.

Cruz D, Eggen S, Azmitia EC, Lewis DA (2004) Serotonin_{1A} receptors at the axon initial segment of prefrontal pyramidal neurons in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 161:739--742.

Cortés R, Mengod G, Celada P, Artigas F (1993) p-chlorophenylalanine increases tryptophan-5-hydroxylase mRNA levels in the rat dorsal raphe: a time course study using in situ hybridization. *J Neurochem* 60:761-764.

Czyrak A, Czepiel K, Mackowiak M, Chocyk A, Wedzony K (2003) 5-HT_{1A} receptors might control the output of cortical glutamatergic neurons in rat cingulate cortex. *Brain Res* 989: 42-51.

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

Dégenétais, E., Thierry, A.M., Glowinski, J. & Gioanni, Y. (2003) Synaptic influence of hippocampus on pyramidal cells of the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cereb. Cortex* 13: 782–792.

Diaz-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.

Díaz-Mataix L, Artigas F, Celada P (2006) Activation of pyramidal cells in rat medial prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area by a 5-HT_{1A} receptor agonist. *Eur Neuropsychopharmacol.* 16:288-296.

Dragunow M, Faull R (1989): The use of c-fos as a metabolic marker in neuronal pathway tracing. *J Neurosci Methods* 29: 261-265.

Fukuda, T. (2007). Structural organization of the gap junction network in the cerebral cortex. *Neuroscientist* 13: 199-207.

Fuller JH, Schlag JD (1976) Determination of antidromic excitation by the collision test: problems of interpretation. *Brain Res* 112:283–298.

Fuster JM (2008): *The Prefrontal Cortex*. Fourth edition. Elsevier.

Galarreta, M. and S. Hestrin (1999). A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses. *Nature* 402: 72-75.

Galarreta, M. and S. Hestrin (2001). Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nat Rev Neurosci* 2: 425-433.

Goff DC, Midha KK, Brotman AW, McCormick S, Waites M, Amico ET (1991) An open trial of buspirone added to neuroleptics in schizophrenic patients. *J Clin Psychopharmacol* 11:193–197.

Hajós M, Hajos-Korcsok E, Sharp T (1999) Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT_{1A} receptor- induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Br J Pharmacol* 126:1741–1750.

Hestrin S, Galarreta M (2005) Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *Trends Neurosci.* 28:304-9. Review.

Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, Fowler WL, O'Laughlin IA, Meltzer HY (2001a) 5-HT_{2A} and D2 receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT_{1A} receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. *J Neurochem* 76: 1521-1531.

Innis, RB and Aghajanian, GK (1987) Pertussis toxin blocks 5-HT_{1A} and GABA_B receptor-mediated inhibition of serotonergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 143, 195-204.

Jay TM, Glowinski J, Thierry AM. (1989) Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Res.* 505:337-40.

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.

Kern RS, Green MF, Cornblatt BA, Owen JR, McQuade RD, Carson WH, Ali M, Marcus R (2006) The neurocognitive effects of aripiprazole: an open-label comparison with olanzapine. *Psychopharmacology* 187:312-320.

Kia HK, Miquel MC, Brisorgueil MJ, Daval G, Riad M, El Mestikawy S, Hamon M, Vergé D (1996) Immunocytochemical localization of 5-HT_{1A} receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 365: 289-305.

Konkle AT, Bielajew C (2004): Tracing the neuroanatomical profiles of reward pathways with markers of neuronal activation. *Rev Neurosci* 15: 383-414.

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

Lopez-Gil X, Babot Z, Amargós-Bosch M, Suñol C, Adell A (2007) Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801-increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology* 32: 2087-97.

Lladó-Pelfort L, Assié MB, Newman-Tancredi A, Artigas F, Celada P (2010) Preferential in vivo action of F15599, a novel 5-HT_{1A} receptor agonist, at postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *British Journal of Pharmacology* (in press).

Mallet N, Le Moine C, Charpier S, Gonon F (2005) Feedforward inhibition of projection neurons by fast-spiking GABA interneurons in the rat striatum in vivo. *J Neurosci* 25:3857-3869.

Martinez D, Hwang DR, Mawlawi O, Slifstein M, Kent J, Simpson N, Parsey RV, Hashimoto T, Huang YY, Shinn A, VanHeertum R, Abidargham A, Caltabiano S, Malizia A, Cowley H, Mann JJ, Laruelle M (2001) Differential occupancy of somatodendritic and postsynaptic 5HT(1A) receptors by pindolol: a dose--occupancy study with [C-11]WAY 100635 and positron emission tomography in humans. *Neuropsychopharmacology* 24:209--229.

Meltzer HY, Sumiyoshi T. (2008) Does stimulation of 5-HT(1A) receptors improve cognition in schizophrenia? *Behav Brain Res* 195:98-102.

Meneses A, Perez-Garcia G. (2007) 5-HT(1A) receptors and memory. *Neurosci Biobehav Rev*. 2007;31(5):705-27. Review.

Newman-Tancredi A, Martel JC, Assié MB, Buritova J, Laressergues E, Cosi C, Heusler P, Bruins Slot L, Colpaert FC, Vacher B, Cussac D (2009) Signal transduction and functional selectivity of F15599, a preferential post-synaptic 5-HT_{1A} receptor agonist. *Br J Pharmacol* 156: 338-353.

Paxinos G, Watson C (1998): *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Sydney: Academic Press.

Pazos A, Palacios JM (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 346:205–230.

Pinault D (1996) A novel single-cell staining procedure performed in vivo under electrophysiological control: Morpho-functional features of juxtacellularly labeled thalamic cells and other central neurons with biocytin or Neurobiotin. *J Neurosci Methods* 65:113–136.

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G (1992) Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 12: 440-453.

Puig MV, Celada P, Díaz-Mataix L, Artigas F (2003) In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT_{2A} receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cereb Cortex* 13:870-882.

Puig MV, Artigas F, Celada P (2005) Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: Involvement of serotonin and GABA. *Cereb Cortex* 15: 1-14.

Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, El Mestikawy S, Hamon M, Descarries L (2000) Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417:181–194.

Rollema H, Lu Y, Schmidt AW, Zorn SH (1997) Clozapine increases dopamine release in prefrontal cortex by 5-HT_{1A} receptor activation. *Eur J Pharmacol* 338:R3–R5.

Romero L, Celada P, Martín-Ruiz R, Díaz-Mataix L, Mourelle M, Delgadillo J, Hervás I, Artigas F (2003) Modulation of serotonergic function in rat brain by VN2222, a serotonin reuptake inhibitor and 5-HT_{1A} receptor agonist. *Neuropsychopharmacology* 28:445-56.

Ruat M, Traiffort E, Leurs R, Tardivel-Lacombe J, Diaz J, Arrang JM, Schwartz JC. (1993) Molecular cloning, characterization, and localization of a high-

affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:8547-51.

Rueter LE, Blier P (1999) Electrophysiological examination of the effects of sustained flibanserin administration on serotonin receptors in rat brain. *Br J Pharmacol* 126:627-638.

Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F (2004) Expression of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14: 1100-1109.

Simon A, Oláh S, Molnár G, Szabadics J, Tamás G. (2005) Gap-junctional coupling between neurogliaform cells and various interneuron types in the neocortex. *J Neurosci.* 25:6278-6285.

Sirota P, Epstein B, Benatov R, Sousnostzky M, Kindler S (2001) An open study of buspirone augmentation of neuroleptics in patients with schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 2001;21:454–5.

Sovner R, Parnell-Sovner N (1989) Use of buspirone in the treatment of schizophrenia. *J Clin Psychopharmacol* 9:61–62.

Sprouse JS, Aghajanian GK. Responses of hippocampal pyramidal cells to putative serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists: a comparative study with dorsal raphe neurons (1988). *Neuropharmacology* 27:707–715

Steward O, Tomasulo R, Levy WB (1990) Blockade of inhibition in a pathway with dual excitatory and inhibitory action unmasked a capability for LTP that is otherwise not expressed. *Brain Res* 5 16:292-300.

Sumiyoshi T, Stockmeier CA, Overholser JC, Dilley GE, Meltzer HY (1996) Serotonin_{1A} receptors are increased in post-mortem prefrontal cortex in schizophrenia. *Brain Res* 1996;708:209–714.

Sumiyoshi T, Matsui M, Yamashita I, Nohara S, Uehara T, Kurachi M, Meltzer HY (2000) Effect of adjunctive treatment with serotonin-1A agonist tandospirone on memory functions in schizophrenia [letter]. *J Clin Psychopharmacol* 20:386–388.

Sumiyoshi T, Matsui M, Nohara S, Yamashita I, Kurachi M, Sumiyoshi C, Jayathilake K, Meltzer HY (2001a) Enhancement of cognitive performance in schizophrenia by addition of tandospirone to neuroleptic treatment. *Am J Psychiatry* 158:1722–1725.

Sumiyoshi T, Matsui M, Yamashita I, Nohara S, Kurachi M, Uehara T, Sumiyoshi S, Sumiyoshi C, Meltzer HY (2001b) The effect of tandospirone, a serotonin(1A) agonist, on memory function in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 49:861–868.

Sumiyoshi C, Sumiyoshi T, Roy A, Jayathilake K, Meltzer HY (2006) Atypical antipsychotic drugs and organization of long-term semantic memory: multidimensional scaling and cluster analyses of category fluency performance in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol*. 9:677-683.

Sumiyoshi T, Higuchi Y, Matsui M, Arai H, Takamiya C, Meltzer HY, Kurachi M (2007) Effective adjunctive use of tandospirone with perospirone for enhancing verbal memory and quality of life in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 31:965–7.

Tepper JM, Martin LP, Anderson DR (1995) GABA_A receptor-mediated inhibition of rat substantia nigra dopaminergic neurons by pars reticulata projection neurons. *J. Neurosci* 15: 3092-3103.

Tierney PL, Dégenétais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y (2004) Influence of the hippocampus on interneurons of the rat prefrontal cortex. *Eur J Neurosci* 20:514-524.

Tomiyama M, Palacios JM, Cortés R, Vilaró MT, Mengod G (1997) Distribution of AMPA receptor subunit mRNAs in the human basal ganglia: an in situ hybridization study *Brain Res Mol Brain Res* 46:281–289.

Valdizán EM, Castro E, Pazos A (2009) Agonist-dependent modulation of G-protein coupling and transduction of 5-HT_{1A} receptors in rat dorsal raphe nucleus. *Int J Neuropsychopharmacol* 9:1-9.

Winstanley CA, Chudasama Y, Dalley JW, Theobald DE, Glennon JC, Robbins TW (2003) Intra-prefrontal 8-OH-DPAT and M100907 improve visuospatial

attention and decrease impulsivity on the five-choice serial reaction time task in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 167:304-314.

Woodward ND, Purdon SE, Meltzer HY, Zald DH (2005) A meta-analysis of neuropsychological change to clozapine, olanzapine, quetiapine, and risperidone in schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 8:4

TREBALL 2

L'F15599, un nou agonista del receptor 5-HT_{1A}, amb acció preferencial sobre els heteroreceptors postsinàptics *in vivo*

Resum

Antecedents i objectiu: L'F15599 és un novedós agonista del receptor 5-HT_{1A} 1000 vegades més selectiu per aquest receptor que per altres receptors monoaminèrgics. Mostra activitat antidepressiva i procognitiva a dosis molt baixes en models animals. L'objectiu d'aquest treball és examinar l'activitat *in vivo* de l'F15599 als autoreceptors 5-HT_{1A} somatodendrítics i als heteroreceptors 5-HT_{1A} postsinàptics.

Aproximació experimental: Registres unitaris extracel·lulars, registres de potencial de camp i microdiàlisi intracerebral en rata *in vivo*.

Resultats clau: L'F15599 va augmentar la freqüència de descàrrega de les neurones piramidals d'EPFm a partir de 0.2 µg·kg⁻¹ i.v. i va reduir la de les neurones serotoninèrgiques del rafe dorsal a dosis deu vegades més altes (dosi mínima efectiva 8.2 µg·kg⁻¹ i.v.). Ambdós efectes foren revertits per l'antagonista (±)WAY100635. En els experiments de microdiàlisi, l'F15599 va augmentar l'alliberament de dopamina a EPF-un efecte depenent de l'activació d'heteroreceptors postsinàptics 5-HT_{1A}- amb una ED₅₀ de 30 µg·kg⁻¹ i.p., mentre que va reduir l'alliberament de serotonina hipocampal -un efecte depenent principalment dels autoreceptors presinàptics- amb una ED₅₀ de 240 µg·kg⁻¹ i.p.. Així mateix, l'aplicació local per diàlisi inversa d'F15599 a l'EPFm va augmentar l'alliberament de dopamina d'una manera concentració-depenent. Totes les respostes neuroquímiques foren evitades per l'administració de (±)WAY100635.

Conclusions i implicacions: Aquests resultats indiquen que l'F15599 activa preferentment heteroreceptors 5-HT_{1A} postsinàptics abans que els autoreceptors 5-HT_{1A} somatodendrítics. Aquesta selectivitat regional diferencia l'F15599 dels agonistes 5-HT_{1A} desenvolupats anteriorment, els quals activen preferentment els autoreceptors somatodendrítics. Això suggereix que l'F15599 podria ser particularment útil en el tractament de la depressió i dels dèficits cognitius en esquizofrènia.

RESEARCH PAPER

Preferential *in vivo* action of F15599, a novel 5-HT_{1A} receptor agonist, at postsynaptic 5-HT_{1A} receptors

L Lladó-Pelfort^{1,2}, M-B Assié³, A Newman-Tancredi³, F Artigas^{1,2,4} and P Celada^{1,2,4}

¹Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), IDIBAPS, Barcelona, Spain, ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM), ••, ³Neurobiology Division 2, Centre de Recherches Pierre Fabre, Castres, France, and ⁴Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain

Background and purpose: F15599, a novel 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A} receptor agonist with 1000-fold selectivity for 5-HT compared with other monoamine receptors, shows antidepressant and procognitive activity at very low doses in animal models. We examined the *in vivo* activity of F15599 at somatodendritic autoreceptors and postsynaptic 5-HT_{1A} heteroreceptors.

Experimental approach: *In vivo* single unit and local field potential recordings and microdialysis in the rat.

Key results: F15599 increased the discharge rate of pyramidal neurones in medial prefrontal cortex (mPFC) from 0.2 µg·kg⁻¹ i.v. and reduced that of dorsal raphe 5-hydroxytryptaminergic neurones at doses >10-fold higher (minimal effective dose 8.2 µg·kg⁻¹ i.v.). Both effects were reversed by the 5-HT_{1A} antagonist (±)WAY100635. F15599 did not alter low frequency oscillations (~1 Hz) in mPFC. In microdialysis studies, F15599 increased dopamine output in mPFC (an effect dependent on the activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors) with an ED₅₀ of 30 µg·kg⁻¹ i.p., whereas it reduced hippocampal 5-HT release (an effect dependent exclusively on 5-HT_{1A} autoreceptor activation) with an ED₅₀ of 240 µg·kg⁻¹ i.p. Likewise, application of F15599 by reverse dialysis in mPFC increased dopamine output in a concentration-dependent manner. All neurochemical responses to F15599 were prevented by administration of (±)WAY100635.

Conclusions and implications: These results indicate that systemic administration of F15599 preferentially activates postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in PFC rather than somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors. This regional selectivity distinguishes F15599 from previously developed 5-HT_{1A} receptor agonists, which preferentially activate somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors, suggesting that F15599 may be particularly useful in the treatment of depression and of cognitive deficits in schizophrenia. *British Journal of Pharmacology* (2010) **1**, ••-••; doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00738.x

Keywords: 5-HT_{1A} receptors; dopamine; pyramidal neurones; depression; prefrontal cortex; schizophrenia; microdialysis, local field potential

Abbreviations: DR, dorsal raphe nucleus; F15599, 3-chloro-4-fluorophenyl-(4-fluoro-4-[(5-methyl-pyrimidin-2-yl)methyl]-amino)-methyl)-piperidin-1-yl)-methanone; LFP, local field potential; mPFC, medial prefrontal cortex

Introduction

5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A} receptors are widely expressed in mammalian brain. They are located on the soma and dendrites of 5-hydroxytryptaminergic neurones, where they have an autoreceptor role, and are also located in pyramidal and GABAergic neurones of the neocortex and limbic system (Pazos and Palacios, 1985; Pompeiano *et al.*, 1992; Kia *et al.*, 1996; Riad *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2001; Cruz *et al.*, 2004; Santana *et al.*, 2004), where they mediate inhibitory actions

of 5-HT (Andrade and Nicoll, 1987; Blier and de Montigny, 1987; Innis and Aghajanian, 1987; Araneda and Andrade, 1991; Puig *et al.*, 2005).

5-HT_{1A} receptors play a major role in the antidepressant action of selective 5-HT re-uptake inhibitors and other 5-HT-enhancing drugs. 5-HT_{1A} autoreceptor activation by the increased extracellular 5-HT induced by re-uptake or MAO inhibition in the median and dorsal raphe nuclei (DR) limits the neurochemical and clinical actions of these antidepressant drugs (Artigas *et al.*, 1996; 2001). On the other hand, the activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors is a characteristic of several types of antidepressant drugs (Haddjeri *et al.*, 1998; Blier and Ward, 2003).

Although no. 5-HT_{1A} receptor subtypes have been identified, 5-HT_{1A} receptor subpopulations exhibit contrasting properties. Thus, 5-HT_{1A} agonists such as 8-OH-DPAT and

Correspondence: Francesc Artigas, Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, IIBB-CSIC (IDIBAPS), Rosselló 161, 6th Floor, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: fapnqi@iibb.csic.es

Received 6 November 2009; revised 28 January 2010; accepted 5 February 2010

azapirones, preferentially activate raphe somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors (Sprouse and Aghajanian, 1987; see Blier and Ward, 2003 for review). This regional selectivity has been interpreted as resulting from the existence of a receptor reserve in the raphe (Meller *et al.*, 1990; Cox *et al.*, 1993), which limits the potential antidepressant usefulness of existing 5-HT_{1A} agonists. Indeed, their administration first elicits a loss of 5-hydroxytryptaminergic tone on all other postsynaptic receptors, due to activation of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors, which also results in insufficient activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. However, 5-HT_{1A} agonists may be useful as adjuvant therapies for the treatment of negative symptoms and cognitive deficits in schizophrenia as they increase dopamine (DA) release in prefrontal cortex (PFC) as a result of the activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors (Millan, 2000; Rollema *et al.*, 1997; 2000; Ichikawa *et al.*, 2001; Diaz-Mataix *et al.*, 2005). Clinical support for this assertion has been generated using the partial agonist tandospirone to improve cognitive function in schizophrenia patients treated with antipsychotics (Sumiyoshi *et al.*, 2001a, b; see Meltzer and Sumiyoshi, 2008 for review).

F15599 (3-chloro-4-fluorophenyl-(4-fluoro-4-[(5-methylpyrimidin-2-ylmethyl)-amino]-methyl)-piperidin-1-yl)-methanone) is a novel 5-HT_{1A} receptor agonist with >1000-fold selectivity for this receptor compared with other known monoamine receptors, transporters and enzymes (Newman-Tancredi *et al.*, 2009). F15599 is highly effective in the forced swim test, a measure of antidepressant-like properties (ED₅₀-100 µg·kg⁻¹ p.o.) (Bardin *et al.*, 2007) suggesting a strong postsynaptic action. Moreover, it shows procognitive activity [attenuation of phencyclidine (PCP)-induced deficits in working memory] at 160 µg·kg⁻¹ i.p. (Auclair *et al.*, 2007; Pierre Fabre, unpublished observations). However, while the *in vitro* and *ex vivo* actions of F15599 reveal an agonist profile at 5-HT_{1A} receptors located in different brain regions that distinguish it from other agonists and chemical congeners (Buritova *et al.*, 2009; Newman-Tancredi *et al.*, 2009), nothing is known about its auto/heteroreceptor selectivity *in vivo*. Hence, in the present study the *in vivo* effect of F15599 on pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors was examined using single unit extracellular recordings and microdialysis in rat brain.

Methods

Electrophysiological studies

Animals. Male albino Wistar rats (230–300 g; Iffa Credo, Lyon, France) were kept in a controlled environment (12 h light–dark cycle and 22 ± 2°C room temperature) with food and water provided *ad libitum*. Animal care followed the European Union regulations (O.J. of E.C. L358/1 18/12/1986) and was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. Stereotaxic co-ordinates (in mm) were taken from bregma and duramater according to the atlas of Paxinos and Watson (1998). The total number of rats used in the electrophysiological experiments was 50.

Single unit recordings. We examined the responses elicited by F15599 on 5-hydroxytryptaminergic neurones of the DR and

on pyramidal neurones of the medial PFC (mPFC). For 5-hydroxytryptaminergic neurones, recordings were made as described in Celada *et al.* (2001) and Romero *et al.* (2003). Pyramidal neurones were recorded as described in Puig *et al.* (2003) and Kargieman *et al.* (2007). Rats were administered chloral hydrate (400 mg·kg⁻¹ i.p.) and positioned in a David Kopf stereotaxic frame. Thereafter, chloral hydrate was continuously administered i.p. at 50–70 mg·kg⁻¹·h⁻¹ using a perfusion pump.

Neurones were recorded extracellularly with glass micropipettes filled with 2 M NaCl. Impedance was between 6 and 12 MΩ. Single unit recordings were amplified with a Neurodata IR283 (Cygnus Technology Inc., Delaware Water Gap, PA), postamplified and filtered with a Cibertec amplifier and computed on-line using a DAT 1401plus interface system Spike2 software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK). Local field potentials (LFP) were obtained by on-line band-pass filtering the signal from the recording electrode, as described (Kargieman *et al.*, 2007).

For recordings in the DR, a burr hole was drilled over lambda and the sagittal sinus was ligated, cut and deflected. Descents were carried out along the midline. 5-HT neurones were typically recorded 4.7–6.6 mm below the brain surface and were identified according to previously described electrophysiological criteria (Wang and Aghajanian, 1977).

Pyramidal neurones in the mPFC were recorded as follows. Bipolar stimulating electrodes were implanted in the VTA (AP –5.8, L –0.4, DV –8.2) for the antidromic stimulation of pyramidal neurones projecting to midbrain. All recorded units were identified as pyramidal neurones by antidromic activation from VTA and collision extinction with spontaneously occurring spikes as described previously (Puig *et al.*, 2003). Descents in mPFC were carried out at AP +3.2–3.4, L –0.5 to –1.0, DV –1.0 to –4.0 below the brain surface. Basal firing activity was recorded for at least 5 min and then, one or increasing drug doses were administered i.v. every 3 min, followed by the 5-HT_{1A} receptor antagonist (±)WAY100635 when appropriate.

At the end of the experiments, rats were killed by an anaesthetic overdose. The placement of the stimulating electrodes was verified histologically. After being perfused with 10% formalin solution (Sigma), the brains were post-fixed, coronally sectioned (80 µm) and stained with Neutral Red. The data from rats with stimulating electrodes outside VTA were not included in the analysis.

Data analysis. Changes in discharge rate were quantified by averaging the values in the third minute after each drug injection. Neurones were considered to respond to drugs if firing rate was altered ±30% from baseline. Burst analysis was carried out using the method of Laviolette *et al.* (2005).

Power spectra were constructed using Fast Fourier Transformations (FFT) of 1 min signal intervals (same as discharge rate) with a resolution of 0.3 Hz (FFT size of 8192). Data are given as AUC of the power spectrum between 0.3 and 4 Hz, expressed as percentage of pre-drug values.

Drug effects were assessed using Student's *t*-test or one-way ANOVA for independent or repeated measures, as appropriate. Data are expressed as the mean ± SEM. Statistical significance has been set at the 95% confidence level.

Microdialysis studies

Animals. Male Sprague-Dawley rats (OFA, Charles River, France), weighing 240–260 g upon arrival were group housed (three rats per cage), under controlled conditions (12/12 light/dark cycle: lights on 07h00min; ambient temperature $21 \pm 1^\circ\text{C}$; humidity $55 \pm 5\%$), with rat food (A04, SAFE, Augy, France) and filtered (0.2 μm pore diameter) tap water freely available. Animals were housed and tested in an Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC Intl.)-accredited facility in strict compliance with all applicable regulations and the protocols were carried out in compliance with French regulations and with local Ethical Committee guidelines for animal research. The total number of rats used in the microdialysis experiments was 145.

Microdialysis procedure. Rats were anaesthetized with chloral hydrate (400–500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) or isoflurane. A guide cannula with a dummy probe was stereotaxically implanted into the mPFC, stereotaxic coordinates: AP +3.0 mm, L +0.8 mm, DV –1.7 mm or the hippocampus: AP –4.8 mm, L +4.6 mm, DV –4.6 mm, from bregma and skull surface. Following surgery and recovery from anaesthesia, animals were returned to their home cages. At the end of the day, each rat was placed in a microdialysis cage. On the following day, the dummy probe was replaced by a microdialysis probe (3 mm length, 0.5 mm diameter, CMA, Microdialysis AB). The probe was continuously perfused (1.1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) with artificial CSF (aCSF) containing 1 μM citalopram for the measurement of 5-HT. Samples were collected every 20 min with the first four samples used for baseline. For the experiments involving systemic administration of the compounds, saline or (\pm)WAY100635 was injected s.c., followed by i.p. administration of saline or F15599 40 min later. For the experiments involving local perfusion, saline was injected s.c and 40 min later, F15599 was added to the perfusion medium for the concentration-response experiment. For the antagonism (\pm)WAY100635 (or aCSF) was delivered through the dialysis probe and 40 min later, F15599 was added to the perfusion medium. Samples were collected for 140 min after administration or beginning of the perfusion of the agonist. At the end of the experiment, rats were killed by anaesthetic overdose (pentobarbital 160 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) and the brain was removed, frozen and cut in a cryomicrotome (Jung Frigocut 2800) to verify the placement of the probe.

Analytical procedure. Analysis of 5-HT and DA was performed by HPLC, as described by Assié *et al.* (2005). The HPLC column was a reverse phase (Merck, Lichrocart 125-2, Superspher 100 RP-18). The mobile phase was pumped at 0.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (HPLC-118 solvent module, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). DA or 5-HT was electrochemically detected with a glassy carbon working electrode kept at +0.64 V versus Ag/AgCl reference electrode (DECADE detector, ANTEC Leyden BV, Leiden, the Netherlands). Data were acquired using a Beckman 32 Karats system. Concentrations of DA or 5-HT in the brain dialysates were estimated by comparing peak areas with those of external standards of known concentration of each neurotransmitter. The limit of

detection (three times baseline noise) was approximately 1 $\text{fmol}\cdot 20\ \mu\text{L}^{-1}$ sample.

Data analysis. Dialysate 5-HT or DA concentrations are given as $\text{fmol}\cdot 20\ \text{min}^{-1}$ fraction and expressed in the figures as percentages of baseline. Statistical analysis was carried out using repeated-measures ANOVA using treatment and time as variables. The mean % AUC values for the 140 min period after administration of F15599 were analysed by one-way ANOVA followed by Dunnett's test (GraphPad Prism, San Diego, CA, USA). Mean % AUC values were used to estimate the ED₅₀ value of F15599 by linear interpolation between the two doses that increased DA or decreased 5-HT levels with amounts bordering 50% (vehicle control as 0% and maximal effect of the compound as 100%). The antagonist effect was analysed by comparing the overall effect of the agonist with its effect at the same dose in the presence of (\pm)WAY100635 using Student's *t*-test.

Drugs. F15599 (3-chloro-4-fluorophenyl-(4-fluoro-4-[(5-methyl-pyrimidin-2-ylmethyl)-amino]-methyl)-piperidin-1-yl)-methanone) tosylate salt was from Pierre Fabre Medicament. (\pm)WAY100635 (N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridinyl)cyclohexanecarboxamide) hydrochloride was from RBI (Natick, MA). Stock solutions were prepared and aliquots were stored at -20°C . Working solutions were prepared daily by dilution in saline at the appropriate concentrations and injected i.v. (up to 1 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) through the femoral vein. Doses are expressed as weight of free bases.

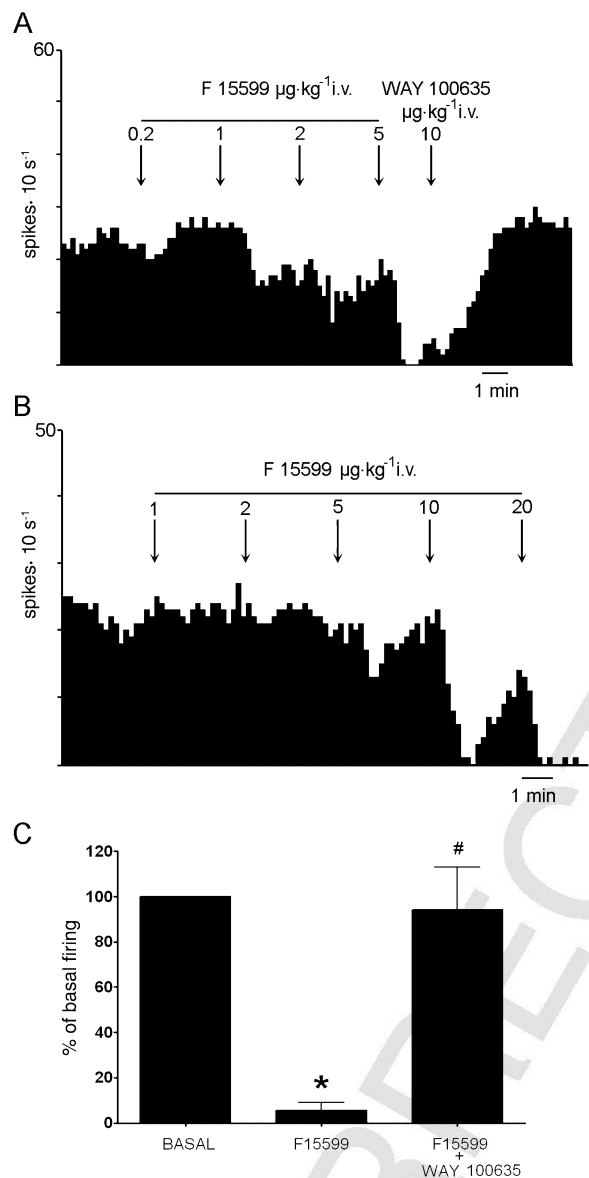
Chloral hydrate was purchased from Acros (Geel, Belgium), pentobarbital sodium from Ceva Santé Animale (Libourne, France), isoflurane from Baxter SA (Paurenas, France). Citalopram hydrobromide was kindly donated by Lundbeck (Copenhagen, Denmark). (\pm)WAY100635 and F15599 (fumarate salt) were synthesized at the Centre de Recherche Pierre Fabre. The doses of compounds are expressed as the weight of the free base. (\pm)WAY100635 and F15599 were dissolved in distilled water; the injection volume was 0.1 $\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$.

All drug and molecular target nomenclature conforms to *The British Journal of Pharmacology's* 'Guide to Receptors and Channels' (Alexander *et al.*, 2008).

Results

Effect of F15599 on the activity of DR 5-hydroxytryptaminergic neurones

We examined the effect of F15599 on 5-hydroxytryptaminergic neurones ($n = 11$; one per rat) of the DR in the range 0.2–20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.v. At the higher doses, F15599 decreased the activity of all 5-HT neurones. Most neurones were fully inhibited after the administration of 5–10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.v. (corresponding to 8.2–18.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.v. cumulative dose). Figure 1 shows examples of the suppressant effect of F15599 on DR 5-HT neurones. Figure 2A shows the dose-response relationship for all neurones examined. One-way ANOVA indicated a significant effect of F15599 ($F_{5,46} = 13.5$; $P < 0.00001$) with significant post-hoc differences (Newman-Keuls test) at the doses of 8.2 and 18.2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ vs. baseline. One-way



Figures 1 (A, B) Integrated firing rate histogram showing the effect of the i.v. administration of F15599 on the activity of DR 5-HT neurones recorded extracellularly in chloral hydrate anaesthetized rats. The activity of these neurones was completely suppressed at 8.2 and 38 µg·kg⁻¹ i.v. (cumulative doses) respectively. (A) Shows the reversal of the inhibition induced by F15599 by the subsequent administration of the 5-HT_{1A} receptor antagonist (±)WAY100635. (C) Histogram showing the reversal by (±)WAY100635 (5–50 µg·kg⁻¹ i.v.) of the maximal effect on DR 5-HT cell firing induced by F15599. Data are means ± SEM of five neurones. **P* < 0.05 vs. baseline; #*P* < 0.05 vs. maximal inhibition; Newman–Keuls test post-ANOVA.

repeated measures ANOVA of the subset of neurones that received all F15599 doses (*n* = 7) also revealed a significant effect of treatment (*F*_{5,30} = 19.1; *P* < 0.00001) with significant post-hoc differences (Newman–Keuls test) at the doses of 8.2 and 18.2 µg·kg⁻¹ vs. baseline. The minimal effective dose for the inhibition of DR 5-HT neurones was 8.2 µg·kg⁻¹ i.v.

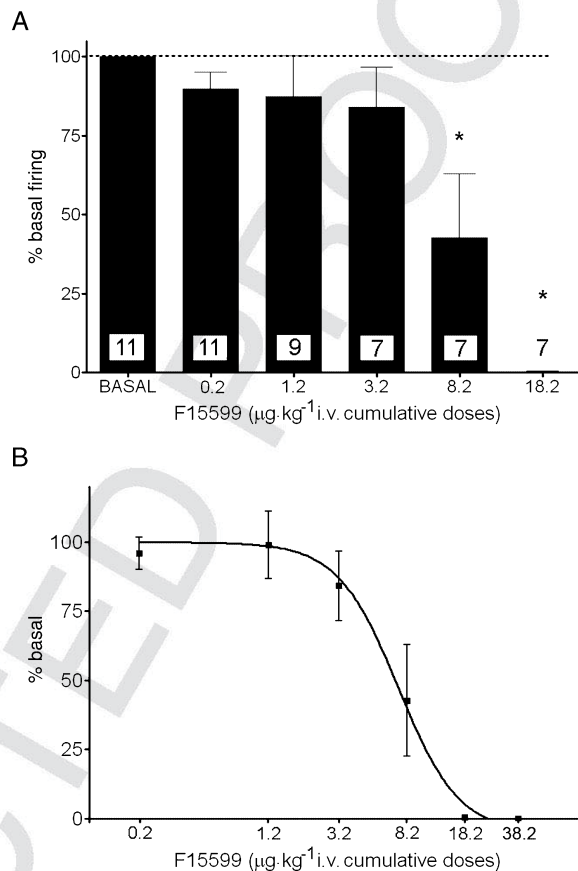


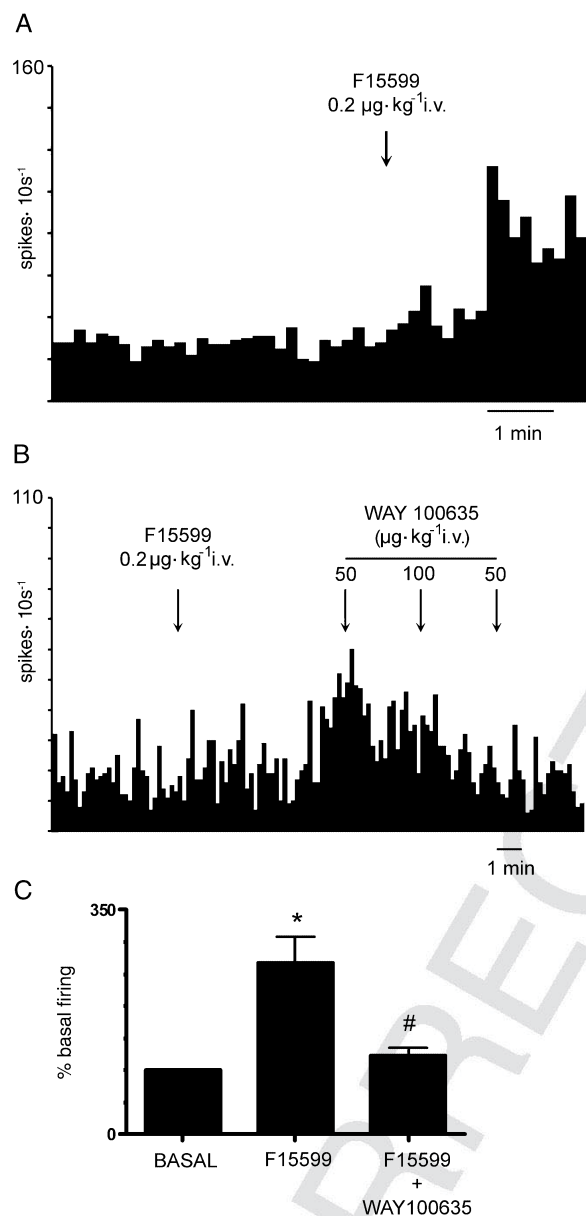
Figure 2 (A) Dose–response relationship of the effect of F15599 (0.2–38.2 µg·kg⁻¹ i.v., cumulative doses) on the discharge rate of 5-HT neurones in the DR. Data (means ± SEM) are expressed as percentages of baseline. The number of neurones in each group is shown in the columns. The complete suppression of firing at the higher dose (38.2 µg·kg⁻¹) is not shown. (B) Semi-log plot between cumulative F15599 dose (0.2–38.2 µg·kg⁻¹ i.v.) and the suppressant effect on DR 5-HT neurones receiving all F15599 doses (*n* = 7). The ED₅₀ was 7.3 µg·kg⁻¹ i.v. **P* < 0.05 vs. baseline, Newman–Keuls test post-ANOVA.

ED₅₀ values for the suppression of 5-HT cell firing have been calculated for the neurones of rats receiving all F15599 doses (*n* = 7) and for all rats receiving one or more doses of F15599 (*n* = 11). The corresponding values (given as cumulative doses) are 7.3 µg·kg⁻¹ i.v. (all doses) and 7.4 µg·kg⁻¹ i.v. (all rats) (Figure 2B).

The inhibition produced by F15599 was reversed in all cases examined (*n* = 5) by the subsequent administration of the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist (±)WAY100635 (5–50 µg·kg⁻¹ i.v.) (*F*_{2,8} = 24.1; *P* < 0.0005) (Figure 1A and C).

Effect of F15599 on the activity of pyramidal neurones of the mPFC

After pilot experiments had revealed a marked enhancement of the firing rate of pyramidal neurones in the mPFC at the lowest doses used for DR recordings (0.2 µg·kg⁻¹), two sets of



Figures 3 (A, B) Examples of the increase in discharge rate produced in mPFC pyramidal neurones by the i.v. administration of 0.2 µg · kg⁻¹ F15599. Note the reversal of F15599 effect by the subsequent administration of (±)WAY100635 (50–200 µg · kg⁻¹) in (B). (C) Shows the average effect produced by 0.2 µg · kg⁻¹ F15599 and its reversal by the subsequent administration of (±)WAY100635 (*n* = 5). **P* < 0.01 vs. basal; #*P* < 0.01 vs. F15599.

experiments were carried out. In the first experiment we examined the effect of this dose of F15599 and its reversal by (±)WAY-100635. A total of 15 neurones were recorded (1 neurone per rat) of which 11 were excited, two were inhibited and two remained unaltered by F15599 (Figure 3). The overall effect of this dose was a significant increase in the discharge

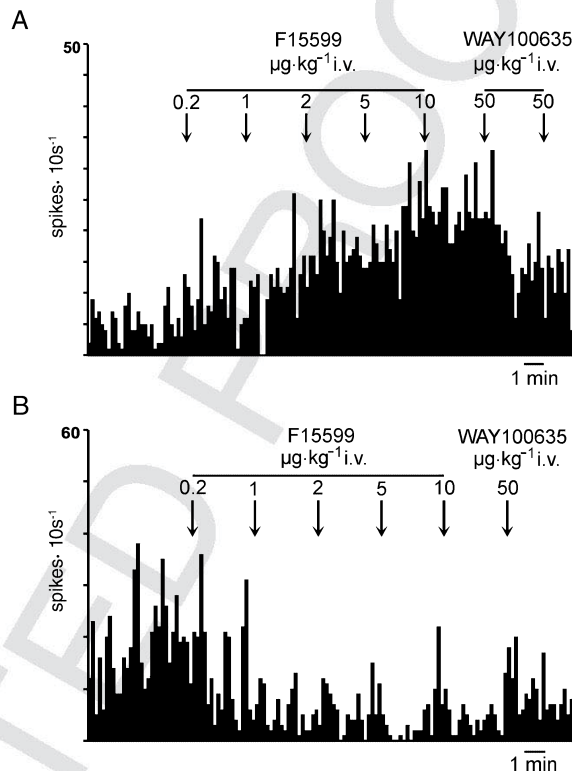


Figure 4 Examples of the effect of cumulative doses of F15599 on the discharge rate of pyramidal neurones of the mPFC. (A) This neurone was excited by F15599 at all doses examined. The maximal effect was attained after the administration of 10 µg · kg⁻¹ (18.2 µg · kg⁻¹ i.v., cumulative dose) and was antagonized by the subsequent administration of (±)WAY100635 (50–100 µg · kg⁻¹ i.v.). (B) A pyramidal neurone inhibited by low doses (0.2–1 µg · kg⁻¹ i.v.) of F15599 with an apparent maximal inhibition at 8.2 µg · kg⁻¹ i.v.; this inhibition was also reversed by (±)WAY100635.

rate to 210 ± 33% of baseline (*P* < 0.005, Student's paired *t*-test; *n* = 15). We attempted to reverse the action of 0.2 µg · kg⁻¹ F15599 in a subset of five neurones. One-way ANOVA indicated a significant effect of the treatment (*F*_{2,8} = 11.45; *P* < 0.005) with significant post-hoc differences (Newman–Keuls) between F15599 and baseline and between F15599 and F15599+(±)WAY100635 (Figure 3C).

In a second set of experiments we examined the response of pyramidal neurones to increasing doses of F15599 (0.2–18.2 µg · kg⁻¹ i.v., cumulative doses). From the pyramidal neurones examined (*n* = 16), 11 were excited and five were inhibited by F15599, with an overall excitatory effect of F15599. Figure 4 shows representative examples of neurones excited and inhibited by increasing doses of F15599. The minimal effective dose for the activation of mPFC pyramidal neurones was 0.2 µg · kg⁻¹ i.v.

Data from the neurones used in both experiments were pooled and analysed together. For neurones excited by F15599, ANOVA indicated a significant effect of the treatment (*F*_{5,63} = 9.79, *P* < 0.00001) with significant post-hoc (Newman–Keuls) differences between the doses (i.v.) of 0.2 µg · kg⁻¹, 2 µg · kg⁻¹, 8.2 µg · kg⁻¹ and 18.2 µg · kg⁻¹ vs. baseline (Figure 5A).

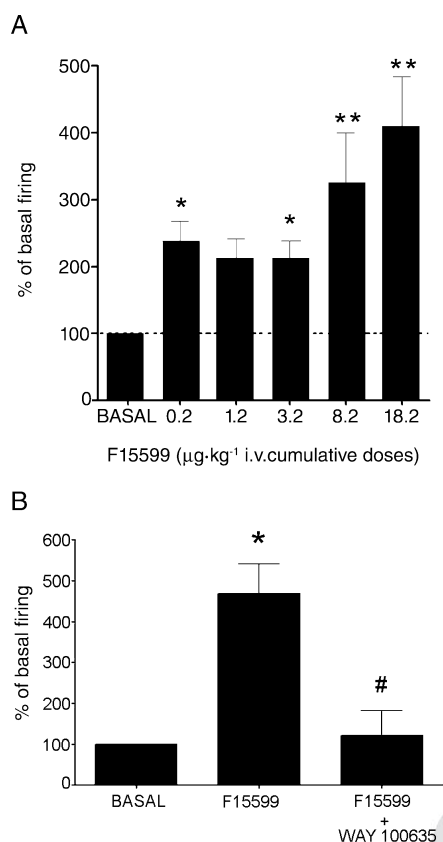


Figure 5 (A) Histogram showing the excitatory effect produced by F15599 on the firing rate of mPFC pyramidal neurones. Data correspond to neurones in the two experiments conducted (see text) which are 22, 20, 10, 7, 6 and 5 neurones for baseline, 0.2, 1.2, 3.2, 8.2 and 18.2 µg·kg⁻¹ i.v. F15599 (cumulative doses) respectively. (B) Histogram showing the reversal by the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-100635 of the maximal excitatory effect of F15599 on mPFC pyramidal neurones (*n* = 4). **P* < 0.05 vs. baseline; ***P* < 0.001 vs. baseline; #*P* < 0.02 vs. maximal effect of F15599; Newman-Keuls test post-ANOVA.

As observed for the 0.2 µg·kg⁻¹ dose, F15599-induced excitations at higher doses (average 15.7 µg·kg⁻¹ i.v.) were also reversed by the subsequent administration of (±)WAY100635 (50–100 µg·kg⁻¹ i.v.) in all cases examined (*F*_{2,6} = 12.14, *P* < 0.01, *n* = 4) (Figure 5B).

The maximal inhibitory effect of F15599 was noted at a dose of 18.2 µg·kg⁻¹ (50 ± 26% of baseline). ANOVA revealed a non-significant effect of the treatment (*F*_{5,19} = 1.55; *P* = 0.23), possibly due to the lower number of neurones inhibited compared with those excited by F15599.

F15599 had a minor impact on the burst firing of activated mPFC pyramidal neurones. From all the variables examined, only the number of spikes per burst was significantly affected, but only with a small effect size (*c.* 10%).

Effect of F15599 on slow cortical oscillations

The non-competitive NMDA receptor antagonist PCP and the preferential 5-HT_{2A} receptor agonist DOI increase PFC pyra-

midal cell discharge and reduce low frequency (delta) cortical oscillations (0.3–4 Hz) (Kargieman *et al.*, 2007; Celada *et al.*, 2008). Given the increase in pyramidal discharge induced by F15599, we examined whether this effect was accompanied by an alteration of low frequency oscillations.

Spikes were discharged in synchrony with active phases of LFP under baseline conditions and after F15599 administration. This occurred when spikes were fired as single events or as spike trains (not shown). However, the administration of F15599 did not alter the power of low frequency cortical oscillations (0.3–4 Hz) in the whole dose range examined (*n.s.*, one-way ANOVA).

Extracellular concentrations of 5-HT in the ventral hippocampus

The mean basal extracellular level of 5-HT in ventral hippocampus was 41.6 ± 2.7 fmol·20 µL⁻¹ (*n* = 36). None of the treatment groups differed from controls (34.5 ± 5.9 fmol·20 µL⁻¹) although the F15599 160 µg·kg⁻¹ group (57.6 ± 9.2 fmol·20 µL⁻¹) was significantly greater than the WAY+F15599 630 µg·kg⁻¹ group (27.7 ± 6.6 fmol·20 µL⁻¹; *P* < 0.05) (post-hoc analysis).

Administration of F15599 (40–2500 µg·kg⁻¹) dose-dependently decreased extracellular 5-HT during the 140 min period after injection (Figure 6, top left panel). Two-way ANOVA for repeated measures indicated a significant effect of treatment (*F*_{6,29} = 23.3, *P* < 0.0001), time (*F*_{6,165} = 6.24, *P* < 0.0001) and treatment-time interaction (*F*_{36,165} = 2.02, *P* = 0.02). Post-hoc analysis by the contrasts method indicated a significant global effect at 160 (*P* = 0.0016), 630 and 2500 µg·kg⁻¹ (*P* < 0.0001). (±)WAY100635 (160 µg·kg⁻¹), when given alone, did not significantly alter extracellular 5-HT (Figure 6 left middle panel). The effects of 630 µg·kg⁻¹ F15599 were significantly reversed by (±)WAY100635 (*P* < 0.0001).

The effect of F15599, analysed by the mean AUC data for the 140 min period after administration, was significant at the doses of 160, 630, 2500 µg·kg⁻¹, compared with controls (*P* < 0.05, *F*_{4,25} = 24.48, one-way ANOVA followed by Dunnett's test; Figure 6, bottom panel). The ED₅₀ value of F15599, calculated by linear interpolation, was 240 µg·kg⁻¹. (±)WAY100635 significantly reversed the effects of F15599 630 µg·kg⁻¹ (Student's *t*-test).

Extracellular concentration of DA in the mPFC

Systemic administration of F15599. The mean basal extracellular level of DA in mPFC was 6.00 ± 0.36 fmol·20 µL⁻¹ (*n* = 45). One-way ANOVA indicated no significant difference between groups *F*_{8,44} = 1.15, *P* = 0.36.

Systemic administration of F15599 (10–2500 µg·kg⁻¹, i.p.) dose-dependently increased extracellular DA during the 140 min period after injection with a maximal increase of approximately 200% of basal level at the dose of 40 µg·kg⁻¹ (Figure 6 top right panel). Two-way ANOVA for repeated measures indicated a significant effect of treatment (*F*_{8,36} = 13.2, *P* < 0.0001), time (*F*_{6,216} = 2.97, *P* = 0.0084) and treatment × time interaction (*F*_{48,216} = 1.70, *P* = 0.006). The method of contrasts indicated a significant global effect at doses 40–2500 µg·kg⁻¹ (*P* < 0.0001). (±)WAY100635, when given alone, did not significantly alter extracellular DA (Figure 6 right middle panel).

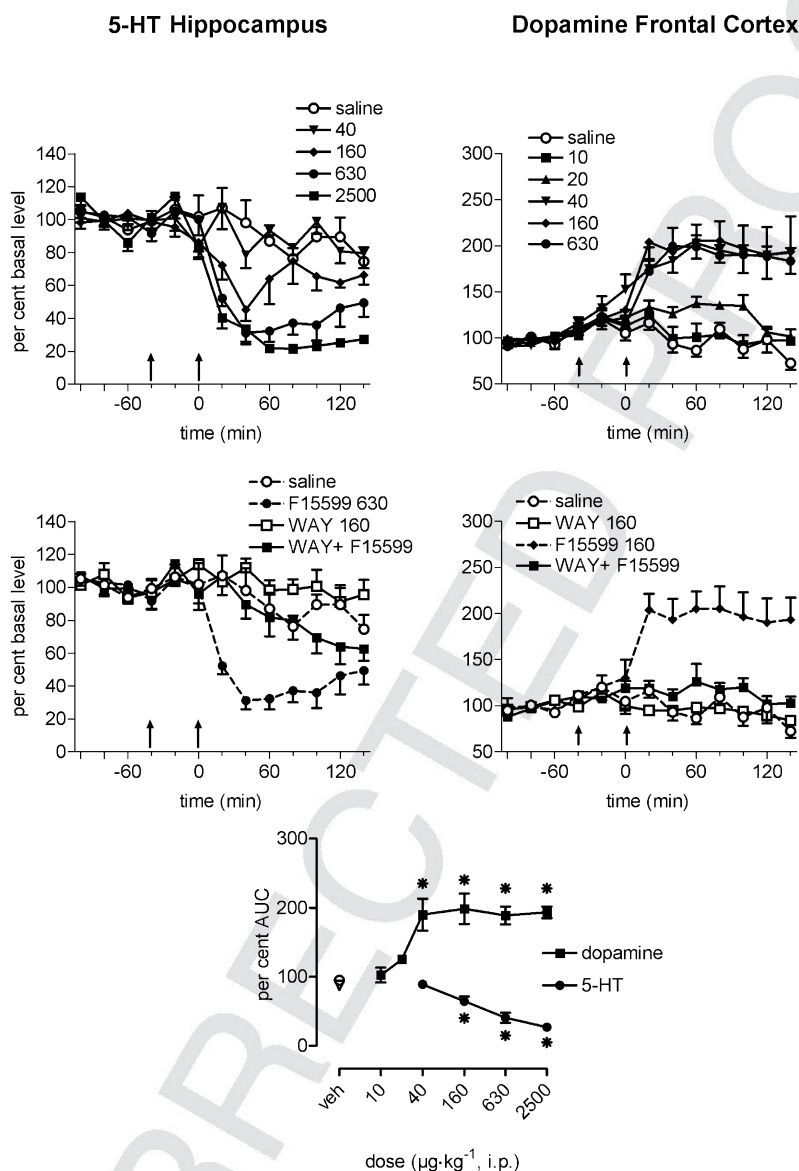


Figure 6 Effects of i.p. administration of F15599 on extracellular 5-HT in the ventral hippocampus (left panels) and on dopamine levels in the medial prefrontal cortex (right panels) of freely moving rats. Data are expressed as a percentage of the mean absolute amount of neurotransmitter in the four samples collected before treatment. The first arrow indicates injection of saline or (\pm)WAY100635 (160 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.c., middle panels), the second arrow indicates administration of saline or F15599. The bottom panel represents mean AUC for 140 min after administration of the compound. Results are mean \pm SEM of five to seven animals per group. Note: to avoid overloading the top-right panel, the dose of 2500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ is not shown. AUC dose-response data were analysed using one-way ANOVA followed by Dunnett's test ($*P < 0.05$ compared with corresponding control animals).

The effects of F15599 (160 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) were significantly reversed by (\pm)WAY100635 (160 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) ($P < 0.0001$).

The overall increase in DA, analysed by the AUC data for the 140 min period after drug injection, was significant from 40–2500 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ F15599 ($P < 0.05$, $F_{7,37} = 10.35$, one-way ANOVA followed by Dunnett's test; Figure 6 bottom panel). The ED₅₀ value of F15599, calculated by linear interpolation was 30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. (\pm)WAY100635 significantly reversed the effects of F15599 160 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Student's *t*-test).

Local perfusion of F15599 through the dialysis probe. The mean basal extracellular level of DA was 7.19 ± 0.35 fmol·20 μL^{-1} ($n = 57$). One-way ANOVA indicated no significant differences between groups for the concentration-response data ($F_{5,22} = 1.29$, $P = 0.32$) nor for the antagonism experiments ($F_{5,33} = 0.89$, $P = 0.50$).

Local perfusion of F15599 through the dialysis probe in the mPFC (1–1000 μM) increased extracellular DA in a concentration-dependent manner during the 140 min period

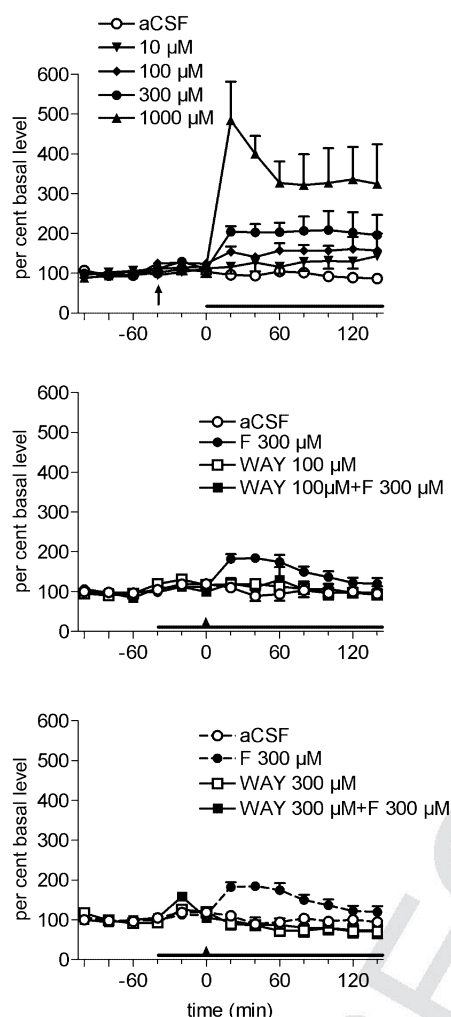


Figure 7 Effects of local perfusion of F15599 in the medial prefrontal cortex on extracellular dopamine levels and antagonism by (\pm)WAY100635. Data are expressed as a percentage of the mean absolute amount of dopamine in the four samples collected before treatment. Top panel: the effects of different concentrations of F15599 administered through the dialysis probe from time 0 (bar), the arrow indicates saline administration (s.c.). Middle and bottom panels: the antagonist effects of (\pm)WAY100635 100 and 300 μ M, administered through the dialysis probe, on the increase in extracellular dopamine induced by 300 μ M F15599. The bar indicates the presence of compounds in the perfusion medium, the arrow indicates the addition of F15599 to the perfusion medium. Results are mean \pm SEM of three to eight animals per group.

examined. The maximal increase was approximately 470% of basal level at 1000 μ M (Figure 7, top panel). The two-way ANOVA for repeated measures indicated a significant effect of treatment ($F_{5,17} = 6.02$, $P = 0.0022$) but no significant effect of time ($F_{6,102} = 0.87$, $P = 0.52$) nor treatment-time interaction ($F_{30,102} = 1.10$, $P = 0.36$). Post-hoc analysis by the contrasts method indicated a significant global effect at the concentrations 300 μ M ($P = 0.048$) and 1000 μ M ($P = 0.0001$).

(\pm)WAY100635 (100 and 300 μ M), perfused through the dialysis probe 40 min before and together with F15599 300 μ M prevented the increase in extracellular DA induced by F15599 (Figure 7, middle and bottom panels). The two-way ANOVA for repeated measures indicated a significant effect of treatment ($F_{5,28} = 5.64$, $P = 0.001$) and time ($F_{6,168} = 3.48$, $P = 0.0029$) but not a significant interaction ($F_{30,168} = 1.34$, $P = 0.12$). Post-hoc analysis by the contrasts method indicated a significant global effect at 300 μ M F15599 ($P = 0.0036$) and a significant antagonist effect of (\pm)WAY100635 100 μ M ($P = 0.018$) and 300 μ M ($P = 0.0003$).

Discussion

The results from the present study indicate that the selective 5-HT_{1A} receptor agonist F15599 has a preferential action on cortical pyramidal compared with 5-hydroxytryptaminergic neurones in the rat brain. This regional selectivity is also supported by microdialysis experiments showing a greater sensitivity of cortical DA vs. hippocampal 5-HT output to the effects of F15599. Based on current knowledge on 5-HT_{1A} receptor function, this regional selectivity may be attributed to the preferential activation by F15599 of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. Overall, F15599 appears to be almost one order of magnitude more active at postsynaptic than at somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors.

To the best of our knowledge, F15599 is the first selective 5-HT_{1A} agonist shown to have a preferential postsynaptic action. F15599 increased pyramidal discharge in mPFC to ~200% of baseline at the lowest dose assayed, 0.2 μ g·kg⁻¹ i.v., whereas most 5-hydroxytryptaminergic neurones were only inhibited by the administration of 8.2–18.2 μ g·kg⁻¹ i.v. (cumulative doses). Both F15599-induced responses were due to the exclusive activation of 5-HT_{1A} receptors, as suggested by the *in vitro* selectivity of the compound and by the reversal of its actions by (\pm)WAY100635.

Because mPFC 5-HT_{1A} receptors control of DA neurones in the VTA and are involved in the mechanism of action of atypical antipsychotic drugs (Rollema *et al.*, 1997; Millan, 2000; Bantick *et al.*, 2001; Diaz-Mataix *et al.*, 2005), we examined the actions of F15599 on the activity of pyramidal neurones in the mPFC projecting to VTA.

Given the inhibitory nature of 5-HT_{1A} receptors on neuronal activity (Andrade and Nicoll, 1987; Innis and Aghajanian, 1987; Araneda and Andrade, 1991; Puig *et al.*, 2005), the increase in mPFC pyramidal discharge elicited by the systemic administration of 5-HT_{1A} receptor agonists (Borsini *et al.*, 1995; Hajós *et al.*, 1999; Díaz-Mataix *et al.*, 2006; this work) may seem paradoxical, as (i) microiontophoretic application of these compounds at large concentrations in mPFC inhibits the discharge of putative pyramidal neurones (Ashby *et al.*, 1994; Rueter and Blier, 1999); (ii) high doses of 8-OH-DPAT inhibit mPFC pyramidal neurones (Hajós *et al.*, 1999); (iii) physiological release of 5-HT inhibits the activity of mPFC pyramidal neurones through 5-HT_{1A} receptors (Hajós *et al.*, 2003; Amargós-Bosch *et al.*, 2004; Puig *et al.*, 2005); and (iv) there is *in vitro* evidence of inhibition of mPFC pyramidal cells by 5-HT_{1A} agonists (Tanaka and North, 1993). Conceivably, this excitatory effect may result from an action on cortical

1 networks involving the activation of 5-HT_{1A} receptors in local
2 GABAergic interneurons (Santana *et al.*, 2004) and the sub-
3 sequent disinhibition of pyramidal neurones. Although this
4 possibility requires further testing, it is supported by the exist-
5 ence of molecular and functional differences between neu-
6 rotransmitter receptors expressed by GABAergic and
7 glutamatergic cells (Jonas *et al.*, 1994). Likewise, differences in
8 the composition and response of NMDA receptor subtypes
9 have been shown (Hollmann and Heinemann, 1994; Plant
10 *et al.*, 1997) and a differential response of pyramidal and
11 GABAergic neurones in mPFC to MK-801 have been reported
12 (Homayoun and Moghaddam, 2007). Although there are no
13 molecular differences in the structure of 5-HT_{1A} autoreceptors
14 and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors, functional differences may
15 exist in the coupling to different transduction mechanisms, to
16 the cellular receptor reserve or in cellular sensitivity to the
17 opening of K⁺ channels, among others. Hence, the response of
18 pyramidal neurones to 8-OH-DPAT in rat mPFC is changed by
19 local blockade of GABA_A receptors (Lladó-Pelfort *et al.*, 2009).
20 Further work is required to determine whether this also occurs
21 for F15599.

22 Electrophysiological studies comparing the sensitivity of
23 auto- (raphe) and postsynaptic (hippocampus) 5-HT_{1A} recep-
24 tors have previously indicated a greater sensitivity of the
25 former receptors to the inhibitory actions of 5-HT and exo-
26 genous agonists (Sprouse and Aghajanian, 1987, 1988; Dong
27 *et al.*, 1997; Blier and Ward, 2003). Using similar experimental
28 approaches, the selective 5-HT_{1A} agonists 8-OH-DPAT and BAY
29 × 3702 (repinotan), were found to have ED₅₀ values around
30 1 µg·kg⁻¹ i.v. for suppression of 5-HT cell firing (Blier and de
31 Montigny, 1987; Dong *et al.*, 1998; Hajós *et al.*, 1999; Casano-
32 vas *et al.*, 2000; Romero *et al.*, 2003). However, similar or
33 higher doses are required to increase the discharge of cortical
34 neurones (Borsini *et al.*, 1995; Hajós *et al.*, 1999; Díaz-Mataix
35 *et al.*, 2006).

36 This preferential selectivity for 5-HT_{1A} autoreceptors was
37 attributed to a receptor reserve in the raphe (Meller *et al.*, 1990;
38 Cox *et al.*, 1993). This concept was partly supported by *in vitro*
39 observations indicating that the agonist/antagonist profile of
40 5-HT_{1A} receptor agents varied depending on the cellular
41 density of 5-HT_{1A} receptors (Hoyer and Boddeke, 1993).

42 Delta (0.3–4 Hz) oscillations recorded extracellularly in
43 anaesthetized animals are similar to the physiological
44 changes in cortical activity during slow-wave sleep (Steriade
45 *et al.*, 1993). These oscillations play an important role in the
46 disconnection of the brain from external afferent sources,
47 information processing and memory consolidation during
48 sleep (Marshall *et al.*, 2006). Particular attention has been paid
49 in recent years to slow oscillations (≤1 Hz), which appear to
50 reflect “up” and “down” states of cortical networks (Sanchez-
51 *et al.*, 2000). This slow oscillation is a major
52 component of delta waves. Unlike the NMDA receptor
53 antagonist, PCP and the 5-HT_{2A} receptor agonist, DOI, which
54 markedly suppress slow oscillatory activity in the mPFC (Kar-
55 gieman *et al.*, 2007; Celada *et al.*, 2008), F15599, did not alter
56 slow cortical oscillations despite inducing similar changes in
57 pyramidal discharge. Thus, F15599 does not disrupt the strict
58 temporal pattern of slow oscillatory activity seen in basal
59 conditions. Although we did not determine whether F15599
60 could normalize the loss of slow oscillatory activity induced

61 by PCP, F15599 has been shown to antagonize the deficits in
62 working memory induced by this drug (Auclair *et al.* 2007 and
63 unpublished observations), a property that may be related to
64 the divergent influence of F15599 and PCP on PFC networks.
65 This property suggests that F15599 might be also useful as
66 add-on therapy in the treatment of cognitive deficits in
67 schizophrenia.

68 Microdialysis data also support a preferential postsynaptic
69 action of F15599. The 5-HT and DA output in hippocampus
70 and mPFC are used as neurochemical indicators of the acti-
71 vation of somatodendritic autoreceptors and postsynaptic
72 5-HT_{1A} receptors respectively. Some studies support the view
73 that 5-HT release in ventral hippocampus depends on the
74 activation of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors (Hutson
75 *et al.*, 1989; Adell *et al.*, 1993; McQuade and Sharp, 1997).
76 However, as the activity of DR 5-HT neurones is also depen-
77 dent on mPFC 5-HT_{1A} receptor activation (Ceci *et al.*, 1994;
78 Hajós *et al.*, 1999; Celada *et al.*, 2001), it is uncertain whether
79 hippocampal 5-HT release may be influenced to some extent
80 by postsynaptic 5-HT_{1A} receptor activation, as happens with
81 that in mPFC (Casanovas *et al.*, 1999; Celada *et al.*, 2001).

82 On the other hand, DA output in mPFC is dependent on
83 the activation of cortical postsynaptic 5-HT_{1A} receptors, pos-
84 sibly located on or close to pyramidal neurones projecting to
85 the ventral tegmental area (Díaz-Mataix *et al.*, 2005; Bor-
86 tolozzi *et al.*, 2007). This assertion is further supported by the
87 increase in DA output produced by the local application of
88 F15599 in mPFC.

89 F15599 was more potent at promoting DA release in mPFC
90 (postsynaptic 5-HT_{1A} receptor-mediated effect) than at sup-
91 pressing hippocampal 5-HT release (5-HT_{1A} autoreceptor
92 effect), with calculated ED₅₀ values of 30 and 240 µg·kg⁻¹ i.p.
93 respectively. Interestingly, despite the different strain of rats
94 and the routes of administration, the ratio between the sup-
95 pression of 5-HT release and cell firing (autoreceptor effect)
96 was similar to that between activation of pyramidal cell firing
97 and DA release (postsynaptic 5-HT_{1A} receptor effect).

98 The cellular bases responsible for this regional *in vivo* selec-
99 tivity of F15599 are not fully understood. In cell lines stably
100 expressing 5-HT_{1A} receptors, this agent preferentially stimu-
101 lated the phosphorylation of extracellular signal-regulated
102 kinase (ERK1/2) compared with other signalling pathways
103 linked to 5-HT_{1A} receptors, such as G-protein activation,
104 receptor internalization or inhibition of cAMP accumulation.
105 5-HT and (+)8-OH-DPAT displayed a different rank order of
106 potency for these responses (Newman-Tancredi *et al.*, 2009).
107 In addition, F15599 stimulated [³⁵S]-GTPγS binding, ERK1/2
108 phosphorylation and *c-fos* expression more potently in
109 frontal cortex than in the midbrain raphe, compared with
110 other agonists (Buritova *et al.*, 2009; Newman-Tancredi *et al.*,
111 2009). Thus, a distinctive ‘signalling signature’ for specific
112 intracellular transduction responses may underlie the brain
113 region specificity of F15599. Furthermore, in microPET
114 experiments, [¹⁸F]-F15599 preferentially labelled frontal
115 cortex 5-HT_{1A} receptors in rat and cat (Lemoine *et al.*, 2008,
116 2009), which may add to the preferential postsynaptic action
117 of F15599.

118 Thus, F15599 shows a preferential postsynaptic activity in
119 cortical vs. raphe 5-HT_{1A} receptors, a property that may under-
120 lie the effects of very low doses of this drug in animal models

of depression and cognitive function, suggesting that F15599 may overcome the existing limitations of 5-HT_{1A} receptor agonists in the treatment of psychiatric disorders.

Acknowledgements

Work supported by grants SAF 2007-62378, FIS PI060264 and Pierre Fabre Médicament. L.L.-P. is supported by a JAE fellowship from CSIC. P.C. is supported by the Researcher Stabilization Program of the Health Department of the Generalitat de Catalunya. We acknowledge Véronique Ravailhe and Christelle Benas for technical assistance with microdialysis experiments and Mónica Gutiérrez and Verónica Paz for electrophysiological experiments.

Conflicts of interest

None.

References

Adell A, Carceller A, Artigas F (1993). In vivo brain dialysis study of the somatodendritic release of serotonin in the raphe nuclei of the rat. Effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. *J Neurochem* **60**: 1673–1681.

Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2008). Guide to receptors and channels (GRAC), 3rd edition (2008 revision). *Br J Pharmacol* **153**: S1–S209.

Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P *et al.* (2004). Co-expression and in vivo interaction of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* **14**: 281–299.

Andrade R, Nicoll RA (1987). Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurons of the rat hippocampus recorded in vitro. *J Physiol* **394**: 99–124.

Araneda R, Andrade R (1991). 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* **40**: 399–412.

Artigas F, Celada P, Laruelle M, Adell A (2001). How does pindolol improve antidepressant action? *Trends Pharmacol Sci* **22**: 224–228.

Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P (1996). Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci* **19**: 378–383.

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

Assié MB, Ravailhe V, Faucillon V, Newman-Tancredi A (2005). Contrasting contribution of 5-HT_{1A} receptor activation to neurochemical profile of novel antipsychotics: frontocortical dopamine and hippocampal serotonin release in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **315**: 265–272.

Auclair A, Bardin L, Depoortère R, Newman-Tancredi A (2007). F15599, A 5-HT_{1A} Agonist That Preferentially Targets Post-Synaptic Receptors in the Frontal Cortex. III) Activity in Rodent Models of Cognition. 2007 Neuroscience Meeting Planner. Society for Neuroscience: San Diego, CA. Online. 170.24.

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

Bardin L, Depoortère R, Newman-Tancredi A (2007). F15599, A 5-HT_{1A} Agonist That Preferentially Targets Post-Synaptic Receptors in the Frontal Cortex. II) Activity in Rodent Models of Depression/Anxiety. 2007 Neuroscience Meeting Planner. Society for Neuroscience: San Diego, CA. Online. 170.2.

Blier P, de Montigny C (1987). Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT_{1A} agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain. *Synapse* **1**: 470–480.

Blier P, Ward NM (2003). Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? *Biol Psychiatry* **53**: 193–203.

Borsini F, Ceci A, Bietti G, Donetti A (1995). BIM17, a 5-HT_{1A} receptor agonist/5-HT_{2A} receptor antagonist directly activates postsynaptic 5-HT inhibitory responses in the rat cerebral cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **352**: 283–290.

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

Buritova J, Berrichon G, Cathala C, Colpaert F, Cussac D (2009). Region-specific changes in 5-HT_{1A} agonist-induced Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2 phosphorylation in rat brain: a quantitative ELISA study. *Neuropharmacology* **56**: 350–361.

Casanovas JM, Lésourd M, Artigas F (1997). The effect of the selective 5-HT_{1A} agonists alnespirone (S-20499) and 8-OH-DPAT on extracellular 5-hydroxytryptamine in different regions of rat brain. *Br J Pharmacol* **122**: 733–741.

Casanovas JM, Hervás I, Artigas F (1999). Postsynaptic 5-HT_{1A} receptors control 5-HT release in the rat medial prefrontal cortex. *NeuroReport* **10**: 1441–1445.

Casanovas JM, Berton O, Celada P, Artigas F (2000). In vivo actions of the selective 5-HT_{1A} receptor agonist BAY x 3702 on serotonergic cell firing and release. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**: 248–254.

Ceci A, Baschiroto A, Borsini F (1994). The inhibitory effect of 8-OH-DPAT on the firing activity of dorsal raphe serotonergic neurons in rats is attenuated by lesion of the frontal cortex. *Neuropharmacology* **33**: 709–712.

Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F (2001). Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: involvement of 5-HT_{1A}, GABA_A, and glutamate receptors. *J Neurosci* **21**: 9917–9929.

Celada P, Puig MV, Díaz-Mataix L, Artigas F (2008). The hallucinogen DOI reduces low-frequency oscillations in rat prefrontal cortex: reversal by antipsychotic drugs. *Biol Psychiatry* **64**: 392–400.

Cox RF, Meller E, Waszczak BL (1993). Electrophysiological evidence for a large receptor reserve for inhibition of dorsal raphe neuronal firing by 5-HT_{1A} agonists. *Synapse* **14**: 297–304.

Cruz DA, Eggan SM, Azmitia EC, Lewis DA (2004). Serotonin_{1A} receptors at the axon initial segment of prefrontal pyramidal neurons in schizophrenia. *Am J Psychiatry* **161**: 739–742.

Díaz-Mataix L, Artigas F, Celada P (2006). Activation of pyramidal cells in rat medial prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area by a 5-HT_{1A} receptor agonist. *Eur Neuropsychopharmacol* **16**: 288–296.

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.

Dong J, de Montigny C, Blier P (1997). Effect of acute and repeated versus sustained administration of the 5-HT_{1A} receptor agonist ipsapirone: electrophysiological studies in the rat hippocampus and dorsal raphe. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **356**: 303–311.

Dong J, de Montigny C, Blier P (1998). Full agonistic properties of BAY x 3702 on presynaptic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors electrophysiological studies in the rat hippocampus and dorsal raphe. *J Pharmacol Exp Ther* **286**: 1239–1247.

Haddjeri N, Blier P, de Montigny C (1998). Long-term antidepressant

- 1 treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT_{1A} receptors. 68
2 *J Neurosci* 18: 10150–10156. 69
- 3 Hajós M, Hajos-Korsok E, Sharp T (1999). Role of the medial prefrontal 70
4 cortex in 5-HT_{1A} receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal 71
5 activity in the rat. *Br J Pharmacol* 126: 1741–1750. 72
- 6 Hajós M, Gartside SE, Varga V, Sharp T (2003). In vivo inhibition of 73
7 neuronal activity in the rat ventromedial prefrontal cortex by 74
8 midbrain-raphé nuclei: role of 5-HT_{1A} receptors. *Neuropharmacology* 75
9 45: 72–81. 76
- 10 Hollmann M, Heinemann S (1994). Cloned glutamate receptors. *Annu* 77
11 *Rev Neurosci* 17: 31–108. 78
- 12 Homayoun H, Moghaddam B (2007). NMDA receptor hypofunction 79
13 produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and 80
14 pyramidal neurons. *J Neurosci* 27: 11496–11500. 81
- 15 Hoyer D, Boddeke HW (1993). Partial agonists, full agonists, 82
16 antagonists: dilemmas of definition. *Trends Pharmacol Sci* 14: 270– 83
17 275. 84
- 18 Hutson PH, Sarna GS, O'Connell MT, Curzon G (1989). Hippocampal 85
19 5-HT synthesis and release in vivo is decreased by infusion of 86
20 8-OH-DPAT into the nucleus raphe dorsalis. *Neurosci Lett* 100: 276– 87
21 280. 88
- 22 Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, Fowler WL, O'Laughlin IA, Meltzer 89
23 HY (2001). 5-HT_{2A} and D-2 receptor blockade increases cortical DA 90
24 release via 5-HT_{1A} receptor activation: a possible mechanism of 91
25 atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. *J Neuro-* 92
26 *chem* 76: 1521–1531. 93
- 27 Innis RB, Aghajanian GK (1987). Pertussis toxin blocks 5-HT_{1A} and 94
28 GABA_A receptor-mediated inhibition of serotonergic neurons. *Eur J* 95
29 *Pharmacol* 143: 195–204. 96
- 30 Jonas P, Racca C, Sakmann B, Seeburg PH, Monyer H (1994). Differ- 97
31 ences in Ca²⁺ permeability of AMPA-type glutamate receptor chan- 98
32 nels in neocortical neurons caused by differential GluR-B subunit 99
33 expression. *Neuron* 12: 1281–1289. 100
- 34 Kargieman L, Santana N, Mengod G, Celada P, Artigas F (2007). Anti- 101
35 psychotic drugs reverse the disruption in prefrontal cortex function 102
36 produced by NMDA receptor blockade with phencyclidine. *Proc* 103
37 *Natl Acad Sci USA* 104: 14843–14848. 104
- 38 Kia HK, Miquel MC, Brisorgueil MJ, Daval G, Riad M, El Mestikawy S 105
39 *et al.* (1996). Immunocytochemical localization of serotonin(1A) 106
40 receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 365: 107
41 289–305. 108
- 42 Laviolette SR, Lipski WJ, Grace AA (2005). A subpopulation of neurons 109
43 in the medial prefrontal cortex encodes emotional learning with 110
44 burst and frequency codes through a dopamine D4 receptor- 111
45 dependent basolateral amygdala input. *J Neurosci* 25: 6066– 112
46 6075. 113
- 47 Lemoine L, Verdurand M, Vacher B, Blanc E, Le Bars D, Newman- 114
48 Tancredi A *et al.* (2008). Synthesis, fluorine-18 labelling and radiop- 115
49 harmacological evaluation of F15599, a novel 5-HT_{1A} receptor 116
50 agonist. *Society for Nuclear Medicine* ••: 14–18. 117
- 51 Lemoine L, Verdurand M, Vacher B, Blanc E, Le Bars D, Newman- 118
52 Tancredi A *et al.* (2009). [¹⁸F]F15599, a novel 5-HT_{1A} receptor 119
53 agonist, as a radioligand for PET neuroimaging. *Eur J Nucl Med Mol* 120
54 *Imaging* ••: ••–••. [Epub ahead of print]. 121
- 55 Lladó-Pelfort L, Santana N, Artigas F, Celada P (2009). *Postsynaptic* 122
56 *5-HT_{1A} Receptors Are Involved in the Excitatory Action of 8-OH-DPAT on* 123
57 *Prefrontal Cortex Pyramidal Neurons*. 748.2. 2009 Neuroscience Meeting 124
58 *Planner*. Society for Neuroscience: Chicago, IL. Online. 125
- 59 McQuade R, Sharp T (1997). Functional mapping of dorsal and 126
60 median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the 127
61 rat using microdialysis. *J Neurochem* 69: 791–796. 128
- 62 Marshall L, Helgadottir H, Molle M, Born J (2006). Boosting 129
63 slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature* 444: 610– 130
64 613. 131
- 65 Martinez D, Hwang D, Mawlawi O, Slifstein M, Kent J, Simpson N 132
66 *et al.* (2001). Differential occupancy of somatodendritic and 133
67 postsynaptic 5-HT_{1A} receptors by pindolol: a dose-occupancy study 134
with [¹¹C]WAY 100635 and positron emission tomography in 68
humans. *Neuropsychopharmacology* 24: 209–229. 69
Meller E, Goldstein M, Bohmaker K (1990). Receptor reserve for 70
5-hydroxytryptamine-mediated inhibition of serotonin synthesis: 71
possible relationship to anxiolytic properties of 5-hydroxy 72
tryptamine agonists. *Mol Pharmacol* 37: 231–237. 73
Meltzer HY, Sumiyoshi T (2008). Does stimulation of 5-HT_{1A} receptors 74
improve cognition in schizophrenia? *Behav Brain Res* 195: 98–102. 75
Millan MJ (2000). Improving the treatment of schizophrenia: focus on 76
serotonin 5-HT_{1A} receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 853–861. 77
Newman-Tancredi A, Martel JC, Assié MB, Buritova J, Laressergues E, 78
Cosi C *et al.* (2009). Signal transduction and functional selectivity 79
of F15599, a preferential post-synaptic 5-HT receptor agonist. *Br J* 80
Pharmacol 156: 338–353. 81
Paxinos G, Watson C (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 82
Academic Press: Sydney. 83
Pazos A, Palacios JM (1985). Quantitative autoradiographic mapping 84
of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. 85
Brain Res 346: 205–230. 86
Plant T, Schirra C, Garaschuk O, Rossier J, Konnerth A (1997). Molecu- 87
lar determinants of NMDA receptor function in GABAergic neu- 88
rones of rat forebrain. *J Physiol* 399: 47–63. 89
Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G (1992). Distribution and cel- 90
lular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat 91
brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 12: 440–453. 92
Puig MV, Artigas F, Celada P (2005). Modulation of the activity of 93
pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in 94
vivo: involvement of serotonin and GABA. *Cereb Cortex* 15: 1–14. 95
Puig MV, Celada P, Diaz-Mataix L, Artigas F (2003). In vivo modula- 96
tion of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal 97
cortex by 5-HT_{2A} receptors: relationship to thalamocortical 98
afferents. *Cereb Cortex* 13: 870–882. 99
Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X *et al.* 100
(2000). Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal 101
axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. 102
J Comp Neurol 417: 181–194. 103
Rollema H, Lu Y, Schmidt AW, Sprouse JS, Zorn SH (2000). 5-HT_{1A} 104
receptor activation contributes to ziprasidone-induced dopamine 105
release in the rat prefrontal cortex. *Biol Psychiatry* 48: 229–237. 106
Rollema H, Lu Y, Schmidt AW, Zorn SH (1997). Clozapine increases 107
dopamine release in prefrontal cortex by 5-HT_{1A} receptor activation. 108
Eur J Pharmacol 338: R3–R5. 109
Romero L, Celada P, Martín-Ruiz R, Díaz-Mataix L, Mourelle M, Del- 110
gadillo J *et al.* (2003). Modulation of serotonergic function in rat 111
brain by VN2222, a serotonin reuptake inhibitor and 5-HT_{1A} recep- 112
tor agonist. *Neuropsychopharmacology* 28: 445–456. 113
Rueter LE, Blier P (1999). Electrophysiological examination of the 114
effects of sustained flibanserin administration on serotonin recep- 115
tors in rat brain. *Br J Pharmacol* 126: 627–638. 116
Sanchez-Vives MV, McCormick DA (2000). Cellular and network 117
mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neu-* 118
rosci 3: 1027–1034. 119
Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F (2004). Expres- 120
sion of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in pyramidal and GABAergic 121
neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14: 1100–1109. 122
Sprouse JS, Aghajanian GK (1987). Electrophysiological responses of 123
serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. 124
Synapse 1: 3–9. 125
Sprouse JS, Aghajanian GK (1988). Responses of hippocampal pyrami- 126
dal cells to putative serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists: a com- 127
parative study with dorsal raphe neurons. *Neuropharmacology* 27: 128
707–715. 129
Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ (1993). Thalamocortical 130
oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science* 262: 679– 131
685. 132
Sumiyoshi T, Matsui M, Nohara S, Yamashita I, Kurachi M, Sumiyoshi 133
C *et al.* (2001a). Enhancement of cognitive performance in schizo- 134

bph_738

Actions of F15599 at 5-HT_{1A} receptors
L Lladó-Pelfort *et al*

12

- 1 phrenia by addition of tandospirone to neuroleptic treatment. *Am* 6
2 *J Psychiatry* 158: 1722–1725. 7
3 Sumiyoshi T, Matsui M, Yamashita I, Nohara S, Kurachi M, Uehara T 8
4 *et al.* (2001b). The effect of tandospirone, a serotonin1A agonist, on 9
5 memory function in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 49: 861–868. 10
- Tanaka E, North RA (1993). Actions of 5 hydroxytryptamine on
neurons of the rat cingulate cortex. *J Neurophysiol* 69: 1749–1757.
Wang RY, Aghajanian GK (1977). Antidromically identified seroton-
ergic neurons in the rat midbrain raphe: evidence for collateral
inhibition. *Brain Res* 132: 186–193.

TREBALL 3

Efectes *in vivo* del nou agonista 5-HT_{1A} F13640 sobre autoreceptors i heteroreceptors 5-HT_{1A} de rata

Resum

Antecedents i objectiu: L'F13640 és un nou agonista del receptor 5-HT_{1A} amb gran selectivitat per aquest receptor comparat amb altres receptors monoaminèrgics. En models animals ha mostrat activitat analgèsica. Donat el possible paper de la serotonina tant en el processament d'estímuls dolorosos ascendents com en la percepció del dolor en àrees corticolímbiques, en aquest treball hem examinat l'activitat *in vivo* de l'F13640 als autoreceptors 5-HT_{1A} somatodendrítics i als heteroreceptors 5-HT_{1A} d'EPF.

Aproximació experimental: Registres electrofisiològics unitaris en animal anestesiats i experiments de microdiàlisi intracerebral *in vivo*.

Resultats clau: L'F13640 produeix una inhibició de les neurones serotoninèrgiques del rafe i una excitació de les neurones piramidals d'EPFm a partir de 0.2 µg·kg⁻¹ i.v.. Ambdós efectes foren revertits per l'antagonista (±)WAY100635. En els experiments de microdiàlisi, l'F13640 va augmentar l'alliberament de dopamina a EPF -un efecte dependent de l'activació d'heteroreceptors postsinàptics 5-HT_{1A}- a partir de 40 µg·kg⁻¹ i.p., i va reduir l'alliberament de serotonina hipocampal -un efecte dependent principalment dels autoreceptors presinàptics- i prefrontal a partir de 160 i 40 µg·kg⁻¹ i.p., respectivament. Així mateix, l'aplicació local per diàlisi inversa d'F13640 a l'EPFm va augmentar l'alliberament de dopamina d'una manera concentració-dependent. Totes les respostes neuroquímiques van ser evitades amb l'administració de (±)WAY100635.

Conclusions i implicacions: Aquests resultats indiquen que l'administració sistèmica d'F13640 activa els autoreceptors i els receptors 5-HT_{1A} postsinàptics de l'EPF amb una potència similar. Ambdues activitats poden estar involucrades en les propietats analgèsiques del compost.

In vivo effects of the novel 5-HT_{1A} receptor agonist F13640 at pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the rat

L. Lladó-Pelfort^{1,3}, M.-B. Assié², A. Newman-Tancredi²,
F. Artigas^{1,3} and P. Celada^{1,3,4}

¹*Department of Neurochemistry and Neuropharmacology*

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

*Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), IDIBAPS,
Barcelona, Spain*

²*Neurobiology Division 2, Centre de Recherches Pierre Fabre, Castres,
France*

³*Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)*

⁴*Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS),
Barcelona, Spain*

Short Title: Actions of F13640 at pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors

Address for correspondence: Francesc Artigas, Ph.D., Dept. of Neurochemistry and Neuropharmacology, IIBB-CSIC (IDIBAPS). Rosselló 161, 6th floor, 08036 Barcelona, Spain.

Tel.: (+34) 93-363-8315 Fax: (+34) 93-363-8301

E-mail: fapnqi@iibb.csic.es

Abstract

Background and purpose: F13640 is a novel 5-HT_{1A} receptor agonist with a marked selectivity vs. other monoaminergic receptors. It shows analgesic activity in animal models. Given the potential role of serotonin in pain, both at the level of the processing of ascending pain signals and their perception by corticolimbic areas, we have examined the *in vivo* activity of F13640 at somatodendritic autoreceptors and postsynaptic 5-HT_{1A} heteroreceptors in medial prefrontal cortex (mPFC).

Experimental approach: *In vivo* single unit recordings and microdialysis in the rat.

Key results: F13640 reduced the activity of dorsal raphe serotonergic neurons in the dose range 0.2-10 µg/kg i.v. (ED₅₀=0.8 µg/kg i.v.) and increased the discharge rate of 80% of the pyramidal neurons in medial prefrontal cortex (mPFC) in a dose-dependent manner, from 0.2 to 10 µg·kg⁻¹ i.v.. Both effects were reversed by the subsequent administration of the 5-HT_{1A} receptor antagonist (±)WAY100635. In microdialysis studies, F13640 (0.04-0.63 mg/kg i.p.) dose-dependently decreased extracellular 5-HT in the hippocampus and mPFC. Likewise, F13640 (0.01-2.5 mg/kg i.p.) dose-dependently increased extracellular DA in mPFC, an effect dependent on the activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in mPFC. Local perfusion of F13640 in the mPFC (1-1000 µM) also increased extracellular DA in a concentration-dependent manner. Both the systemic and local effects of F13640 were prevented by the prior administration of (±)WAY100635.

Conclusions and implications: These results indicate that F13640 activates 5-HT_{1A} autoreceptors and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in prefrontal cortex after systemic administration with a similar potency. Both activities can be involved in the analgesic properties of the compound.

Key words: 5-HT_{1A} receptors; dopamine; pyramidal neurons; analgesia; prefrontal cortex; microdialysis.

Abbreviations: DA, dopamine; DR, dorsal raphe nucleus; F13640, [(3-Chloro-4-fluoro-phenyl)-[4-fluoro-4-[(5-methyl-pyridin-2-ylmethyl)-amino]-methyl]piperidin-1-yl]methanone, Fumaric Acid Salt; mPFC, medial prefrontal cortex.

Introduction

Monoaminergic neurotransmission is profoundly implicated in the control of pain. Thus, inhibition of descending serotonergic (and adrenergic) pathways exerts analgesic effects in multiple models of nociception in rodents and mixed serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors (SNRIs) are used clinically in the treatment of chronic pain disorders (Briley, 2004).

5-HT_{1A} receptors are widely expressed in mammalian brain. They are located on the soma and dendrites of serotonergic neurons, where they play an autoreceptor role, and are also located in pyramidal and GABAergic neurons of the neocortex and limbic system (Pazos and Palacios, 1985; Pompeiano *et al*, 1992; Kia *et al*, 1996; Riad *et al*, 2000; Martinez *et al*, 2001; Cruz *et al*, 2004; Santana *et al*, 2004), where they mediate inhibitory actions of 5-HT (Andrade and Nicoll, 1987; Blier and de Montigny, 1987; Innis and Aghajanian, 1987; Araneda and Andrade, 1991; Puig *et al*, 2005).

5-HT_{1A} receptor agonists have been the focus of interest as targets in the treatment of pain and efficacious agonists such as 8-OH-DPAT have shown activity in various models of pain (e.g. Bardin *et al*, 2001). Interestingly, 8-OH-DPAT, administered acutely, opposed the antinociceptive action of morphine (Millan and Colpaert, 1990) demonstrating that an interaction exists between 5-HT_{1A} receptor activation and mu-opioid activation in the control of nociception. This led to the concept whereby whereas repeated morphine administration leads to a loss of analgesic activity (tolerance) and even to hyperalgesia, repeated administration of a 5-HT_{1A} agonist could produce the opposite effect, i.e. a progressive loss of acute hyperalgesia and an increase in analgesia (Colpaert, 2006). These considerations stimulated pharmaceutical drug discovery to identify 5-HT_{1A} agonists that would have higher selectivity than 8-OH-DPAT (which also has 5-HT₇ affinity) and would be suitable for therapeutic purposes (8-OH-DPAT is poorly bioavailable) (Vacher *et al*, 1999).

F 13640 is a novel 5-HT_{1A} agonist that stimulates G_{αo} protein coupling to 5-HT_{1A} receptors. Shortly after administration, it decreases the vocalization threshold to paw pressure in normal rats whereas in rats exposed to formalin-induced tonic nociception it inhibits pain behaviour. Repeated F13640 administration produces an inverse tolerance (Colpaert *et al*, 2002; Bruins Slot *et al*, 2003; Xu *et al*, 2003; Bardin *et al*, 2005). These properties differ from

previously known 5-HT_{1A} receptor agonists, maybe due to differences in the efficacy at postsynaptic receptors and/or activation of different signaling mechanisms.

In order to shed new light to the mechanism of action of these agents, the present study examines the *in vivo* effects of F13640 on pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors using single unit extracellular recordings and microdialysis in rat brain.

Materials and Methods

Electrophysiological studies

Animals

Male albino Wistar rats (230-300 g; Iffa Credo, Lyon, France) were kept in a controlled environment (12 h light-dark cycle and 22±2 °C room temperature) with food and water provided *ad libitum*. Animal care followed the European Union regulations (O.J. of E.C. L358/1 18/12/1986) and was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. Stereotaxic coordinates (in mm) were taken from bregma and duramater according to the atlas of Paxinos and Watson (1998). The total number of rats used in the electrophysiological experiments was 30.

Single unit recordings

We examined the responses elicited by F13640 on serotonergic neurons of the DR and on pyramidal neurons of the mPFC. For serotonergic neurons, recordings were made essentially as described in Celada *et al* (2001) and Romero *et al* (2003). Pyramidal neurons were recorded as described in Puig *et al* (2003) and Kargieman *et al* (2007). Rats were administered chloral hydrate (400 mgkg⁻¹ i.p.) and positioned in a David Kopf stereotaxic frame. Thereafter, chloral hydrate was continuously administered i.p. at 50-70 mgkg⁻¹h⁻¹ using a perfusion pump.

Neurons were recorded extracellularly with glass micropipettes. Microelectrodes were filled with 2M NaCl. Typically, impedance was between

6-12 M Ω . Single unit recordings were amplified with a Neurodata IR283 (Cygnus Technology Inc., Delaware Water Gap, PA), postamplified and filtered with a Cibertec amplifier and computed on-line using a DAT 1401plus interface system Spike2 software (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK).

For recordings in the DR, a burr hole was drilled over lambda and the sagittal sinus was ligated, cut and deflected. Descents were carried out along the midline. 5-HT neurons were typically recorded 4.7-6.6 mm below the brain surface and were identified according to previously described electrophysiological criteria (Wang and Aghajanian, 1977).

Pyramidal neurons in the mPFC were recorded as follows. Bipolar stimulating electrodes were implanted in the VTA (AP -5.8, L -0.4, DV -8.2) for the antidromic stimulation of pyramidal neurons projecting to midbrain. All recorded units were identified as pyramidal neurons by antidromic activation from VTA and collision extinction with spontaneously occurring spikes as described (Puig *et al*, 2003). Descents in mPFC were carried out at AP +3.2-3.4, L -0.5 to -1.0, DV -1.0 to -4.0 below the brain surface. After the identification of a pyramidal neuron antidromically activated from midbrain, basal firing activity was recorded for at least 5 min and then, one or increasing drug doses were administered i.v. every 3 min, followed by the 5HT_{1A} receptor antagonist (\pm)WAY100635 when appropriate.

At the end of the experiments, rats were killed by an anesthetic overdose. The placement of the stimulating electrodes was verified histologically. Rats were perfused with saline followed by 10% formalin solution (Sigma). Brains were post-fixed, coronally sectioned (80 μ m) and stained with Neutral Red. The data from rats with stimulating electrodes outside VTA were not included in the analysis.

Data analysis

Changes in discharge rate were quantified by averaging the values in the third minute after each drug injection. Neurons were considered to respond to drugs if firing rate was altered \pm 30% from baseline. Burst analysis was carried out using the method of Laviolette *et al* (2005). Briefly, a burst episode was

defined as the occurrence of two or more spikes with an interspike interval <45 ms.

Drug effects were assessed using Student's *t*-test or one-way ANOVA for independent or repeated measures, as appropriate. Data are expressed as the mean±SEM. Statistical significance has been set at the 95% confidence level.

Microdialysis studies

Animals

Male Sprague-Dawley rats (OFA; Charles River France), weighing 240-260 g upon arrival were group housed (three rats per cage), under controlled conditions (12/12 light/dark cycle: lights on 07.00 a.m.; ambient temperature $21 \pm 1^\circ\text{C}$; humidity $55 \pm 5\%$), with rat food (A04, SAFE, Augy, France) and filtered (0.2 μm pore diameter) tap water freely available. Animals were housed and tested in an Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International (AAALAC Intl.)-accredited facility in strict compliance with all applicable regulations and the protocols were carried out in compliance with French regulations and with local Ethical Committee guidelines for animal research. The total number of rats used in the microdialysis experiments was 144.

Microdialysis procedure

Rats were anaesthetized with chloral hydrate (400-500 mg/kg, i.p.) or isoflurane. A guide cannula with a dummy probe was stereotaxically implanted into the mPFC, stereotaxic coordinates: AP +3.0 mm, L +0.8 mm, DV -1.7 mm, or the hippocampus: AP -4.8 mm, L +4.6 mm, DV -4.6 mm, from bregma and skull surface. Following surgery and recovery from anesthesia, animals were returned to their home cages. At the end of the day, each rat was placed in a microdialysis cage. On the following day, the dummy probe was replaced by a microdialysis probe (3 mm length, 0.5 mm diameter, CMA, Microdialysis AB). The probe was continuously perfused (1.1 $\mu\text{l}/\text{min}$) with artificial CSF (aCSF) containing 1 μM citalopram for the measure of 5-HT. Samples were collected every 20 min with the first four samples used for baseline. For the

experiment with systemic administration of the compounds, saline or (±)WAY100635 were injected s.c., followed, 40 min later, by i.p. administration of saline or F13640. For the experiments with local perfusion, saline was injected s.c. and 40 min later, F13640 was added to the perfusion medium for the concentration-response experiment. For the antagonism, (±)WAY100635 (or aCSF) was delivered through the dialysis probe and 40 min later, F13640 was added to the perfusion medium. Samples were collected for 140 min after administration or beginning of the perfusion of the agonist. At the end of the experiment, rats were killed by anesthetic overdose (pentobarbital 160 mg/kg, i.p.) and the brain was removed, frozen and cut in a cryomicrotome (Jung Frigocut 2800) to verify the placement of the probe.

Analytical procedure

Analysis of 5-HT and DA was performed by an HPLC, as described Assié *et al*, 2005. HPLC column was a reverse phase (Merck, Lichrocart 125-2, Superspher 100 RP-18). Mobile phase was pumped at 0.2 ml/min (HPLC-118 solvent module, Beckman Coulter Inc., Fullerton CA, USA). DA or 5-HT were electrochemically detected with a glassy carbon working electrode kept at +0.64 V versus Ag/AgCl reference electrode (DECADE detector, ANTEC Leyden BV, Leiden, The Netherlands). Data were acquired using a Beckman 32 Karats system. Concentrations of DA or 5-HT in brain dialysates were estimated by comparing peak areas with those of external standards of known concentration of each neurotransmitter. The limit of detection (three times baseline noise) was approximately 1 fmol/20 µl sample.

Data analysis

Dialysate 5-HT or DA concentrations are given as fmol/20 µl fraction and expressed in the figures as the percentage of baseline values. Statistical analysis was carried out using repeated measures ANOVA using treatment and time as variables, post hoc differences between groups were analysed by contrasts method. Mean percent AUC values for the 140 min period after administration of F13640 were used to estimate the ED₅₀ value of F13640 by linear interpolation between the two doses that increased DA or decreased 5-

HT levels with amounts bordering 50 % (vehicle control as 0 % and maximal effect of the compound as 100 %).

Drugs

F13640 (3-Chloro-4-fluoro-phenyl)-[4-fluoro-4-[[[(5-methyl-pyridin-2-yl)methyl] - amino]-methyl]piperidin-1-yl]-methadone) was synthesized at the Centre de Recherche Pierre Fabre. The doses of compounds were expressed as the weight of the free base. All drug and molecular target nomenclature conforms to The British Journal of Pharmacology's 'Guide to Receptors and Channels' (Alexander *et al*, 2008)

For electrophysiological studies chloral hydrate was from Merck (NJ, USA) and (\pm)WAY100635 (N-[2-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl]-N-(2-pyridinyl) cyclohexanecarboxamide) hydrochloride was from RBI (Natick, MA). Stock solutions were prepared and aliquots were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Working solutions were prepared daily by dilution in saline at the appropriate concentrations and injected i.v. (up to 1 mlkg^{-1}) through the femoral vein. Doses are expressed as weight of free bases.

For microdialysis experiments, chloral hydrate was purchased from Acros (Geel, Belgium), pentobarbital sodium from Ceva Santé Animale (Libourne, France), isoflurane from Baxter SA (Paurenas, France). Citalopram hydrobromide was kindly donated by Lundbeck (Copenhagen, Denmark). (\pm)WAY100635 was synthesized at the Centre de Recherche Pierre Fabre. (\pm)WAY100635 and F13640 were dissolved in distilled water; the injection volume was 0.1 ml/kg .

Results

Effect of F13640 on the activity of DR serotonergic neurons

We examined the effect of F13640 on serotonergic neurons of the DR in the range 0.2 –10 µg / kg i.v.. F13640 suppressed the activity of all 5-HT neurons recorded (baseline firing rate 1.52 ± 0.3 Hz; $n = 6$).

Repeated measures ANOVA showed a significant effect of F13640 on the firing rate of 5-HT neurons ($F_{5,20} = 25.7$, $p < 0.00001$). The dose of 5 µg / kg i.v. produced a full suppression of firing in all units tested. Figure 1A shows the suppressing effect of F13640 on a DR 5-HT neuron. Figure 1B shows the dose-effect relationship for the F13640-induced inhibition of serotonergic cell firing for the 5 neurons exposed to all doses.

The calculated ED50 values for the inhibition of 5-HT cell firing were 0.89 (all neurons; $R^2 = 0.74$; $n = 6$) and 0.64 (neurons with all doses; $R^2 = 0.78$; $n = 5$).

The inhibitory effect of F13640 on serotonergic cell firing was reversed by the subsequent administration of (\pm)WAY100635 (13.34 ± 3.34 µg / kg i.v.) ($F_{2,8} = 25.2$; $p < 0.0005$; $n = 5$) (Figure 1C).

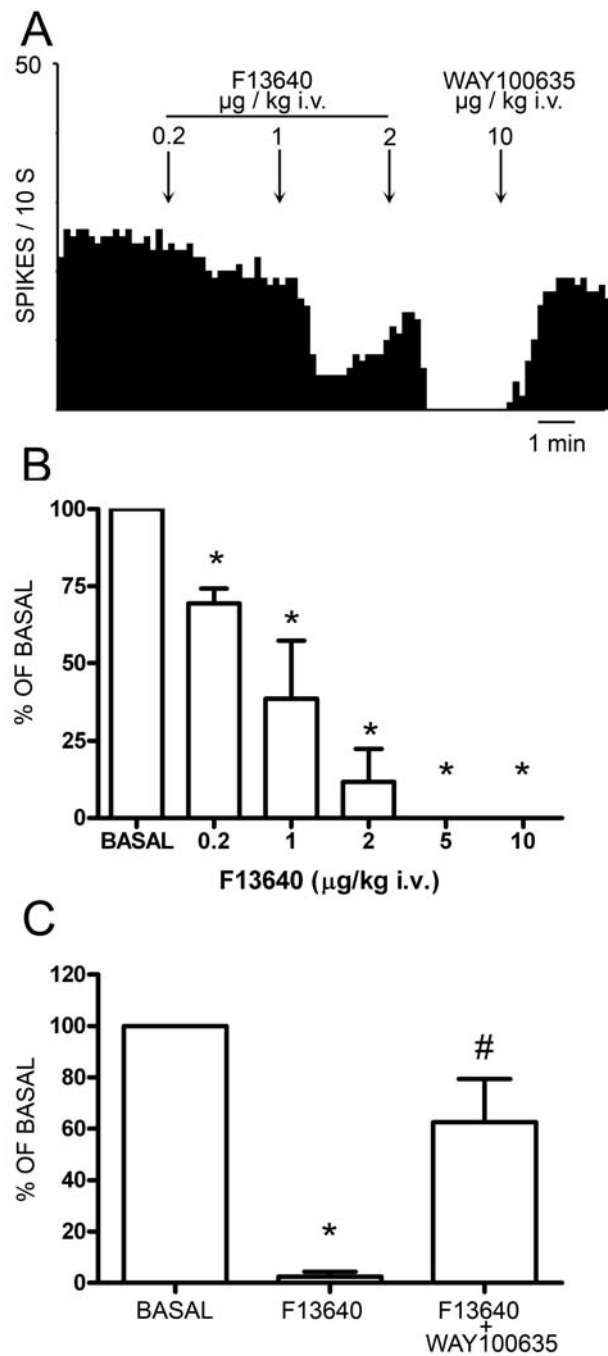


Figure 1. (A) Integrated firing rate histogram showing the suppressant effect of F13640 on the firing rate of a 5-HT neuron. This unit ceased to fire at a cumulative dose of 3.2 $\mu\text{g/kg i.v.}$ The injection of (\pm)WAY100635 (10 $\mu\text{g/kg i.v.}$) completely reversed the inhibition elicited by F13640. Arrows mark the time of drug administration. (B) Bar graph showing the inhibition of serotonergic cell firing induced by the i.v. administration of F13640 (0.2 -10 $\mu\text{g/kg i.v.}$). * $p < 0.05$ vs. baseline Newman-Keuls post ANOVA. Data are means \pm SEM of five neurons. (C) Bar graph showing the inhibitory effect on 5-HT cell firing produced by F13640 and the reversal of this effect by the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY-16635 ($n = 5$). * $p < 0.05$ vs. baseline; # $p < 0.05$ vs. maximal effect of F13640; Newman-Keuls post-ANOVA.

Effect of F13640 on the activity of pyramidal neurons of the mPFC

The effect of F13640 (0.2-10 µg / kg i.v.) on mPFC neurons was examined in 16 rats (one neuron per rat). Baseline firing rate of recorded pyramidal neurons was 1.60 ± 0.26 Hz (n = 16). Of the 16 neurons recorded, F13640 had an excitatory effect on 13 of them, inhibited two other neurons and did not affect one neuron. Therefore, the analysis of the excitatory effect of the drug has been carried out on 13 neurons (baseline firing rate 1.74 ± 0.30). Figure 2A and 2B shows examples of two pyramidal neurons in the mPFC excited by F13640 administration.

As F13640 was able to reduce the firing rate of serotonergic neurons at the lower dose used (0.2 µg/kg i.v.), we specifically tested whether this dose was also able to increase pyramidal cell firing. A paired t-test revealed significant differences ($p < 0.003$) between baseline and this dose ($159 \pm 56\%$ of baseline; n = 13).

We also injected higher doses of F13640 to evaluate the dose-response profile of the drug. F13640 produced a dose-related, statistically significant increase of the firing rate of mPFC pyramidal neurons in the range 0.2-5 µg / kg i.v. ($F_{4,24} = 3.18$, $p < 0.04$, n = 7) showing post-hoc differences between baseline and 5 µg / kg i.v. Four neurons received an additional 10 µg/kg dose which did not seem to increase pyramidal cell firing further (Fig. 2C). A similar analysis of the data up to the 2 µg / kg dose with a total of 10 neurons also revealed a significant effect of treatment ($F_{3,27} = 6.76$, $p < 0.002$) showing post-hoc differences between the doses of 1 and 2 µg / kg i.v. vs. baseline.

The excitatory effect of F13640 was significantly antagonized by the subsequent administration of the selective 5-HT_{1A} antagonist (\pm)WAY100635 (75 ± 11 µg / kg i.v.). One-way repeated-measures ANOVA showed a significant effect of the treatment ($F_{2, 10} = 8.0$; $p < 0.01$; n = 6) with significant post hoc differences between F13640 and baseline and between F13640 + (\pm)WAY100635 and F13640 (Fig. 2D).

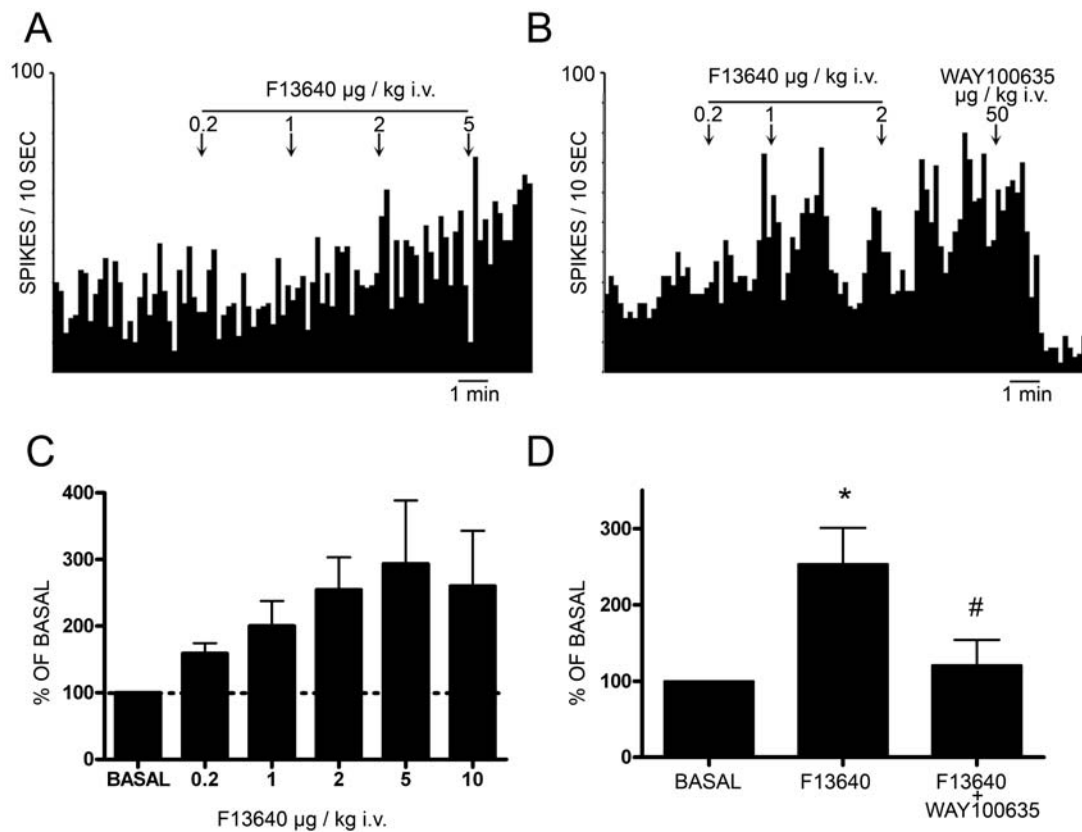


Figure 2. (A, B) Integrated firing rate histograms showing the increase in pyramidal cell firing induced by F13640. The effect of F13640 in the unit in the right panel was completely reversed by the administration of the 5-HT_{1A} antagonist WAY-16635. Arrows mark the time of drug administration. (C) Descriptive bar graph showing the excitatory effect of F13640 on mPFC pyramidal neurons. Data are expressed as percentage of baseline. The number of neurons in each group is 13, 13, 11, 10, 7 and 4 for baseline, 0.2, 1, 2, 5 and 10 $\mu\text{g/kg i.v.}$ F13640, respectively. (D) Bar graph showing the maximal increase in the firing rate induced by F13640 in pyramidal neurons of the mPFC and its reversal by the subsequent administration of WAY-100635 (n = 6). *p < 0.05 vs. baseline; #p < 0.05 vs. maximal effect of F13640; Newman-Keuls test post-ANOVA.

F13640 caused a parallel increase on the burst firing of activated mPFC pyramidal neurons showing significant effects on most of the parameters tested (Table 1).

Table 1. Effect of F13640 on the burst activity of mPFC pyramidal neurons. Data are means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. baseline Newman-Keuls test post-ANOVA.

	Basal	F13640 (0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	F13640 (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)	F13640 (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$)
% of spikes fired in burst	53 \pm 7	59 \pm 5	60 \pm 6	65 \pm 5
Spikes in burst in 1 min	62 \pm 17	93 \pm 23	146 \pm 56	222 \pm 80*
Spikes per burst	2.22 \pm 0.06 (N=9)	2.25 \pm 0.08	2.46 \pm 0.14	2.41 \pm 0.10
Burst episodes (1 min)	28 \pm 7.6	41 \pm 11	59 \pm 24	90 \pm 33*
Burst duration (ms)	15.55 \pm 2.22 (N=9)	17.41 \pm 3.35	18.65 \pm 3.00	22.86 \pm 3.66**
Interspike interval within bursts (ms)	12.67 \pm 1.53 (N=9)	13.27 \pm 1.98	14.31 \pm 1.67	15.29 \pm 1.57
N	10	10	10	10

Regional comparisons

The excitatory effect on the firing of mPFC pyramidal neurons after the administration of F13640 occurred at doses similar to those inhibiting the activity of DR 5-HT neurons. In both regions, doses of 0.2-1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were able to reduce (DR) or increase (mPFC) neuronal activity through the activation of 5-HT_{1A} receptors. The ED₅₀ for the inhibition of DR 5-HT neurons was 0.6-0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, a dose at which clear excitatory responses were observed in the mPFC (Fig. 3).

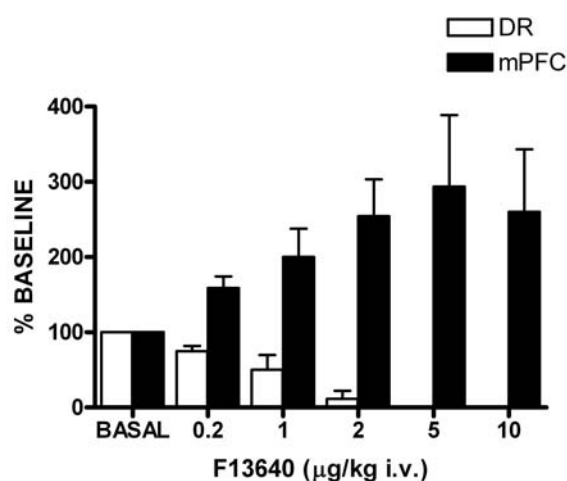


Figure 3. Bar graphs showing the comparative effects of F13640 on the firing activity of pyramidal neurons in the mPFC (excitations) and 5-HT neurons in the DR. Note that the dose of 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. induced changes in the activity of both areas.

Effect of F13640 on the extracellular 5-HT concentration in the ventral hippocampus

The mean basal extracellular level of 5-HT in ventral hippocampus was 45.4 ± 2.5 fmol / 20 μ l (n = 30). Administration of F13640 (0.04-0.63 mg / kg) dose-dependently decreased extracellular 5-HT during the 140 min period after injection (Fig 4, top left panel). (\pm)WAY100635 (0.16 mg / kg), when given alone, did not significantly alter extracellular 5-HT and antagonized the decrease induced by F13640 0.63 mg / kg (Fig 4 top right panel). Two-way ANOVA for repeated measures indicated a significant effect of treatment ($F_{5,24} = 33.1$, $p < 0.0001$) and time ($F_{6,137} = 5.12$, $p < .0001$) and a tendency to treatment x time interaction ($F_{30,137} = 1.54$, $p = 0.051$). Post-hoc analysis by the contrasts method indicated a significant global effect at 0.16 ($p < 0.0001$) and 0.63 mg / kg ($p < 0.0001$), compared to controls. The effects of 0.63 mg / kg F13640 were significantly reversed by (\pm)WAY100635 ($p < 0.0001$). The ED₅₀ value of F13640 for the inhibition of extracellular concentration of 5-HT in the ventral hippocampus was 0.09 mg/kg.

Effect of F13640 on the extracellular 5-HT concentrations in the medial prefrontal cortex

The mean basal extracellular level of 5-HT in mPFC was 42.7 ± 2.2 fmol/20 μ l (n = 35). Administration of F13640 (0.04-0.63 mg/kg) dose-dependently decreased extracellular 5-HT during the 140 min period after injection (Fig 4, middle left panel). (\pm)WAY100635 (0.16 mg/kg), when given alone, did not significantly alter extracellular 5-HT and antagonized the decrease induced by F13640 0.16 mg/kg (Fig 4 middle right panel). Two-way ANOVA for repeated measures indicated a significant effect of treatment ($F_{5,29} = 32.9$, $p < 0.0001$) and time ($F_{6,169} = 8.82$, $p < .0001$) and no significant treatment x time interaction ($F_{30,169} = 0.95$, $p = 0.54$). Post-hoc analysis by the contrasts method indicated a significant global effect at 0.04 ($p = 0.045$), 0.16 ($p < 0.0001$) and 0.63 mg/kg ($p < 0.0001$), compared to controls. The effects of 0.16 mg/kg F13640 were significantly reversed by (\pm)WAY100635 ($p < 0.0001$). The ED₅₀ value of F13640 for the inhibition of extracellular concentration of 5-HT in the mPFC was 0.06 mg/kg.

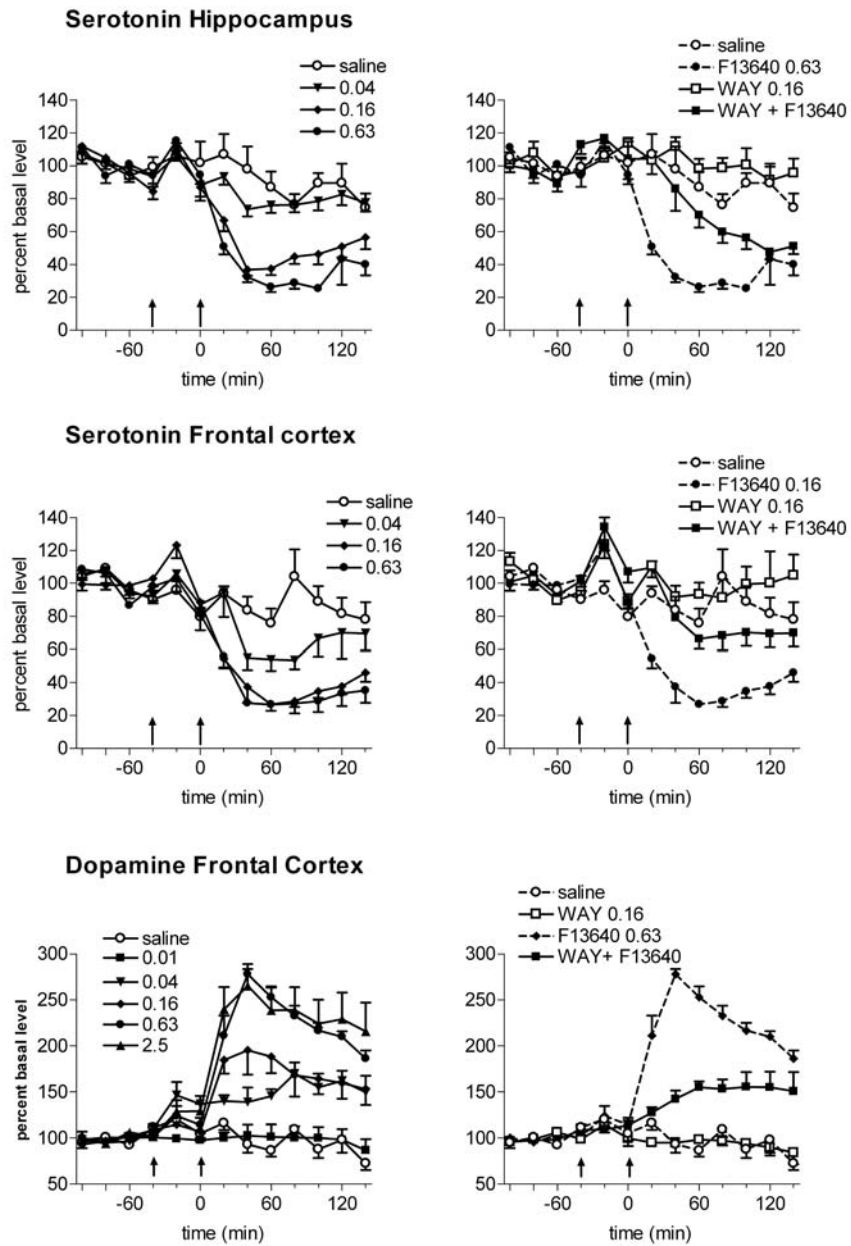


Figure 4. Effects of i.p. administration F13640 on extracellular serotonin in the ventral hippocampus or the medial prefrontal cortex and on dopamine levels in the medial prefrontal cortex of freely moving rats (left panels) and antagonism by (\pm)WAY100635 (right panels). Data are expressed as a percentage of the mean absolute amount of neurotransmitter in the four samples collected before treatment. The first arrow indicates injection of saline or (\pm)WAY100635 (0.16 mg/kg, s.c.), the second arrow indicates administration of saline or F13640. Results are mean \pm S.E.M. for 5-8 animals per group.

Effect of F13640 on the extracellular DA concentrations in the medial prefrontal cortex

Systemic administration of F13640

The mean basal extracellular level of DA in mPFC was 6.38 ± 0.40 fmol/20 μ l (n = 40). Systemic administration of F13640 (0.01-2.5 mg/kg i.p.) dose-dependently increased extracellular DA level during the 140 min period after injection (Fig 8 bottom left panel). (\pm)WAY100635 (0.16 mg/kg), when given alone, did not significantly alter extracellular DA and antagonized the decrease induced by F13640 0.63 mg/kg (Fig 4 bottom right panel). Two-way ANOVA for repeated measures indicated a significant effect of treatment ($F_{7,32} = 19.5$, $p < 0.0001$), time ($F_{6,191} = 7.47$, $p < 0.0001$) and treatment x time interaction ($F_{42,191} = 2.89$, $p < 0.0001$). The method of contrasts indicated a significant global effect at doses 0.04 ($p = 0.0044$), 0.16 ($p = 0.0001$) 0.63 and 2.5 mg/kg ($p < 0.0001$), compared to controls. The effects of F13640 0.63 mg/kg were significantly reversed by (\pm)WAY100635 ($p = 0.0002$). The ED₅₀ value of F13640 for the increase in extracellular DA concentration in mPFC was 0.1 mg/kg.

Local perfusion of F13640 through the dialysis probe

The mean basal extracellular level of DA was 7.65 ± 0.51 fmol/20 μ l (n = 39). Local perfusion of F13640 through the dialysis probe in the mPFC (1-1000 μ M) increased extracellular DA in a concentration-dependent manner during the 140 min period examined. The maximal increase (20 min after the beginning of the perfusion) was 465 % of basal level at 1000 μ M (Fig 9 top panel). The two-way ANOVA for repeated measures indicated a significant effect of treatment ($F_{4,14} = 9.55$, $p = 0.0006$) and treatment x time interaction ($F_{24,84} = 5.00$, $p < 0.0001$), but no significant effect of time ($F_{6,84} = 2.03$, $p = 0.07$). Post-hoc analysis by the contrasts method indicated a significant global effect at the concentrations 1000 μ M ($p < 0.0001$).

(\pm)WAY100635 (100 μ M), perfused through the dialysis probe 40 min before and together with F13640 300 μ M prevented the increase in

extracellular DA induced by F13640 (Fig 5 bottom panel). The two-way ANOVA for repeated measures indicated a significant effect of treatment ($F_{3,16} = 13.4$, $p = 0.0001$) and time ($F_{6,96} = 4.63$, $p = 0.0004$) and a significant interaction ($F_{18,96} = 3.27$, $p < 0.0001$). Post-hoc analysis by the contrasts method indicated a significant global effect of 300 μM F13640 compared to controls ($p < 0.0001$) and a significant antagonist effect of (\pm)WAY100635 100 μM ($p = 0.0006$).

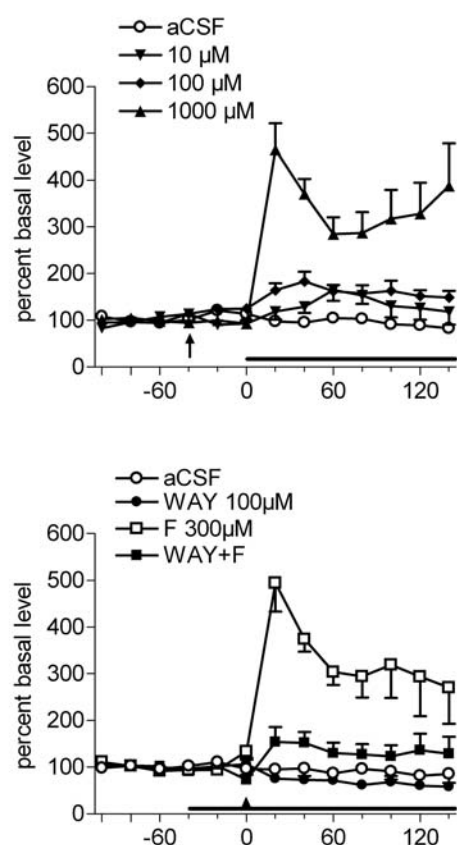


Figure 5. Effects of local perfusion of F13640 in the medial prefrontal cortex on extracellular dopamine levels and antagonism by (\pm)WAY100635. Data are expressed as a percentage of the mean absolute amount of dopamine in the four samples collected before treatment. Top panel: effects different concentrations of F13640 administered through the dialysis probe from time 0 (bar), the arrow indicates saline administration (s.c.). Bottom panel: antagonist effects of (\pm)WAY100635 100 μM administered through the dialysis probe on the increase in extracellular dopamine induced by 300 μM F13640. The bar indicates the presence of compounds in the perfusion medium, the arrow indicates the addition of F13640 to the perfusion medium. Results are mean \pm S.E.M. for 3 to 5 animals per group.

Discussion

The present study indicates that the selective 5-HT_{1A} agonist F13640 (befiradol) shows a comparable activity on cortical pyramidal vs. serotonergic neurons in the rat brain. This comparable sensitivity of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors is supported by microdialysis studies, in which similar doses of F13640 reduced hippocampal 5-HT release and increase DA release in mPFC, which result from the activation of presynaptic 5-HT_{1A} autoreceptors and of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in mPFC, respectively (see below). Likewise, electrophysiological data support a comparable and high sensitivity of both receptor subsets to F13640, given the observation that the lower dose used (0.2 µg/kg i.v.) had a significant effect on the firing rate of DR serotonergic neurons and pyramidal neurons in the mPFC. The cellular and neurochemical responses evoked by F13640 were prevented or reversed in all instances by the selective 5-HT_{1A} antagonist WAY-100635, indicating the exclusive involvement of 5-HT_{1A} receptors.

This adds to previous observations indicating that F13640 is a very high efficacy and highly selective agonist at 5-HT_{1A} receptors. Indeed, in a stringent *in vitro* test of agonist efficacy (stimulation of receptor-coupled G-protein activation as determined by binding of the radiotracer, [³⁵S]GTPγS, in C6-glia cells), F13640 showed very high efficacy (75%) relative to serotonin (100%) whereas other agonists were substantially less active (Colpaert *et al*, 2002). F13640 also showed impressive selectivity for 5-HT_{1A} receptors. It shows sub-nanomolar affinity at these sites, with no detectable interaction up to micromolar concentrations at other serotonin receptor subtypes or at a large variety of other receptors, transporters and enzymes (Colpaert *et al*, 2002).

Although no subtypes of 5-HT_{1A} receptors have been reported, previous electrophysiological studies comparing the sensitivity of auto- (raphe) and postsynaptic (hippocampus) 5-HT_{1A} receptors indicated a greater sensitivity of the former receptors to the inhibitory actions of 5-HT and exogenous agonists (Sprouse and Aghajanian, 1987, 1988; Dong *et al*, 1997; Blier and Ward, 2003). Using similar experimental approaches, the selective

5-HT_{1A} agonists 8-OH-DPAT and BAY x 3702 (repinotan), show ED₅₀ values around 1 µg·kg⁻¹ i.v. to suppress serotonergic cell firing (Blier and de Montigny, 1987; Dong *et al*, 1998; Hajós *et al*, 1999; Casanovas *et al*, 2000; Romero *et al*, 2003). However, similar or higher doses are required to increase the discharge of cortical neurons (Borsini *et al*, 1995; Hajós *et al*, 1999; Díaz-Mataix *et al*, 2006). This preferential selectivity for 5-HT_{1A} autoreceptors was attributed to a receptor reserve in the raphe (Meller *et al*, 1990; Cox *et al*, 1993). This concept was partly supported by *in vitro* observations indicating that the agonist/antagonist profile of 5-HT_{1A} receptor agents varied depending on the cellular density of 5-HT_{1A} receptors (Hoyer and Boddeke, 1993).

The ED₅₀ of F13640 to suppress serotonergic activity (0.8 µg/kg i.v.) is equal to that of the prototypical 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT under the same experimental conditions (Romero *et al*, 2003). In contrast, F13640 enhances mPFC pyramidal discharge to 159 ± 56% of baseline at 0.2 µg/kg i.v., whereas doses higher than 0.5-1 µg/kg i.v. 8-OH-DPAT are typically required to elicit a significant increase of pyramidal discharge in mPFC (Hajós *et al*, 1999; Lladó-Pelfort *et al*, 2009). This indicates that, unlike 8-OH-DPAT and azapirones, F13640 shows a comparable potency at pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors.

The selective 5-HT_{1A} agonist, F15599 shows a preferential activation of 5-HT_{1A} receptors enhancing pyramidal cell activity in mPFC (Lladó-Pelfort *et al*, 2010), an observation that raises questions about previous concepts on the presynaptic selectivity of 5-HT_{1A} agonists. The ranking order of post- vs. presynaptic 5-HT_{1A} receptor selectivity of these compounds, using the same experimental conditions is F15599 > F13640 > 8-OH-DPAT. The different selectivity of these agents for pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors may be related to the activation of different intracellular signaling mechanisms due to the coupling to one or more G proteins, as recently demonstrated for 8-OH-DPAT and buspirone in the raphe nuclei (Valdizán *et al*, 2009).

Given the inhibitory nature of 5-HT_{1A} receptors on neuronal activity (Andrade and Nicoll, 1987; Innis and Aghajanian, 1987; Araneda and Andrade, 1991; Puig *et al*, 2005) the increase of mPFC pyramidal discharge elicited by the systemic administration of 5-HT_{1A} receptor agonists (Borsini *et al*, 1995;

Hajós *et al*, 1999; Díaz-Mataix *et al*, 2006; Lladó-Pelfort *et al*, 2009, 2010; this work) may seem paradoxical, since 1) microiontophoretic application of these compounds at large concentrations in mPFC inhibits the discharge of putative pyramidal neurons (Ashby *et al*, 1994; Rueter and Blier, 1999), 2) high doses of 8-OH-DPAT inhibit mPFC pyramidal neurons (Hajós *et al*, 1999; Lladó-Pelfort *et al*, 2009), 3) physiological release of 5-HT inhibits the activity of mPFC pyramidal neurons through 5-HT_{1A} receptors (Amargós-Bosch *et al*, 2004; Puig *et al*, 2005) and 4) there is *in vitro* evidence of inhibition of mPFC pyramidal cells by 5-HT_{1A} agonists (Tanaka and North 1993). Conceivably, this excitatory effect may result from an action on cortical networks involving the activation of 5-HT_{1A} receptors in local GABA interneurons (Santana *et al*, 2004), perhaps in local networks connected through gap junctions (Hestrin and Galareta, 2005), and the subsequent disinhibition of pyramidal neurons. This hypothesis appears to be supported by recent data indicating that a) the excitatory effect of low 8-OH-DPAT doses is prevented by the local application of the GABA_A antagonist gabazine, and b) 8-OH-DPAT inhibits the activity of fast-spiking GABA interneurons at doses that increase pyramidal cell discharge (Lladó-Pelfort *et al*, 2009). Although this mechanism has not been demonstrated for F13640, it seems likely given the similar excitatory effect of low doses of 8-OH-DPAT and F13640.

Microdialysis data also support a potent postsynaptic action of F13640. F13640 had a similar potency to promote DA release in mPFC and to suppress hippocampal 5-HT release. The 5-HT and DA output in hippocampus and mPFC are used as neurochemical indicators of the activation of somatodendritic autoreceptors and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors, respectively. Some studies support the view that 5-HT release in ventral hippocampus depends on the activation of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors (Adell *et al*, 1993; Hutson *et al*, 1989; McQuade and Sharp, 1997). However, since the activity of DR 5-HT neurons is also dependent on mPFC 5-HT_{1A} receptor activation (Ceci *et al*, 1994; Hajós *et al*, 1999; Celada *et al* 2001) it is uncertain whether hippocampal 5-HT release may be influenced to some extent by postsynaptic 5-HT_{1A} receptor activation, as it happens with that in mPFC (Casanovas *et al*, 1999; Celada *et al*, 2001).

On the other hand, DA output in mPFC is dependent on the activation of cortical postsynaptic 5-HT_{1A} receptors, possibly located on or close to pyramidal neurons projecting to the ventral tegmental area (Díaz-Mataix *et al*, 2005; Bortolozzi *et al*, 2007). This assertion is further supported by the increase in DA output produced by the local application of F13640 in mPFC.

F13640 has shown remarkable efficacy in a variety of models of pain. Thus, in agreement with the concept outlined above, F13640 produced a hyperalgesic response in normal rats. However, in animals under nociceptive challenge, in the formalin model of tonic nociceptive pain, F13640 was potently analgesic (Colpaert *et al*, 2002). Both the hyperalgesic and the analgesic effects of F13640 were mediated by 5-HT_{1A} receptor activation, as demonstrated by their reversal with WAY100635, a selective 5-HT_{1A} antagonist. It is important to note that the capacity to induce these responses is related to the agonist efficacy of the ligand. Indeed, other agonists, including 8-OH-DPAT and buspirone, were incapable of opposing formalin-induced nociception (Bardin *et al*, 2003). The action of F13640 extends to various other models of pain, including spinal cord injury-induced central neuropathy and sciatic nerve ligation-induced peripheral neuropathy (Colpaert *et al*, 2002).

The remarkable activity of F13640 raises the issue of its mechanism of action at a molecular level. Clearly, as mentioned above, the agonist efficacy of the compound is fundamental to its physiological activity – less efficacious agonists fail to demonstrate similar antinociceptive action. Moreover, differential actions of F13640 in intracellular signaling mechanisms at pre- or postsynaptic receptors may also contribute. Thus, in *ex vivo* measures of extracellular-regulated kinase (ERK) phosphorylation, F13640 exhibited potent (MED 0.04 mg/kg i.p.) inhibition of response in hippocampus, an effect controlled by presynaptic 5-HT_{1A} receptor activation (Buritova *et al* 2009). In contrast, stimulation of ERK phosphorylation in brain regions expressing postsynaptic 5-HT_{1A} receptors such as prefrontal cortex and hypothalamus required higher doses of F13640 (0.63 and 0.16 mg/kg i.p., respectively) (Buritova *et al* 2009). These observations suggest that, whereas F13640 appears equally potent to modulate neuronal activity, it possesses a different balance of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor activation compared with

other agonists, such as the close analogue F15599, which exhibits preferential activity at post-synaptic 5-HT_{1A} receptors, particularly in the prefrontal cortex (Newman-Tancredi *et al*, 2009).

Moreover, other populations of 5-HT_{1A} receptors likely intervene in the activity of F13640. Indeed, activation of spinal cord-located 5-HT_{1A} receptors produces analgesia in the formalin test (Bardin and Colpaert, 2004) suggesting that peripheral 5-HT_{1A} receptors contribute to the analgesic action of F13640. However, it seems likely that raphe 5-HT_{1A} receptors act as “signal-integration” sites by virtue of their control of both descending serotonergic transmission to the spinal cord and ascending transmission to higher brain regions. Various brain regions expressing post-synaptic 5-HT_{1A} receptors, including prefrontal and cingulate cortices and amygdala, appear to be involved in pain perception in human volunteers (Martikainen *et al*, 2007), reinforcing the notion that analgesia by F13640 involves multiple brain regions. In other studies, it has been suggested that *antagonism* of 5-HT_{1A} autoreceptors is necessary to achieve analgesic activity (Mico *et al*, 2006). This apparently discrepant hypothesis may, in fact, be reconciled with the observed activity of F13640 to downregulate / desensitize 5-HT_{1A} autoreceptors (Assié *et al*, 2006 and unpublished observations). Thus, F13640 may initially act by potently activating both pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. However, following repeated administration, F13640 may essentially activate postsynaptic receptors because the autoreceptors will have been desensitized.

In summary, the present study shows that F13640 is a potent and efficacious 5-HT_{1A} agonist acting on pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors controlling, respectively, the activity of serotonergic neurons and of pyramidal neurons in prefrontal cortex. Given its selectivity for 5-HT_{1A} receptors, these activities are likely related to its analgesic properties. Further work is necessary to establish the role of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the therapeutic action of F13640.

Acknowledgements

Work supported by grants SAF 2007-62378, FIS PI060264, FIS PI09/1245 and Pierre Fabre Médicament. L.L-P is supported by a JAE fellowship from CSIC. P.C. is supported by the Researcher Stabilization Program of the Health Department of the Generalitat de Catalunya. We acknowledge Véronique Ravaille and Christelle Benas for technical assistance with microdialysis experiments and Mónica Gutiérrez and Verónica Paz for electrophysiological experiments.

References

- Adell A, Carceller A, Artigas F (1993). In vivo brain dialysis study of the somatodendritic release of serotonin in the Raphe nuclei of the rat: effects of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin. *J Neurochem* 60(5):1673-81.
- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA (2008). Guide to receptors and channels (GRAC), 3rd edition (2008 revision). *Br J Pharmacol* 153:S1–S209.
- Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, *et al* (2004). Co-expression and in vivo interaction of Serotonin1A and Serotonin2A receptors in Pyramidal Neurons of Prefrontal Cortex. *Cereb Cortex* 14: 281-299.
- Andrade, R. and Nicoll, R.A. (1987). Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurons of the rat hippocampus recorded in vitro. *J. Physiol.* 394: 99-124.
- Apkarian AV, Bushnell MC, Treede RD, Zubieta JK (2005). Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain* 9(4):463-84. Epub 2005 Jan 21. Review.
- Araneda R and Andrade R (1991). 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 40: 399-412.

Artigas F, Celada P, Laruelle M, and Adell A (2001). How does pindolol improve antidepressant action? *Trends Pharmacol Sci* 22: 224-228.

Artigas F, Romero L, de Montigny C et al.. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci* 1996;19:378-383.

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

Bardin L, Tarayre JP, Koek W, and Colpaert FC (2001) In the formalin model of tonic nociceptive pain, 8-OH-DPAT produces 5-HT_{1A} receptor-mediated, behaviorally specific analgesia. *Eur J Pharmacol* 421:109–114.

Bardin L, Tarayre JP, Malfetes N, Koek W, Colpaert FC (2003). Profound, non-opioid analgesia produced by the high-efficacy 5-HT_{1A} agonist, F 13640, in the formalin model of tonic nociceptive pain. *Pharmacology* 67, 182– 194.

Bardin L and Colpaert FC (2004) Role of spinal 5-HT_{1A} receptors in morphine analgesia and tolerance in rats. *Eur J Pain* 8:253–261.

Bardin L, Assié MB, Pélissou M, Royer-Urios I, Newman-Tancredi A, Ribet JP, Sautel F, Koek W, Colpaert FC (2005). Dual, hyperalgesic, and analgesic effects of the high-efficacy 5-hydroxytryptamine 1A (5-HT_{1A}) agonist F13640 [(3-chloro-4-fluoro-phenyl)-[4-fluoro-4-[(5-methyl-pyridin-2-ylmethyl)-amino]-methyl]piperidin-1-yl]methanone, fumaric acid salt]: relationship with 5-HT_{1A} receptor occupancy and kinetic parameters. *J Pharmacol Exp Ther* 312(3): 1034-42.

Blier P, de Montigny C (1987). Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT_{1A} agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain. *Synapse* 1: 470-480.

Blier P, Ward NM (2003). Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? *Biol Psychiatry* 53: 193-203.

Borsini F, Ceci A, Bietti G, Donetti A (1995). BIM17, a 5-HT_{1A} receptor agonist/5-HT_{2A} receptor antagonist directly activates postsynaptic 5-HT inhibitory responses in the rat cerebral cortex. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 352: 283-290.

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

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.

Briley M. (2004) Clinical experience with dual action antidepressants in different chronic pain syndromes. *Hum Psychopharmacol*. 19 Suppl 1:S21-5. Review

Bruins Slot LA, Koek W, Tarayre JP, Colpaert FC (2003). Tolerance and inverse tolerance to the hyperalgesic and analgesic actions, respectively, of the novel analgesic, F13640. *Eur J Pharmacol* 466(3):271-9.

Buritova J, Berrichon G, Cathala C, Colpaert F, Cussac D. (2009) Region-specific changes in 5-HT_{1A} agonist-induced Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2 phosphorylation in rat brain: a quantitative ELISA study. *Neuropharmacology*. 56:350-361.

Casanovas JM, Berton O, Celada P, Artigas F (2000). In vivo actions of the selective 5-HT_{1A} receptor agonist BAY x 3702 on serotonergic cell firing and release. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol*. 362: 248-254.

Casanovas JM, Hervás I, Artigas F (1999). Postsynaptic 5-HT_{1A} receptors control 5-HT release in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroreport* 10(7): 1441-5.

Ceci A, Baschiroto A, Borsini F (1994). The inhibitory effect of 8-OH-DPAT on the firing activity of dorsal raphe serotonergic neurons in rats is attenuated by lesion of the frontal cortex. *Neuropharmacology* 33(5):709-13.

Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F (2001). Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of 5-HT_{1A}, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* 21: 9917-9929.

Cervo L, Rossi C, Tatarczynska E, Samanin R (1994). Role of 5-HT_{1A} receptors in the antinociceptive action of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the rat. *Eur J Pharmacol* 263(1-2):187-91.

Colpaert FC (2006). 5-HT_{1A} receptor activation: new molecular and neuroadaptive mechanisms of pain relief. *Curr Opin Investig Drugs* 7(1):40-7. Review.

Colpaert FC, Tarayre JP, Koek W, Pauwels PJ, Bardin L, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Cosi C, Carilla-Durand E, Assié MB, Vacher B (2002). Large-amplitude 5-HT_{1A} receptor activation: a new mechanism of profound, central analgesia. *Neuropharmacology* 43(6):945-58.

Cox RF, Meller E, Waszczak BL (1993). Electrophysiological evidence for a large receptor reserve for inhibition of dorsal raphe neuronal firing by 5-HT_{1A} agonists. *Synapse* 14: 297-304.

Cruz DA, Eggan SM, Azmitia EC, Lewis DA (2004). Serotonin_{1A} receptors at the axon initial segment of prefrontal pyramidal neurons in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 161: 739-742.

Díaz-Mataix L, Artigas F, Celada P (2006). Activation of pyramidal cells in rat medial prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area by a 5-HT_{1A} receptor agonist. *Eur Neuropsychopharmacol* 16:288-296.

Diaz-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.

Dong J, de Montigny C, Blier P (1997). Effect of acute and repeated versus sustained administration of the 5-HT_{1A} receptor agonist ipsapirone:

electrophysiological studies in the rat hippocampus and dorsal raphe. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 356: 303-311.

Dong J, de Montigny C, Blier P (1998). Full agonistic properties of BAY x 3702 on presynaptic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors electrophysiological studies in the rat hippocampus and dorsal raphe. *J Pharmacol Exp Ther* 286(3):1239-47.

Hajós M, Hajos-Korsok E, Sharp T (1999). Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT_{1A} receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Br J Pharmacol* 126: 1741–1750.

Hestrin S, Galarreta M (2005). Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *Trends Neurosci* 28(6):304-9. Review.

Hoyer D, Boddeke HW (1993). Partial agonists, full agonists, antagonists: dilemmas of definition. *Trends Pharmacol Sci* 14: 270-275.

Hutson PH, Sarna GS, O'Connell MT, Curzon G (1989). Hippocampal 5-HT synthesis and release in vivo is decreased by infusion of 8-OH-DPAT into the nucleus raphe dorsalis. *Neurosci. Lett* 100: 276-280.

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.

Innis RB, Aghajanian GK (1987). Pertussis toxin blocks 5-HT_{1A} and GABA_B receptor-mediated inhibition of serotonergic neurons. *Eur J Pharmacol* 143: 195-204.

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.

Kia HK, Miquel MC, Brisorgueil MJ, Daval G, Riad M, El Mestikawy S, *et al* (1996). Immunocytochemical localization of serotonin(1A) receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 365: 289-305.

Laviolette SR, Lipski WJ, Grace AA (2005). A subpopulation of neurons in the medial prefrontal cortex encodes emotional learning with burst and frequency codes through a dopamine D4 receptor-dependent basolateral amygdala input. *J Neurosci* 25: 6066-6075.

Lladó-Pelfort L, Assié MB, Newman-Tancredi A, Artigas F, Celada P (2010) Preferential *in vivo* action of F15599, a novel 5-HT_{1A} receptor agonist, at postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. In press

Lladó-Pelfort L., Santana N, Artigas F, Celada P (2009) GABAergic interneurons are involved in the excitatory action of 8-OH-DPAT on prefrontal cortex pyramidal neurons. Society for Neuroscience Meeting Planner 748.2/V10.

Martikainen, I. K., J. Hirvonen, Kajander J, Hagelberg N, Mansikka H, Någren K, Hietala J, Pertovaara A. (2007). Correlation of human cold pressor pain responses with 5-HT(1A) receptor binding in the brain. *Brain Res* 1172: 21-31.

Martinez D, Hwang D, Mawlawi O, Slifstein M, Kent J, Simpson N, *et al* (2001). Differential occupancy of somatodendritic and postsynaptic 5HT(1A) receptors by pindolol: a dose-occupancy study with [¹¹C]WAY 100635 and positron emission tomography in humans. *Neuropsychopharmacology* 24: 209-229.

McQuade R, Sharp T (1997). Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. *J Neurochem* 69: 791-796.

Meller E, Goldstein M, Bohmaker K. (1990). Receptor reserve for 5-hydroxytryptamine-mediated inhibition of serotonin synthesis: possible relationship to anxiolytic properties of 5-hydroxytryptamine agonists. *Mol. Pharmacol* 37: 231-237.

Mico JA, Berrocoso E, Ortega-Alvaro A, Gibert-Rahola J, Rojas-Corrales MO (2006) The role of 5-HT_{1A} receptors in research strategy for extensive pain treatment. *Curr Top Med Chem*. 6:1997-2003.

Millan, MJ, Colpaert, FC (1990). Attenuation of opioid induced antinociception by 5-HT_{1A} partial agonists in the rat. *Neuropharmacology* 29: 315–318.

Millan MJ (2000). Improving the treatment of schizophrenia: focus on serotonin 5-HT_{1A} receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 295: 853-861.

Newman-Tancredi A, Conte C, Chaput C, Verrièle L, Audinot-Bouchez V, Lochon S, Lavielle G, Millan MJ (1997). Agonist activity of antimigraine drugs at recombinant human 5-HT_{1A} receptors: potential implications for prophylactic and acute therapy. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355(6):682-8.

Newman-Tancredi A, Martel JC, Assié MB, Buritova J, Laressergues E, Cosi C, *et al* (2009). Signal transduction and functional selectivity of F15599, a preferential post-synaptic 5-HT receptor agonist. *Br J Pharmacol* 156: 338-353.

Paxinos G, Watson C (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press: Sydney.

Pazos A, Palacios JM (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 346: 205-230.

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 12: 440-453.

Puig MV, Artigas F, Celada P (2005). Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: Involvement of serotonin and GABA. *Cereb Cortex* 15: 1-14.

Puig MV, Celada P, Diaz-Mataix L, Artigas F (2003). In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT_{2A} receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cereb Cortex* 13, 870-882.

Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, *et al* (2000). Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417: 181-194.

Romero L, Celada P, Martín-Ruiz R, Díaz-Mataix L, Mourelle M, Delgado J, *et al* (2003). Modulation of serotonergic function in rat brain by VN2222, a serotonin reuptake inhibitor and 5-HT_{1A} receptor agonist. *Neuropsychopharmacology* 28:445-56.

Rueter LE, Blier P (1999). Electrophysiological examination of the effects of sustained flibanserin administration on serotonin receptors in rat brain. *Br J Pharmacol* 126: 627-38.

Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F (2004). Expression of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14: 1100-1109.

Sprouse JS, Aghajanian GK (1987). Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse* 1: 3-9.

Sprouse JS, Aghajanian GK (1988). Responses of hippocampal pyramidal cells to putative serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists: a comparative study with dorsal raphe neurons. *Neuropharmacology* 27(7):707-15.

Tanaka E, North RA (1993). Actions of 5-hydroxytryptamine on neurons of the rat cingulate cortex. *J Neurophysiol* 69(5):1749-57.

Vacher B, Bonnaud B, Funes P, Jubault N, Koek W, Assié MB, Cosi C, Kleven M. (1999) Novel derivatives of 2-pyridinemethylamine as selective, potent, and orally active agonists at 5-HT_{1A} receptors. *J Med Chem.* 42:1648-60.

Valdizán EM, Castro E, Pazos A. (2009) Agonist-dependent modulation of G-protein coupling and transduction of 5-HT_{1A} receptors in rat dorsal raphe nucleus. *Int J Neuropsychopharmacol* 9:1-9.

Wang RY, Aghajanian GK (1977) Antidromically identified serotonergic neurons in the rat midbrain raphe: evidence for collateral inhibition. *Brain Res.* 132, 186-193.

Xu XJ, Colpaert F, Wiesenfeld-Hallin Z (2003). Opioid hyperalgesia and tolerance versus 5-HT_{1A} receptor-mediated inverse tolerance. *Trends Pharmacol Sci.* 24(12):634-9. Review.

TREBALL 4

Efecte de diferents agonistes 5-HT_{1A} sobre les oscil·lacions de baixa freqüència de l'EPFm de rata

Resum

Antecedents i objectiu: L'activitat oscil·latòria és un tret fonamental de la dinàmica cortical i ha mostrat estar alterada en pacients esquizofrènics. Entre les diferents oscil·lacions corticals, prenen especial importància les ones de baixa freqüència per ser el mecanisme que coordina tant les ones d'altres freqüències com l'activitat entre diferents àrees cerebrals. Fàrmacs emprats com a models farmacològics d'esquizofrènia suprimeixen les oscil·lacions de baixa freqüència en animals d'experimentació. L'agonisme pel receptor 5-HT_{1A} és un mecanisme comú en els fàrmacs antipsicòtics atípics i els fàrmacs d'última generació però poc se sap dels efectes de l'agonisme 5-HT_{1A} sobre la dinàmica cortical. En aquest treball hem examinat els efectes de diferents agonistes 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT, F13640 i F15599) sobre les oscil·lacions de baixa freqüència i hem caracteritzat els mecanismes pels quals l'agonista 5-HT_{1A} 8-OH-DPAT produeix els seus efectes.

Aproximació experimental: Registres electrofisiològics de potencial de camp *in vivo* en rata anestesiada amb hidrat de cloral. Anàlisi de l'oscil·lació de 0.3 a 4 Hz.

Resultats clau: Els diferents agonistes 5-HT_{1A} testats produeixen efectes diferents en l'oscil·lació cortical de baixa freqüència. La (±)8-OH-DPAT i la R(+)-8-OH-DPAT causen disminucions de la potència d'aquesta ona a dosis baixes i dosis més altes d'aquests fàrmacs recuperen l'oscil·lació. L'F13640 produeix una disminució dosi-depenent de la potència de l'ona de 0.3 a 4 Hz. L'F15599 no té efectes sobre l'oscil·lació de baixa freqüència a EPFm. La inhibició de la síntesi de serotonina no té efectes sobre el patró bifàsic produït per la 8-OH-DPAT. El bloqueig local del receptor GABA_A amb bicuculina però no amb gabazina evita els efectes de la 8-OH-DPAT sobre les ones de baixa freqüència d'EPF.

Conclusions i implicacions: Els diferents efectes dels agonistes 5-HT_{1A} sobre l'activitat oscil·latòria cortical podrien estar relacionats amb les diferències en els patrons de resposta que aquests fàrmacs produeixen sobre l'activitat unitària de les neurones piramidals d'EPF. Així mateix el tràfic de receptor dirigit per agonista junt amb la diferent selectivitat regional podrien ser els responsables dels diferents dels diferents efectes. La prevenció dels efectes de la 8-OH-DPAT amb bicuculina implica les interneurons GABAèrgiques en els efectes de la 8-OH-DPAT sobre l'oscil·lació de baixa freqüència. El fet que l'F15599 no produeixi efectes sobre l'ona de 0.3 a 4 Hz però sigui capaç de modular l'activitat de les neurones piramidals

d'EPF és un tret diferencial que podria ser interessant per a les possibles aplicacions terapèutiques d'aquest fàrmac.

Effects of 5-HT_{1A} agonists on low frequency oscillations in rat medial prefrontal cortex

L. Lladó-Pelfort^{1,2}, F. Artigas^{1,2} and P. Celada^{1,2,3}

¹Department of Neurochemistry and Neuropharmacology

Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), IDIBAPS

²Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental (CIBERSAM)

*³Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036
Barcelona, Spain*

Abbreviated title: 5-HT_{1A} agonists and slow oscillations

7 figures, 0 tables; 26 pages

Abstract: 295 words; Introduction: 615 words; Discussion: 1060 words

Keywords:

Corresponding author: Pau Celada, PhD; Dept. of Neurochemistry, Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), IDIBAPS, Rosselló, 161, 6th floor, 08036 Barcelona, Spain. Phone: +3493-363 8314; Fax: +3493-363 8301; e-mail: pcpnqi@iibb.csic.es

Abstract

Oscillatory activity is a fundamental trait of cortical dynamics and is altered in schizophrenic patients. Among the different cortical oscillations, low frequency oscillations have special importance because they are the mechanism that coordinates oscillations of other frequencies and activity between different brain areas. 5-HT_{1A} agonism is a common mechanism in atypical antipsychotics and last generation drugs, but little is known about the effects of the 5-HT_{1A} agonism on cortical dynamics. Here we examine the effects of different 5-HT_{1A} agonists (8-OH-DPAT, F13640, F15599) on low frequency oscillations and we have characterized the mechanisms by which the prototypical 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT exerts its effects by recording local field potential in mPFC of anaesthetized rats and analyzing the 0.3-4 Hz oscillation.

Different 5-HT_{1A} agonists elicit differential effects on low frequency oscillatory activity. (±)8-OH-DPAT and (+)R-8-OH-DPAT decrease the power of 0.3-4 Hz oscillation at low doses, while higher doses recover this oscillation. F13640 induces a dose-dependant decrease and F15599 has no effects on the power of the low frequency oscillations. Inhibition of serotonin synthesis has no effects on 8-OH-DPAT-elicited effects. Local blockade of GABA_A receptors by bicuculline, but not by gabazine, prevents 8-OH-DPAT effects on low frequency oscillation.

The different effects of 5-HT_{1A} agonists on low frequency oscillations could be related to the different patterns of response that these drugs produce on single unit mPFC neuronal activity. Agonist directed trafficking and differential regional selectivity could be responsible of the different effects elicited by each drug. Prevention of 8-OH-DPAT-induced effects by bicuculline involves GABAergic interneurons on 8-OH-DPAT –elicited effects on low frequency oscillations. The fact that F15599 does not produce effects on 0.3-4 Hz wave but is able to modulate mPFC pyramidal neuron activity is a differential trait that might be interesting in future therapeutic applications of this drug.

Introduction

The prefrontal cortex (PFC) is involved in a large number of higher brain functions (cognition, behavioural control or attention, among others) (Fuster 1997; Miller and Cohen 2001) that are altered in diseases such as depression or schizophrenia (Elvevag et al. 2000). The presence of an oscillatory activity is a characteristic feature of cortical dynamics and its integrity appears to be necessary for the normal functioning of the brain (Buzsáki and Draguhn 2004; Buzsáki; 2006). Indeed, neural oscillations are associated with higher brain functions and they are altered in psychiatric diseases (Uhlhaas and Singer 2010).

Schizophrenia is a psychiatric disorder involving different brain areas and altered connectivity between them. This altered connectivity can be due to neurodevelopmental damage and can result in anatomical alterations (Harrison, 1999) that can translate into an altered coordinated activity in schizophrenic patients (Friston 1999; Stephan et al. 2009). The coordinated activity of neuronal ensembles is necessary in many brain processes. Brain oscillations and specially low frequency oscillations are a fundamental mechanism to allow the coordinated activity between different brain areas (Uhlhaas, et al. 2009). Indeed, boosting low frequency oscillations during sleep has proven beneficial for memory (Marshall et al., 2006).

Oscillatory activity is dependant on the integrity of neural circuits (Engel et al. 1991; Löwel and Singer 1992; Uhlhaas, et al. 2009). In schizophrenia there are reductions in grey matter (Shenton, et al. 2001) and white matter (Lim et al. 1999; Kubicki et al. 2007; Rotarska-Jagiela et al. 2008) as well as reduced neuropil (see Harrison, 1999 for review). These alterations may underlie the deficits coordination and poor performance of schizophrenic patients in tasks demanding a correct function of brain networks.

Several studies report abnormal low frequency oscillations in schizophrenic patients during sleep and rest (Hoffmann et al. 2000; for a review: Boutros et al. 2008). Alterations in low frequency oscillations could cause, among other effects, alterations in memory (Diekelman and Born 2010) and could be responsible of the aberrant perception in schizophrenia and the

inability to receive the internal feedback to distinguish self-generated and external facts (Feinberg 1978; Ford and Mathalon 2005).

Atypical antipsychotics have affinity for multiple neurotransmitter receptors, among them the D2, 5-HT_{2A} and 5-HT_{1A} (Bishara and Taylor 2008). Modulatory systems such as serotonin (5-HT) influence neuronal activity in many brain areas and are therefore capable of regulate cortical oscillations (Puig et al., 2010). Several lines of evidence suggest that 5-HT_{1A} agonist activity could be beneficial for the treatment of negative and cognitive symptomatology in schizophrenic patients by normalizing cortical dopamine levels (Rollema et al. 2000; Ichikawa et al. 2001; Diaz-Mataix et al. 2005; Bortolozzi et al. 2010). 5-HT_{1A} receptors are located a) at the soma and dendrites of serotonergic neurons, acting as autoreceptor, and b) in other brain areas such as the hippocampus or the mPFC, acting as heteroreceptors (Pompeiano et al. 1992). In the latter area, 5-HT_{1A} receptors are localized in 50-60% of all pyramidal neurons and ~20% of GABAergic interneurons (Santana et al., 2004), which places them in a key situation to control the connectivity between PFC and other cortical and subcortical structures.

Several previous studies have examined the cellular actions resulting from 5-HT_{1A} receptor stimulation by 5-HT or selective agonists (Andrade and Nicoll, 1987; Innis and Aghajanian, 1987; Araneda and Andrade, 1991; Hajós et al., 1999; Puig et al., 2005; Díaz-Mataix et al., 2006; Lladó-Pelfort et al., 2010). However, to our knowledge, the effect of 5-HT_{1A} receptor activation on cortical oscillations has not been studied so far. Here we examine the effects of different 5-HT_{1A} receptor agonists on the population activity in mPFC, using local field potential (LFP) recordings and we try to characterize the mechanism by which the prototypical 5-HT_{1A} agonist (8-OH-DPAT) exerts its effects.

Materials and methods

Animals

Male albino Wistar rats (250–320 g, Iffa Credo, Lyon, France) were kept in a controlled environment (12-hour light-dark cycle and 22 ± 2°C room

temperature) with food and water provided *ad libitum*. Animal care followed the European Union regulations (O.J. of E.C. L358/118/12/1986) and was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.

Drugs and Reagents

8-OH-DPAT (5-HT_{1A} agonist), R(+)-8-OH-DPAT (active isomer, 5-HT_{1A} agonist), WAY-100635 (5-HT_{1A} antagonist), gabazine (SR95531, GABA_A antagonist), bicuculline (GABA_A antagonist), nomifensine (norepinephrine-dopamine reuptake inhibitor) and 4-chloro-DL-phenylalanine methyl ester hydrochloride (PCPA, tryptophan hydroxylase inhibitor) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). F15599 (3-chloro-4-fluorophenyl-(4-fluoro-4-[(5-methyl-pyrimidin-2-ylmethyl)-amino]-methyl)-piperidin-1-yl)-methanone) tosylate salt and F13640 (3-Chloro-4-fluoro-phenyl)-[4-fluoro-4-[(5-methyl-pyridin-2-ylmethyl)-amino]-methyl]piperidin-1-yl]-methadone) were from Pierre Fabre Medicament. Concentrated stock solutions of WAY100635, 8-OH-DPAT, R(+)-8-OH-DPAT, F15599 and F13640 were prepared and aliquots were stored at -20°C. Working solutions were prepared daily by dilution with saline to inject i.v. (up to 1 ml/kg) through the femoral vein. Gabazine (20 mM in 0.2 M NaCl) and bicuculline (20mM in 1M NaCl) were prepared and stored at -20°C until the day of the experiment. They were used to fill the recording micropipette in specific experiments. Nomifensine was prepared at 2 mg/ml in saline and stored at -20°C. PCPA was prepared daily at 150 mg/ml. Doses are expressed as weight of free bases.

Electrophysiological recordings

We performed LFP recordings and single unit recordings of mPFC neurons projecting to the ventral tegmental area (VTA) in anesthetized animals (chloral hydrate 400 mg/kg i.p. followed by 50-70 mg/kg/h using a perfusion pump) to analyze the responses elicited by the systemic administration of 8-OH-DPAT (0.75-98 µg / kg i.v. cumulative doses), R(+)-8-OH-DPAT (0.37-49 µg / kg i.v. cumulative doses), F13640 (0.2-8.2 µg / kg i.v. cumulative doses) or F15599 (0.2- 18.2 µg / kg i.v. cumulative doses). The specificity of the responses was evaluated by the administration of WAY100635 at the dose of 50-100 µg/kg i.v. to reverse the effects.

Descents were carried out at anteroposterior +3.2 to +3.4 mm, lateral -0.5 to -1 mm, dorsoventral -1 to -4 mm below the brain surface. Only one recording per rat was performed. Recording electrodes were filled with 2M NaCl and, in some cases, with Pontamine sky blue in 2M NaCl to verify the recording site. Brain sections were stained with neutral red, according to standard procedures.

The involvement of 5-HT_{1A} autoreceptors was tested in serotonin depleted rats. In order to protect catecholamine neurons nomifensine was injected i.p. at 10 mg/kg one hour before the treatment with 300 mg/kg i.p. PCPA. LFP recordings were carried out 48-96 hours after the treatment as in the control groups. As described by Adell et al., 1989, homogenizing the mPFC and analyzing the samples in HPLC for the detection of neurotransmitters and metabolites assessed depletion verification.

The involvement of GABA_A inputs was tested by locally applying GABA_A antagonists (gabazine or bicuculline) passively through the recording micropipette as described by Steward et al. (1990) and Tepper et al. (1997). Recordings and systemic drug administration were carried out as in the control group. Recordings were essentially performed as described in Kargieman et al. 2007. Briefly, the signal was amplified with a Neurodata IR283 (Cygnus Technology, Delaware Water Gap, Pennsylvania), postamplified (X 100) and filtered (30 Hz-1 kHz or 0.3-100 Hz for single unit or LFP, respectively) with a Cibertec amplifier (Madrid, Spain) and computed online (ADC rate 100 kHz) using a DAT 1401plus interface system Spike2 software (CED, Cambridge, United Kingdom). mPFC pyramidal neurons were identified by antidromic stimulation from the VTA (AP -5.8, L -0.4, DV -8.2) and collision test.

In vivo microdialysis

Microdialysis procedures in rats were conducted essentially as previously described in Amargós-Bosch et al., (2004). Anesthetized rats (sodium pentobarbital, 60 mg/kg i.p.) were stereotaxically implanted with concentric microdialysis probes equipped with a Cuprophan membrane (4 mm long) at the following coordinates (in mm) mPFC: AP +3.2, L -0.8, DV -6.0. Experiments were performed in chloral hydrate anesthetized rats, to mimic

exactly the conditions of electrophysiological recordings, at least 20h after the surgery. Probes were perfused at 3 μ l/min with aCSF containing 10 μ M of citalopram. After 100-min stabilization period, dialyzed samples were collected every 4 min. 8-OH-DPAT and WAY100635 were injected i.v. at the same doses than the control electrophysiological experiments. The concentration of 5HT in dialyzed samples was determined by HPLC with amperometric detection as described by Lopez-Gil et al., 2007.

Data and statistical analysis

Values were quantified over 1 min in the baseline condition and after drug administration. Power spectra were constructed using Fast Fourier Transforms (FFT) of 1-min signal intervals (artefact-free epochs) corresponding to baseline and drug administration time periods with a resolution of 0.3 Hz (FFT size of 8192). The effects of 8-OH-DPAT, R(+)-8-OH-DPAT, F13640 and F15599 were assessed by one-way repeated measures ANOVA. Comparisons between groups were assessed by two-way ANOVA. Data are expressed as % of baseline \pm SEM. Statistical significance has been set at the 95% confidence level (two tailed).

Results

Effects of 8-OH-DPAT on low frequency oscillations

8-OH-DPAT produced a biphasic dose-response curve on the power of the 0.3-4 Hz wave on mPFC LFP, with the higher loss in synchrony at the dose of 7.5 μ g / kg i.v. and a complete recovering at the dose of 60 μ g / kg i.v. (n = 23; ANOVA F(4,88) = 13.21, p < 0.0001) (Fig1). The more active enantiomer (+)-8-OH-DPAT had a similar biphasic dose-response in the 0.3-4 Hz oscillation (n = 8; ANOVA F(4,44) = 12.90, p < 0.00001).

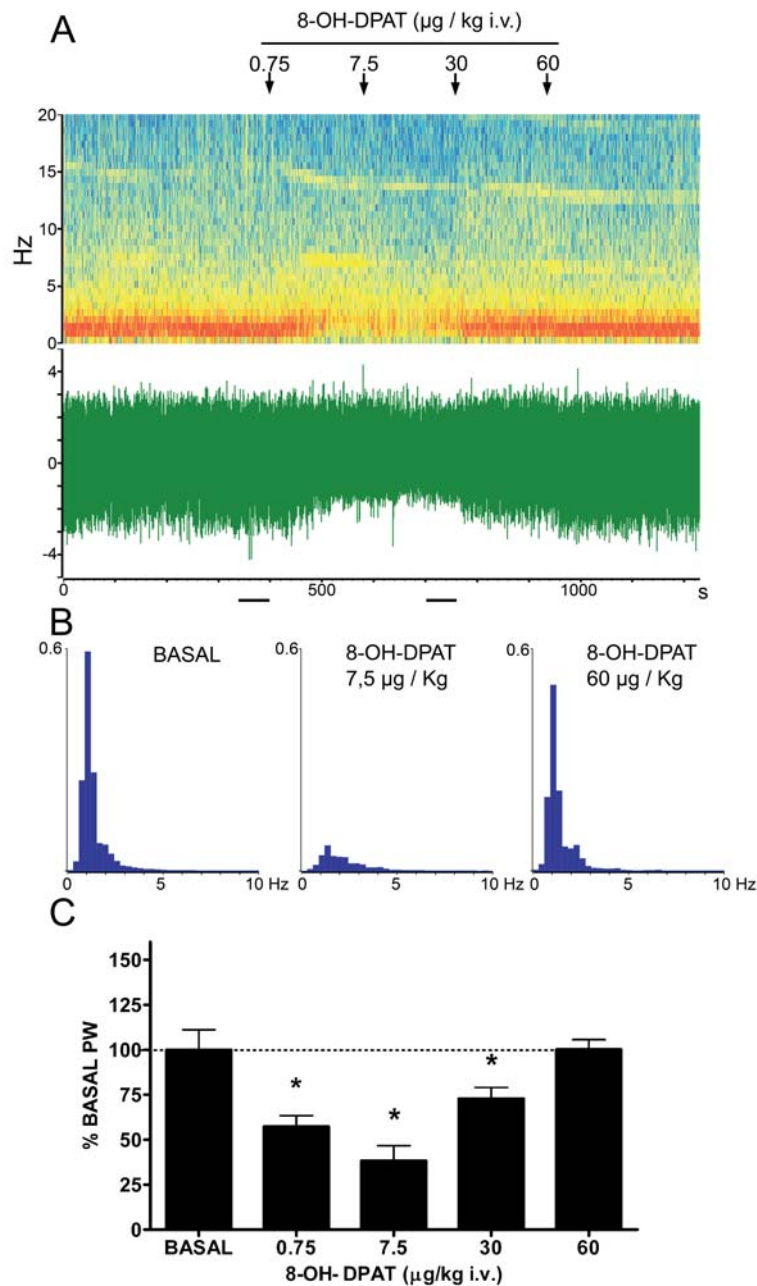


Figure 1. Effects on mPFC 0.3-4 Hz oscillation after the systemic administration of the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT. **A)** Spectrogram showing the effects of the administration of 8-OH-DPAT on low frequency oscillations recorded in mPFC (red = high intensity; blue = low intensity). **B)** The power spectra of the above recordings (1 min periods are shown in the abscissa) during basal conditions and after 8-OH-DPAT administration. Note the marked reduction in the power spectrum induced by 7.5 $\mu\text{g} / \text{kg}$ 8-OH-DPAT (second arrow) and the reversal produced by higher doses of 8-OH-DPAT. **C)** Bar histogram showing the effect of 8-OH-DPAT on 0.3-4 Hz local field potentials power. * $p < 0.02$ vs. basal ; Newman-Keuls test post-ANOVA.

Effect of F13640 on low frequency oscillations

F13640 produced a dose-dependant decrease on the power of the mPFC LFP 0.3-4 Hz band ($F_{4,20} = 5.56$; $p < 0.004$; $n = 6$) (Fig. 2). The administration of the 5-HT_{1A} antagonist WAY 100635 reversed this effect ($F_{2,8} = 14.58$; $p < 0.003$; $n = 5$) (Fig. 3).

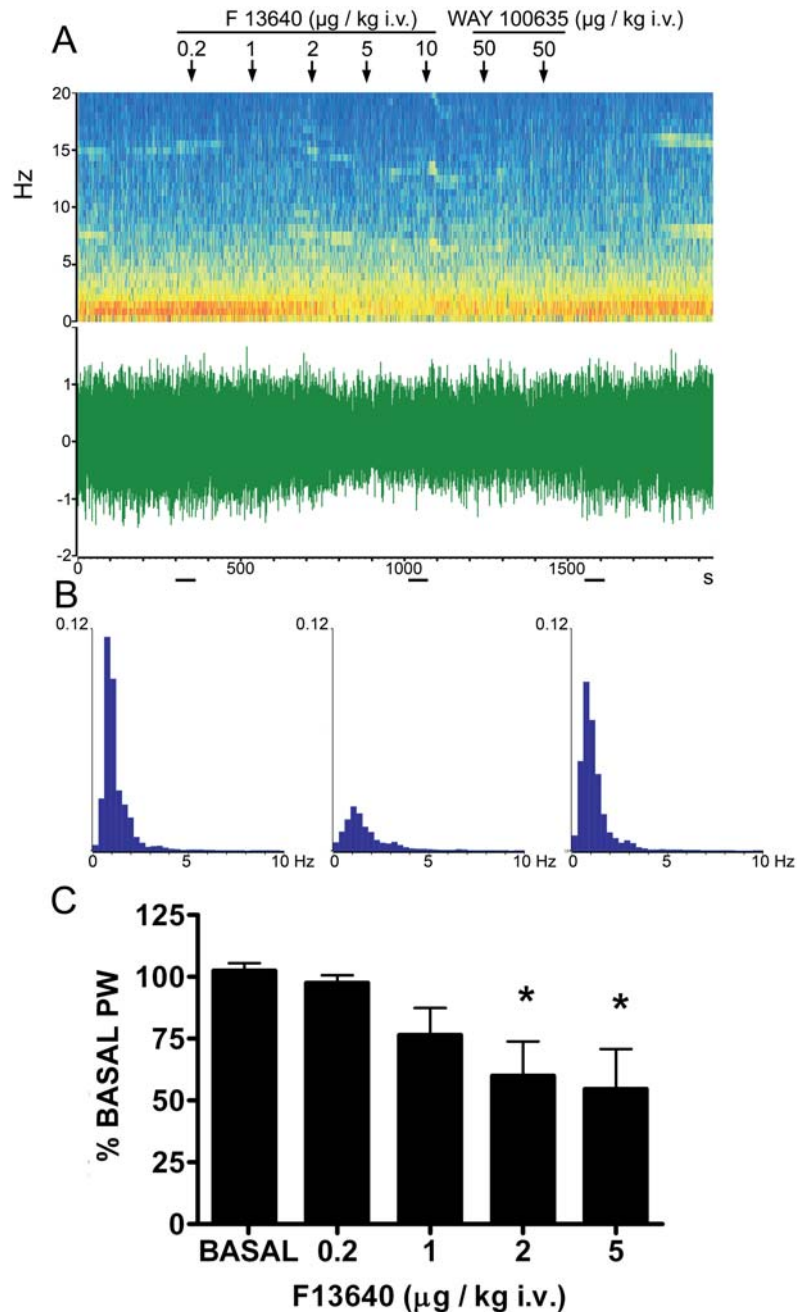


Figure 2. Effects on mPFC 0.3-4 Hz oscillation after the systemic administration of the 5-HT_{1A} agonist F13640. **A)** Spectrogram showing the effects of the administration of F13640 on low frequency oscillations recorded in mPFC (red = high intensity; blue = low intensity). **B)** The power spectra of the above recordings (1 min periods are shown in the abscissa) during basal

conditions and after F13640 and F13640 plus WAY100635 administration. Note the reduction in the power spectrum induced by F13640 (middle power spectrum) and the reversal produced by the 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 (right power spectrum). **C)** Bar graph showing the dose-dependent decrease in the 0.3-4 Hz power of the mPFC LFP (n = 6) after the systemic administration of the 5-HT_{1A} agonist F13640. * p < 0.02 vs. baseline; Newman-Keuls test post-ANOVA.

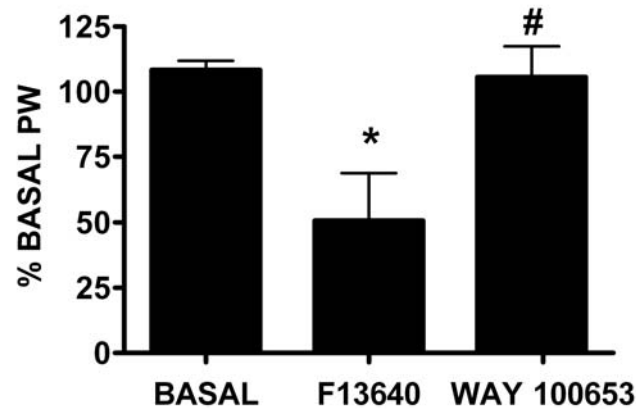


Figure 3. Bar graph showing the reversal of the F13640-induced decrease in the power of the 0.3-4 Hz band of the mPFC LFP by the subsequent administration of WAY 100635 (n = 5). * p < 0.004 vs. baseline; # p < 0.003 vs. maximal effect of F13640; Newman-Keuls test post-ANOVA.

Effect of F15599 on slow cortical oscillations

The administration of F15599 did not alter the power of low frequency cortical oscillations (0.3-4 Hz) in the whole dose range examined (0.2-18.2 µg/kg i.v.) (n.s., one-way ANOVA) (Fig. 4). Spikes were discharged in synchrony with active phases of local field potential under baseline conditions and after F15599 administration. This occurred when spikes were fired as single events or as spike trains (not shown) (Fig. 5).

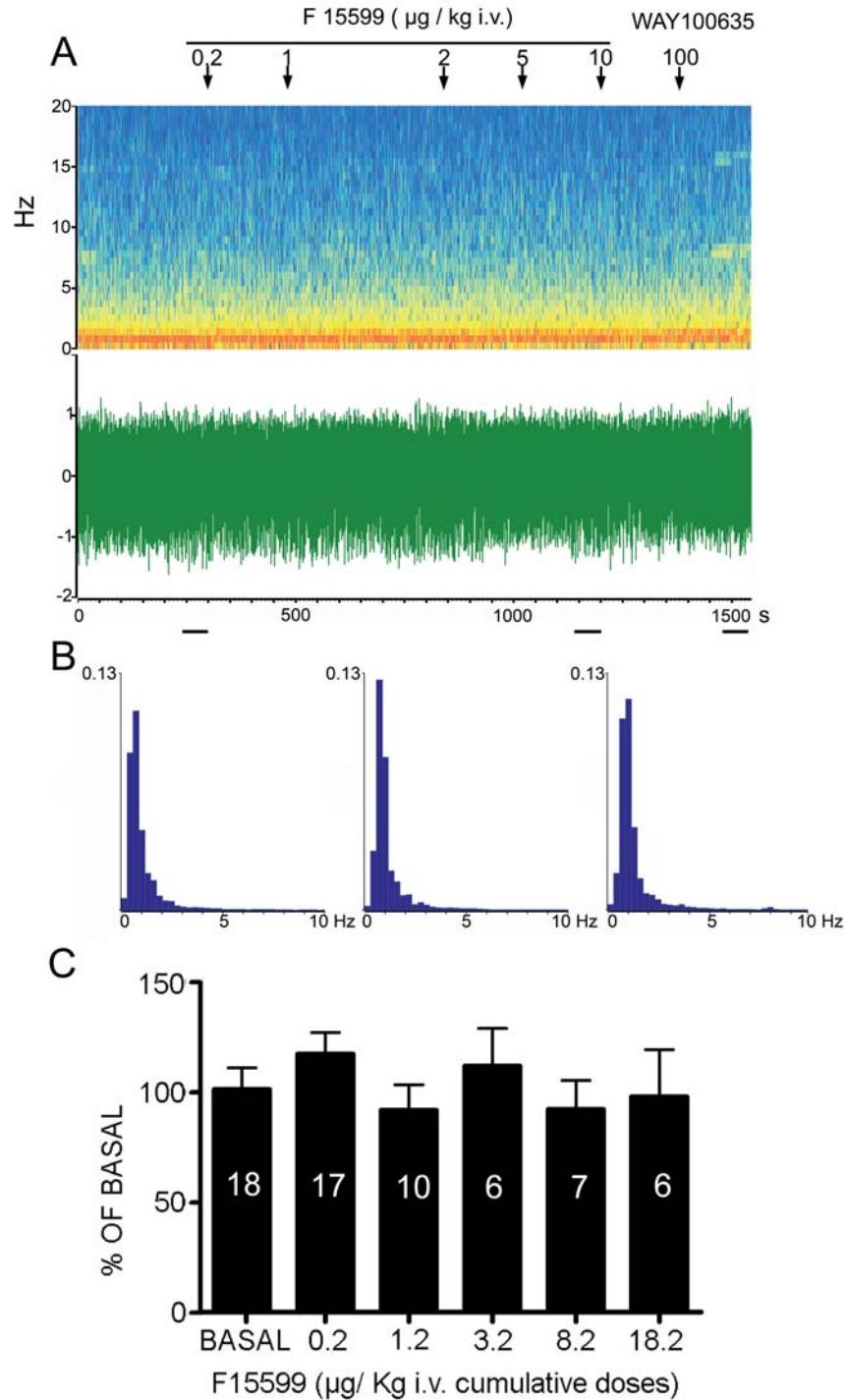


Figure 4. Effects on mPFC 0.3-4 Hz oscillation after the systemic administration of the 5-HT_{1A} agonist F15599. **A)** Spectrogram showing the effects of the administration of F15599 on low frequency oscillations recorded in mPFC (red =high intensity; blue = low intensity). **B)** The power spectra of the above recordings (1 min periods are shown in the abscissa) during basal conditions and after F15599 and F15599 plus WAY100635 administration. Note the lack of significant effect on the low-frequency oscillations by F15599. **C)** Bar graph showing the power of the 0.3-4 Hz oscillation recorded in basal conditions and after all doses of F15599. Numbers in the bars correspond to the number of recordings (one per rat) at each F15599 dose.

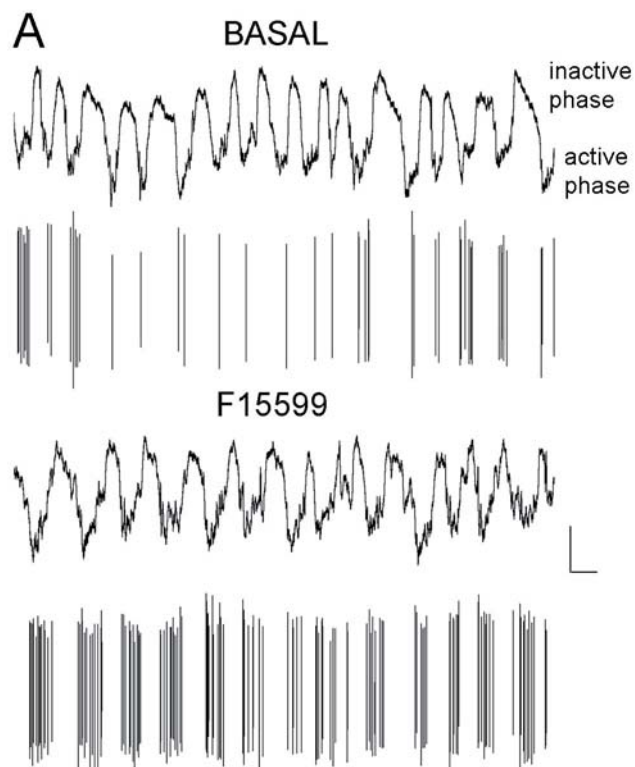


Figure 5. Synchronization of the pyramidal discharge (spikes are vertical lines below slow oscillation recordings) with active phases of the local field potentials in basal conditions and after the administration of F15599. Note the temporal coincidence (time in abscissa) between the active phase of LFP and discharged spikes. Discharge rate was 1.9 spikes/s in basal conditions and 7.2 spikes/s after the administration of F15599 (18.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.). The percentage of spikes discharged in bursts was 53% in basal conditions and 57% after F15599 administration. Scale bar: abscissa 1 s, ordinate 1 mV.

Characterization of the effects produced by 8-OH-DPAT

To better understand the mechanisms by which 5-HT_{1A} agonists can modify slow oscillations in mPFC, we carried out further studies with the prototypical 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT.

Previous observations using microiontophoretic application of 5-HT_{1A} receptor agonists indicated a preferential sensitivity of 5-HT_{1A} located on DR serotonergic neurons compared with those in the hippocampal formation (Sprouse and Aghajanian, 1988). We therefore tested whether the effect of 8-OH-DPAT on mPFC slow oscillations could be due to the loss of the

serotonergic tone on other 5-HT receptors. To this end, we performed two different sets of experiments. In one of them, we examined the effect of increasing doses of 8-OH-DPAT on 5-HT release in mPFC using exactly the same experimental conditions than in electrophysiological recordings, (i.e., i.v. drug administration, chloral hydrate anesthetized rats) together with a high flow rate and short collection time to quickly estimate drug effects on 5-HT output. In the second set of experiments, we examined the effect of 8-OH-DPAT in rats depleted of 5-HT with the 5-HT synthesis inhibitor pCPA, under the working hypothesis that, should 8-OH-DPAT-mediated effect on slow oscillations be due to a removal of the 5-HT tone on other 5-HT receptors, this effect would disappear in animals depleted of 5-HT.

Microdialysis experiments showed that the decrease in power of the 0.3-4 Hz wave of mPFC LFP was parallel to a reduction of 5-HT release in the dose range 0-7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v. (Fig. 6A). However, higher 8-OH-DPAT doses (up to 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.) further reduced 5-HT release while recovering the power of slow oscillations (Fig. 6A).

In rats depleted of 5-HT with pCPA, 8-OH-DPAT exerted a similar biphasic effect than in control rats (Fig. 6B). Two-way ANOVA revealed a non-significant effect of PCPA pretreatment on slow oscillations in mPFC (control n = 23, PCPA n = 8; $F(4,116)=1.88$, n.s.).

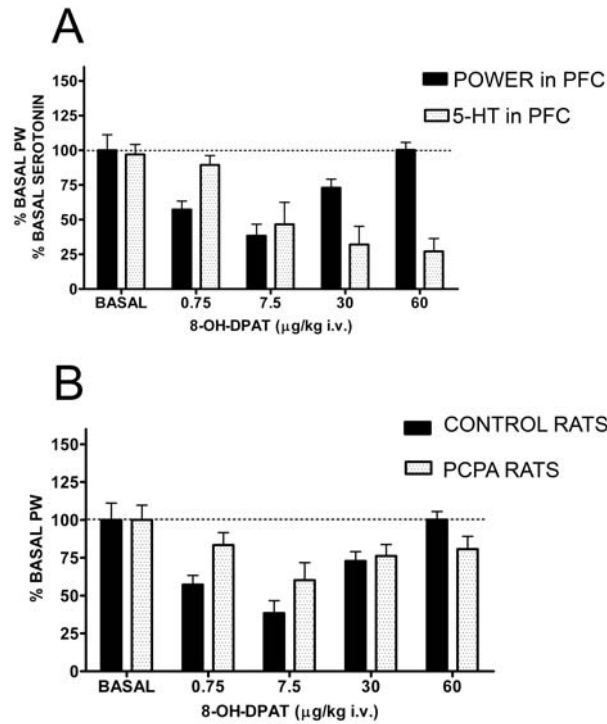


Figure 6 A) Effect of 8-OH-DPAT on the 5-HT release in mPFC and on slow oscillation (0.3-4 Hz) in the same area. There was a parallel reduction of both variables at low 8-OH-DPAT doses (up to 7.5 µg/kg i.v.) yet higher doses exerted opposite effects, with additional reductions in 5-HT release and recovery of the slow oscillation up to pretreatment levels. **B)** The pretreatment of the rats with the tryptophan hydroxylase inhibitor pCPA did not prevent the effects on the mPFC 0.3-4Hz oscillations, indicating that the effect of 8-OH-DAPT is not due to the removal of a 5-HT tone on non-5-HT_{1A} serotonergic receptors.

Since 5-HT_{1A} receptors are expressed by both pyramidal and GABAergic neurons in mPFC (Santana et al., 2004), we next explored the effect of 8-OH-DPAT after blocking the GABA_A inputs onto pyramidal neurons. The local blockade of the GABA_A receptors with gabazine did not affect the changes in the mPFC low frequency oscillations produced by 8-OH-DPAT (control n = 23, gabazine n = 12; Two-way ANOVA, $F(4,132)=2.3$, n.s.) (Fig. 7A), whereas the local blockade of GABA_A inputs with bicuculline prevented the desynchronization seen in the control group (control n = 23, bicuculline n = 16; Two-way ANOVA, $F(4,148) = 5.37$, $p < 0.001$) (Fig. 7B).

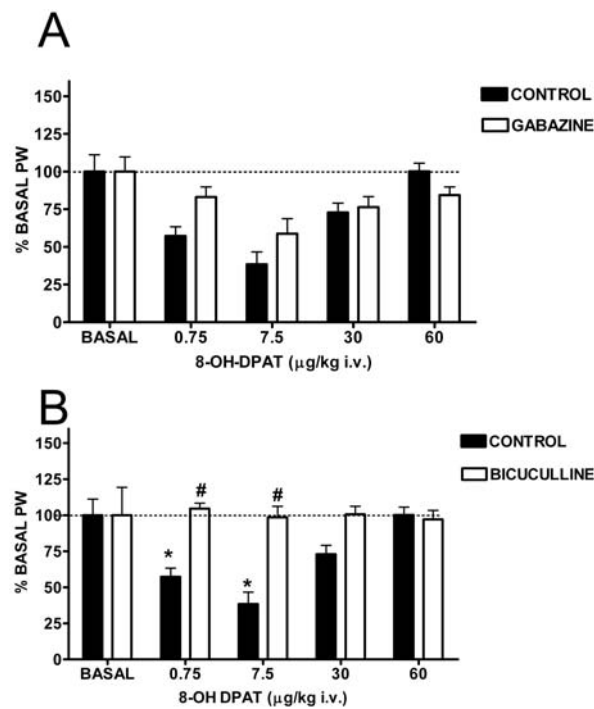


Figure 7. A) Local blockade of GABA_A inputs with gabazine did not have any effect on the biphasic dose-response curve elicited by 8-OH-DPAT on mPFC low frequency oscillations. **B)** Local application of bicuculline completely prevented the biphasic dose-response induced by 8-OH-DPAT administration on the 0.3-4 Hz oscillation. * $p < 0.01$ vs. basal; # $p < 0.01$ vs. control.

Discussion

The present results show that 5-HT_{1A} receptor agonists can produce dissimilar effects on mPFC low frequency oscillations (0.3-4Hz), i.e., a) biphasic dose-response relationship after the administration of 8-OH-DPAT, b) dose-dependant decrease with F13640, and c) no alteration with F15599. The decrease in the power of low frequency oscillations induced by low doses of 8-OH-DPAT was only prevented by the local infusion of bicuculline but not by local infusion of gabazine or depletion of 5-HT, indicating that the effect was mediated exclusively by postsynaptic 5-HT_{1A} receptors.

Slow oscillations, which are the predominant wave in chloral hydrate anaesthetized animals, are experimental correlates of slow waves during sleep in humans (Steriade et al. 1993). Some studies have shown that slow wave oscillations are generated, at least in part (Sanchez-Vives and

198

McCormick 2000; Crunelli and Hughes 2010), by an intrinsic cortical mechanisms dependant on the activity of cortical neurons. These slow oscillations are the population correlate of the cellular changes between depolarized (UP) and hyperpolarized states (DOWN) (Steriade et al. 1993). Thus, the up-down changes of neuronal ensembles occur with a temporal coincidence which is reflected by the slow oscillation. A loss of synchrony in this temporal association is reflected by a loss of the power of the 0.3-4 Hz wave in the power spectrum.

Therefore, alterations of slow oscillations induced by 5-HT_{1A} agonists may reflect the changes in the activity of pyramidal and GABAergic neurons in mPFC. Indeed, the effects of the different 5-HT_{1A} agonists at network level parallel those at the cellular level. Thus, 8-OH-DPAT altered the firing rate of pyramidal neurons with a maximal increase at 7.5 µg/kg i.v. and further decrease at higher doses (Lladó-Pelfort et al., 2009 and unpublished observations). This is exactly a mirror image of the effect of the same doses of 8-OH-DPAT on slow oscillations.

On the other hand, F13640 induced dose-dependant increases in mPFC firing rate (Lladó-Pelfort, unpublished observations) which are paralleled by the reduction in the power of slow oscillations.

Unlike the two previous agents, F15599 did not affect slow oscillations in the whole dose range examined despite having marked actions on the discharge of pyramidal neurons at very low doses (Lladó-Pelfort et al. 2010).

The differences in the effects elicited by the three 5-HT_{1A} agonists may be perhaps accounted for by a different selectivity for auto- and heteroreceptors as well as differences in the signalling mechanisms activated. Thus, whereas 8-OH-DPAT and F13640 seem to be equally efficacious on somatodendritic autoreceptors and postsynaptic heteroreceptors or show a preferential autoreceptor action in the case of 8-OH-DPAT (Sprouse and Aghajanian, 1988), F15599 appears to exert a preferentially heteroreceptor action (Lladó-Pelfort et al., 2010). However, a preferential autoreceptor selectivity does not seem to account in the effect of 8-OH-DPAT and F13640 on slow oscillations, since i) the pretreatment of the animals with the 5-HT

synthesis inhibitor pCPA does not prevent the effects on 0.3-4 Hz wave; and ii) F13640 has a similar activity at auto- and heteroreceptors.

Another possible explanation would be the presence of agonist-directed trafficking for 5-HT_{1A} receptors, as it has been shown for different 5-HT_{1A} receptor agonists in the raphe (Valdizán et al., 2009). Hence, F15599 is coupled to a variety of signalling mechanisms (Newman-Tancredi et al., 2009), whereas such information is lacking for F13640. These issues remain to be further clarified.

The bicuculline prevention of the 8-OH-DPAT-induced decrease in slow oscillations is a striking result considering the local character of the drug application. However, the existence of large networks of GABAergic neurons connected via electrical synapses (Hestrin and Galarreta, 2005) may amplify and spread the effect of GABA_A blockade in the vicinity of the recording electrode. Alternatively bicuculline prevention of the 8-OH-DPAT-induced decrease on slow oscillations could be exclusively due to a local effect around the recording electrode, where bicuculline is leaking (Okun et al. 2010).

The prevention of the 8-OH-DPAT-elicited effects on mPFC slow oscillations by bicuculline but not by gabazine may be related to the different mechanisms of action of both groups. Although they are both generally considered to be GABA_A competitive antagonists (Hamann et al. 1997; Ueno et al. 1997) they differ in their pharmacological profiles. Hence, bicuculline inhibits currents induced by both GABA and pentobarbital whereas gabazine does not block the latter currents (Uchida et al. 1996). Moreover, both drugs differ for their preferential binding sites: gabazine selectively binds to low affinity GABA_A receptors, coincident with the benzodiazepine₂ site, whereas bicuculline preferentially binds to high affinity sites, coincident with muscimol site (Olsen et al. 1990). Furthermore, a tonic and persistent GABA-induced current, independent from conventional synaptic transmission and sensitive to bicuculline but not to gabazine has been reported (Salin et al. 1996; Bai et al. 2001). These differences could account for the differential effects of the local application of the drugs on mPFC low frequency oscillations. Finally, a higher diffusion of bicuculline to the surrounding tissue, thus affecting a higher neuronal population cannot be discarded.

The physiological effects of the changes in slow oscillations induced by these 5-HT_{1A} agonists are unclear. Thus, agents with marked psychotomimetic activity such as the non-competitive NMDA receptor antagonist phencyclidine (used as pharmacological model of schizophrenia) and the 5-HT_{2A/2C} receptor agonist DOI induce a marked suppression of slow oscillations in mPFC (Kargieman et al., 2007; Celada et al., 2008) while markedly increasing the firing of pyramidal neurons, an effect that may be related to their hallucinatory properties. Interestingly, both effects are reversed by classical (haloperidol) and atypical (clozapine) antipsychotic drugs, which suggests a potential link with an abnormal mPFC function in schizophrenia. EEG studies in schizophrenic patients have reported both increases (Boutros et al. 2008) and decreases (Rutter et al. 2009) in the power of slow oscillations in schizophrenic patients, a difference that may be accounted for by many factors including the medications taken by schizophrenic patients and the predominance of positive or negative symptoms. It is also interesting to note that the two compounds (F15599 and F13640) that can be administered to humans (unlike 8-OH-DPAT) are those with no activity on slow oscillations (F15599) or activity at high doses (F13640), perhaps reflecting the absence of cortically-dependent side effects (e.g., somnolence, disturbed memory, etc.) unrelated to their mechanism of action. Given the modulation of the activity of mPFC neurons by F15599 (Lladó-Pelfort et al. 2010) and its lack of effect on slow oscillations makes it an interesting agent to facilitate the activity of mPFC neurons without disrupting the cortical coordination.

Acknowledgements

Work supported by grants SAF 2007-62378, FIS PI060264, FIS PI09/1245 and Pierre Fabre Médicament. L.L-P is supported by a JAE fellowship from CSIC. P.C. is supported by the Researcher Stabilization Program of the Health Department of the Generalitat de Catalunya. We thank Mónica Gutiérrez, Noemí Jurado and Verónica Paz for skilful technical assistance.

References

Adell A, Sarna GS, Hutson PH, Curzon G. (1989) An in vivo dialysis and behavioural study of the release of 5-HT by p-chloroamphetamine in reserpine-treated rats. *Br J Pharmacol.* 97:206-212.

Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G, Artigas F (2004) Co-expression and in vivo interaction of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14: 281-299.

Andrade, R. and Nicoll, R.A. (1987) Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurons of the rat hippocampus recorded in vitro. *J. Physiol.* 394, 99-124.

Araneda, R. and Andrade, R. (1991) 5-Hydroxytryptamine-2 and 5-hydroxytryptamine-1A receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* 40, 399-412.

Bai D, Zhu G, Pennefather P, Jackson MF, MacDonald JF, Orser BA. (2001) Distinct functional and pharmacological properties of tonic and quantal inhibitory postsynaptic currents mediated by gamma-aminobutyric acid(A) receptors in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol.*59:814-824.

Bishara D, Taylor D. (2008) Upcoming agents for the treatment of schizophrenia: mechanism of action, efficacy and tolerability. *Drugs* 68:2269-292.

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.* 99:225-237. Review.

Buzsáki G, Draguhn A. (2004) Neuronal oscillations in cortical networks. *Science*. 304:1926-1929.

Buzsáki G. (2006) *Rhythms of the brain*. Oxford University Press, New York.

Celada P, Puig MV, Díaz-Mataix L, Artigas F. (2008) The hallucinogen DOI reduces low-frequency oscillations in rat prefrontal cortex: reversal by antipsychotic drugs. *Biol Psychiatry*. 64:392-400.

Crunelli V, Hughes SW. (2010) The slow (<1 Hz) rhythm of non-REM sleep: a dialogue between three cardinal oscillators. *Nat Neurosci*. 13:9-17. Review.

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.

Díaz-Mataix L, Artigas F, Celada P (2006) Activation of pyramidal cells in rat medial prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area by a 5-HT_{1A} receptor agonist. *Eur Neuropsychopharmacol*. 16:288-296.

Diekelmann S, Born J. (2010) The memory function of sleep. *Nat Rev Neurosci* 11:114-126.

Elvevag B, Goldberg TE (2000) Cognitive impairment in schizophrenia is the core of the disorder. *Crit Rev Neurobiol* 14:1–21.

Engel A, König P, Kreiter A, Singer W. (1991) Interhemispheric synchronization of oscillatory neuronal responses in cat visual cortex. *Science* 252:1177-1179.

Feinberg I. (1978) Efference copy and corollary discharge: implications for thinking and its disorders. *Schizophr Bull*. 4:636-640.

Ford JM, Mathalon DH. (2005) Corollary discharge dysfunction in schizophrenia: can it explain auditory hallucinations? *Int J Psychophysiol*. 58:179-189. Review.

Friston KJ. (1999) Schizophrenia and the disconnection hypothesis. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 395:68-79. Review.

Fuster JM (1997) *The Prefrontal Cortex. Anatomy, Physiology and Neuropsychology of the Frontal Lobe.* New York: Lippincott-Raven.

Hajós M, Hajos-Korcsok E, Sharp T (1999) Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT_{1A} receptor- induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Br J Pharmacol* 126:1741–1750.

Hamann M, Desarmenien M, Desaulles E, Bader MF, Feltz P. (1997) Quantitative evaluation of the properties of a pyridazinyl GABA derivative (SR 95531) as a GABA_A competitive antagonist. An electrophysiological approach. *J Neurosci.* 17(2):625-34.

Harrison PJ (1999): The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 122:593– 624.

Hestrin S, Galarreta M (2005) Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons. *Trends Neurosci.* 28:304-9. Review.

Hoffmann R, Hendrickse W, Rush AJ, Armitage R. (2000) Slow-wave activity during non-REM sleep in men with schizophrenia and major depressive disorders. *Psychiatry Res.* 95:215-225.

Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, Fowler WL, O'Laughlin IA, Meltzer HY. (2001) 5-HT_{2A} and D₂ receptor blockade increases cortical DA release via 5-HT_{1A} receptor activation: a possible mechanism of atypical antipsychotic-induced cortical dopamine release. *J Neurochem.* 76:1521-31.

Innis, R.B. and Aghajanian, G.K. (1987) Pertussis toxin blocks 5-HT_{1A} and GABA_B receptor-mediated inhibition of serotonergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 143, 195-204.

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.

Kubicki M, McCarley R, Westin CF, Park HJ, Maier S, Kikinis R, Jolesz FA, Shenton ME. (2007) A review of diffusion tensor imaging studies in schizophrenia. *J Psychiatr Res.* 41:15-30. Review

Lim KO, Hedehus M, Moseley M, de Crespigny A, Sullivan EV, Pfefferbaum A. (1999) Compromised white matter tract integrity in schizophrenia inferred from diffusion tensor imaging. *Arch Gen Psychiatry.* 56:367-374.

Lladó-Pelfort L, Assié MB, Newman-Tancredi A, Artigas F, Celada P (2010) Preferential *in vivo* action of F15599, a novel 5-HT_{1A} receptor agonist, at postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. In press

Lladó-Pelfort L., Santana N, Artigas F, Celada P (2009) GABAergic interneurons are involved in the excitatory action of 8-OH-DPAT on prefrontal cortex pyramidal neurons. *Society for Neuroscience Meeting Planner* 748.2/V10

Lopez-Gil X, Babot Z, Amargós-Bosch M, Suñol C, Adell A (2007) Clozapine and haloperidol differently suppress the MK-801-increased glutamatergic and serotonergic transmission in the medial prefrontal cortex of the rat. *Neuropsychopharmacology* 32: 2087-97.

Löwel S, Singer W. (1992) Selection of intrinsic horizontal connections in the visual cortex by correlated neuronal activity. *Science* 255(5041):209-12.

Marshall L, Helgadottir H, Molle M, Born J (2006): Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory. *Nature* 444:610–613.

Miller EK, Cohen JD (2001) An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci* 24:167–202.

Newman-Tancredi A, Martel JC, Assié MB, Buritova J, Laressergues E, Cosi C, Heusler P, Bruins Slot L, Colpaert FC, Vacher B, Cussac D.(2009) Signal transduction and functional selectivity of F15599, a preferential post-synaptic 5-HT_{1A} receptor agonist. *Br J Pharmacol.*156:338-353.

Olsen RW, McCabe RT, Wamsley JK. (1990) GABAA receptor subtypes: autoradiographic comparison of GABA, benzodiazepine, and convulsant binding sites in the rat central nervous system. *J Chem Neuroanat.* 3:59-76.

Okun M, Naim A, Lampl I. (2010) The subthreshold relation between cortical local field potential and neuronal firing unveiled by intracellular recordings in awake rats. *J Neurosci.* 30:4440-4448.

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. (1992) Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT1A receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci.* 12:440-453.

Puig MV, Artigas F, Celada P (2005) Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: Involvement of serotonin and GABA. *Cereb Cortex* 15: 1-14.

Puig MV, Watakabe A, Ushimaru M, Yamamori T, Kawaguchi Y. (2010) Serotonin modulates fast-spiking interneuron and synchronous activity in the rat prefrontal cortex through 5-HT1A and 5-HT2A receptors. *J Neurosci.* 30:2211-2222.

Rollema H, Lu Y, Schmidt AW, Sprouse JS, Zorn SH. (2000) 5-HT(1A) receptor activation contributes to ziprasidone-induced dopamine release in the rat prefrontal cortex. *Biol Psychiatry.* 48:229-37.

Rotarska-Jagiela A, Schönmeier R, Oertel V, Haenschel C, Vogele K, Linden DE. (2008) The corpus callosum in schizophrenia-volume and connectivity changes affect specific regions. *Neuroimage.* 39:1522-32.

Rutter L, Carver FW, Holroyd T, Nadar SR, Mitchell-Francis J, Apud J, Weinberger DR, Coppola R. (2009) Magnetoencephalographic gamma power reduction in patients with schizophrenia during resting condition. *Hum Brain Mapp.* 30:3254-64.

Salin PA, Prince DA. (1996) Spontaneous GABAA receptor-mediated inhibitory currents in adult rat somatosensory cortex. *J Neurophysiol.* 75(4):1573-88.

Sanchez-Vives MV, McCormick DA. (2000) Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex. *Nat Neurosci.* 3(10):1027-34.

Santana N, Bortolozzi A, Serrats J, Mengod G, Artigas F (2004) Expression of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14: 1100-1109.

Sprouse JS, Aghajanian GK (1988) Responses of hippocampal pyramidal cells to putative serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists: a comparative study with dorsal raphe neurons. *Neuropharmacology.* 27:707-715.

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

Stephan KE, Friston KJ, Frith CD. (2009) Dysconnection in schizophrenia: from abnormal synaptic plasticity to failures of self-monitoring. *Schizophr Bull.* 35(3):509-27.

Steriade M, McCormick DA, Sejnowski TJ. (1993) Thalamocortical oscillations in the sleeping and aroused brain. *Science.* 262(5134):679-85.

Steriade M, Nuñez A, Amzica F. (1993) A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components. *J Neurosci.* 13(8):3252-65.

Steward O, Tomasulo R, Levy WB (1990) Blockade of inhibition in a pathway with dual excitatory and inhibitory action unmasked a capability for LTP that is otherwise not expressed. *Brain Res* 516:292-300.

Tepper JM, Martin LP, Anderson DR (1995) GABA_A receptor-mediated inhibition of rat substantia nigra dopaminergic neurons by pars reticulata projection neurons. *J. Neurosci* 15: 3092-3103.

Uchida I, Cestari IN, Yang J. (1996) The differential antagonism by bicuculline and SR95531 of pentobarbitone-induced currents in cultured hippocampal neurons. *Eur J Pharmacol.* 307(1):89-96.

Ueno S, Bracamontes J, Zorumski C, Weiss DS, Steinbach JH. (1997) Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABAA receptor. *J Neurosci.* 17(2):625-34.

Uhlhaas PJ, Pipa G, Lima B, Melloni L, Neuenschwander S, Nikolić D, Singer W. (2009) Neural synchrony in cortical networks: history, concept and current status. *Front Integr Neurosci.* 3:17.

Uhlhaas PJ, Singer W. (2010) Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia. *Nat Rev Neurosci.* 11(2):100-13. Review.

Valdizán EM, Castro E, Pazos A. (2009) Agonist-dependent modulation of G-protein coupling and transduction of 5-HT_{1A} receptors in rat dorsal raphe nucleus. *Int J Neuropsychopharmacol.* 9:1-9.

TREBALL 5

Caracterització del DU 125530, un antagonista 5-HT_{1A} amb possible aplicació en la potenciació de tractaments antidepressius

Resum

Antecedents i objectiu: L'efectivitat dels antidepressius utilitzats habitualment no és immediata després de l'inici del tractament. Es creu que aquest retard és degut a la dualitat funcional del receptor 5-HT_{1A} com a autoreceptor i heteroreceptor. Diferents aproximacions de combinació de tractament antidepressiu amb antagonistes del receptor 5-HT_{1A} han mostrat resultats esperançadors per tal de reduir el retard entre l'inici del tractament i l'efectivitat terapèutica, però els fàrmacs utilitzats són poc específics. En aquest treball caracteritzem un nou antagonista molt selectiu per al receptor 5-HT_{1A} i testem l'efecte de la combinació d'aquest fàrmac amb un tractament antidepressiu clàssic.

Aproximació experimental: Estudis autoradiogràfics de desplaçament de lligand, microdiàlisi intracerebral *in vivo*, registres electrofisiològics extracel·lulars unitaris, estudi clínic doble cec i controlat amb placebo en humans.

Resultats clau: El DU 125530 ha mostrat ser un antagonista molt potent del receptor 5-HT_{1A} en models animals, capaç de desplaçar dels receptors 5-HT_{1A} tant l'agonista 8-OH-DPAT com l'antagonista WAY 100635. A més, estudis electrofisiològics en neurones de rafe mostren que el DU 125530 pot antagonitzar els efectes produïts per 8-OH-DPAT o fluoxetina. El DU 125530 és capaç de potenciar l'augment en l'alliberament de serotonina induït per fluoxetina tant en rata com en ratolí, però no en ratolins KO pel receptor 5-HT_{1A}. L'estudi clínic en pacients depressius no ha mostrat diferències significatives entre el grup tractat amb fluoxetina + placebo i el grup tractat amb fluoxetina + DU 125530.

Conclusions i implicacions: Tot i l'efectivitat del DU 125530 com a antagonista del receptor 5-HT_{1A} en models animals de desplaçament, electrofisiologia i microdiàlisi, el DU 125530 no és capaç d'augmentar la teràpia antidepressiva quan es combina amb fluoxetina. Aquest resultat pot ser explicat per diverses raons: a) la dosi administrada en l'estudi pilot fou massa elevada; b) l'acció a nivell d'autoreceptor però també a nivell d'heteroreceptor pot no ser la més adequada per tal d'augmentar la teràpia antidepressiva. El fet que el bloqueig tant de l'autoreceptor com de l'heteroreceptor 5-HT_{1A} no empitjori el tractament antidepressiu, suggereix que almenys un temps després d'iniciada la teràpia antidepressiva, el receptor 5-HT_{1A} no és necessari per continuar tenint efecte antidepressiu.

**Preclinical and clinical characterization of the 5-HT_{1A} receptor antagonist
DU-125530 for antidepressant treatment**

M. C. Scorza^{1,*,#}, L. Lladó-Pelfort^{1,3,*}, S. Oller^{2,3,*}, R. Cortés^{1,4,5}, D.
Puigdemont^{2,3}, M.J. Portella^{2,3}, R. Pérez^{2,3}, E. Alvarez^{2,3}, P. Celada^{1,3,5}, V.
Pérez^{2,3}, F. Artigas^{1,3,5}

¹Department of Neurochemistry and Neuropharmacology, Institut
d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona, IDIBAPS, Consejo Superior de
Investigaciones Cientificas (CSIC)

²Department of Psychiatry, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Universitat
Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona

³Centro de Investigación Biomédica en Red de Salud Mental, CIBERSAM,
Spain

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades
Neurodegenerativas (CIBERNED) Spain

⁵Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), 08036

*Authors with equal contribution

#Present address: Instituto de Invetigaciones Biológicas Clemente Estable,
Montevideo, Uruguay.

Corresponding author: Francesc Artigas, PhD; Dept. of Neurochemistry, Institut d'
Investigacions Biomèdiques de Barcelona (CSIC), IDIBAPS, Rosselló, 161, 6th floor,
08036 Barcelona, Spain. Phone: +3493-363 8315; Fax: +3493-363 8301; e-mail:
fapnqi@iibb.csic.es

Abstract

Context: Antidepressant drugs exert their pharmacological effects in hours yet their clinical effect requires prolonged treatments. This therapeutic delay is due, among other reasons to the activation by antidepressants of a negative feedback operating on serotonergic neurons and involving the activation of 5-HT_{1A} autoreceptors by the excess of extracellular 5-HT induced by antidepressants. The prevention of this negative feedback by 5-HT_{1A} receptor antagonists enhances the antidepressant-like effects in experimental animals. Moreover, the non-selective 5-HT_{1A} receptor antagonist pindolol accelerates the clinical effect of SSRIs.

Objectives: To characterize the pharmacological properties of a new 5-HT_{1A} receptor antagonist available for human use (DU-125530) and to examine its capacity to accelerate and/or enhance the antidepressant effects of the SSRI fluoxetine in depressive patients.

Methods: Autoradiography, intracerebral microdialysis and extracellular recordings in preclinical studies. Double-blind, placebo-controlled trial in patients with major depression.

Results: DU-125530 shows nM affinity to displace the binding of agonists and antagonists to rat and human 5-HT_{1A} receptors, with a comparable potency at pre- and postsynaptic receptors. It also antagonizes the actions of the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT and of the SSRIs fluoxetine and paroxetine in both electrophysiological and microdialysis experimental paradigms. It potentiates the increase in forebrain extracellular 5-HT induced by SSRIs. The extracellular 5-HT increase produced by fluoxetine+DU-125530 in wild-type mice is equal to that produced by fluoxetine alone in 5-HT_{1A} receptor KO mice. Overall, this indicates an excellent and silent occupancy of presynaptic 5-HT_{1A} receptors. Despite these properties, DU-125530 addition to fluoxetine treatment did not accelerate nor enhance the antidepressant effect of fluoxetine within the 6 weeks of the clinical trial.

Conclusions: The present study shows that DU-125530 is an excellent antagonist of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. Yet, its addition to fluoxetine did not improve the antidepressant properties of fluoxetine. These

results indicate that blockade of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors partly cancels the potential benefits obtained by enhancing presynaptic serotonergic function, indicating that postsynaptic 5-HT_{1A} receptors are key players in the therapeutic effect of SSRIs. These results may have an impact on antidepressant drug development.

Keywords: antidepressant drugs, 5-HT_{1A} receptors, serotonin transporter, major depression

Introduction

It is accepted that about 1/3 of patients treated with antidepressant drugs do not improve or have an incomplete improvement, delivering a major medical and social problem (Stoudemire et al., 1986; Murray and Lopez, 1997; Andlin-Sobocki et al., 2005). Thus, the increasing incidence of depression is not paralleled by improvements in its treatment. Selective serotonin (5-HT) reuptake inhibitor antidepressants (SSRIs) are the most commonly used drugs for depressive disorder treatment, representing up to 80% of the world market, although they display lower efficacy than some first-generation antidepressant drugs for severe depression (DUAG, 1986; 1990). The success of SSRIs is mainly due to the lack of severe side effects, which facilitates treatment compliance.

The pharmacological effect of SSRIs is observed immediately after their administration, yet their clinical effects are evident only several weeks after several weeks of sustained treatment. This delayed onset of antidepressant effects is due to presynaptic changes in monoaminergic neurons (Artigas et al., 1996), such as autoreceptor activation of serotonergic neurons by the excess of extracellular 5-HT produced by reuptake blockade, which activates a negative feedback to decrease 5-HT release. Postsynaptic changes in cortical and limbic structures (Blier and de Montigny, 1994), as well as changes in gene expression (Duman et al., 1997), are also implicated in the latency of response to SSRI. The slowness of action of standard antidepressant drugs is a current important problem because a delayed onset can produce direct clinical implications, such as a more prolonged patient's suffering, an increased risk of suicide and greater illness burden (Stahl et al., 2001).

SSRIs act by blocking the 5-HT transporter (SERT), therefore increasing 5-HT availability at CNS synapses. The increase in extracellular 5-HT activates 5-HT_{1A} presynaptic autoreceptors, reducing the activity of serotonergic neurons and the terminal release of 5-HT. The sustained activation of 5-HT_{1A} autoreceptors evoked by prolonged treatment periods results in a desensitization, thus reducing the efficacy of the negative feedback and permitting a normal function of serotonergic neurons. Hence, the increase in extracellular 5-HT produced by two-week treatments with SSRIs is, by and large,

much greater than that produced by single treatments (Bel and Artigas, 1992; 1993; Hervás et al., 2001).

As a result of preclinical studies, the use of 5-HT_{1A} receptor antagonists was proposed to block the autoreceptor-mediated negative feed-back, thus potentially accelerating and/or enhancing the clinical effects of SSRIs (Artigas, 1993; Artigas et al., 1996). Preclinical data obtained with non-selective 5-HT_{1A} antagonists, such as pindolol, selective 5-HT_{1A} antagonists, such as WAY-100635 and with mice lacking 5-HT_{1A} receptors indicates that the concurrent blockade of 5-HT_{1A} autoreceptors enhances the neurochemical actions of SSRI (see Artigas et al., 2001 for review). At the clinical level, only the β -adrenoceptor antagonist, non-selective 5-HT_{1A} antagonist pindolol has been used due to its availability for human use. Both pilot (Artigas et al., 1994; Blier et al., 1995) as well as placebo-controlled studies (Pérez et al., 1997; Zanardi et al., 1997; Portella et al., 2010; see meta-analysis in Ballesteros and Callado, 2004) indicate a beneficial effect of pindolol addition to SSRIs, both in terms of speed of onset and improved efficacy (Pérez et al., 1997; Zanardi et al., 1998), yet it does not result in an improved response in treatment-resistant depressive patients (Pérez et al., 1999).

DU-125530 is a drug with high affinity for 5-HT_{1A} receptors that occupies pre- and postsynaptic receptors in human brain, as demonstrated by PET scan studies (Rabiner et al. 2002). Given its selectivity and high affinity for 5-HT_{1A} receptors it offers the advantage over pindolol of exerting a clear pharmacological action. Therefore, we have carried out 1) a preclinical characterization of the actions of DU-125530 on pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the rodent brain, and 2) a double blind, placebo controlled clinical trial examining the ability of DU-125530 to accelerate or enhance the clinical response induced by the SSRI fluoxetine.

Materials and Methods

Preclinical studies

Animals

Male albino Wistar rats (230-300 g; Iffa Credo, Lyon, France) were kept in a controlled environment (12 h light-dark cycle and 22±2 °C room temperature) with food and water provided ad libitum. Animal care followed the European Union regulations (O.J. of E.C. L358/1 18/12/1986) and was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. Stereotaxic coordinates (in mm) were taken from bregma and duramater according to the atlas of Paxinos and Watson (1998).

Drugs

8-OH-DPAT was from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), fluoxetine was from Tocris (Bristol, UK), paroxetine was generously provided by Smith Kline Beecham (London, UK), DU125530 was from Solvay Pharma (Brussels, Belgium), and WAY100635 was from RBI (Natick, MA). Stock solutions were prepared and aliquots were stored at -20 °C. Working solutions were prepared daily by dilution in saline at the appropriate concentrations. Doses are expressed as weight of free bases.

Receptor Autoradiography (rat)

Male albino Wistar rats (230-300 g; Iffa Credo, Lyon, France) were killed by decapitation and the brains frozen on dry ice. Human brain tissue obtained at autopsy from 2 neuropathologically control patients (1 male and 1 female, aged 73 and 70, post-mortem delay 3.5 and 5 h, respectively) was provided by the Neurologic Tissue Bank of the University of Barcelona-Hospital Clínic. Frozen tissue blocks from the hippocampus were used. Rat and human tissue sections, 14 µm thick, were obtained in a microtome-cryostat (HM500, Microm, Walldorf, Germany), thaw-mounted onto APTS (3-aminopropyltriethoxysilane; Sigma-Aldrich)-coated slides and kept at -20°C. The incubation conditions for [3H]8-OH-DPAT and [3H]WAY 100635 were taken from Pazos and Palacios (1985) and Mengod et al. (1996), respectively. Briefly, the sections were preincubated for 30 min at rt in 170 mM Tris-HCl buffer, pH 7.6, containing 4 mM CaCl₂ and

0.01% ascorbic acid, and then incubated in the same buffer in the presence of 0.5 nM [³H]8-OH-DPAT (230 Ci/mmol; Amersham, GE Healthcare, UK) or 0.5 nM [³H]WAY 100635 (74 Ci/mmol; Amersham, GE Healthcare, UK) for 1 or 2 hours, respectively. To generate displacement curves, serial sections were incubated in the same conditions but in the presence of increasing concentrations of DU-125 530 (from 10⁻¹⁰ to 10⁻⁵ M). The non-specific binding was determined in the presence of 10 μM 5-HT. Afterwards, the sections were washed twice 5 min in ice-cold buffer, dipped in distilled water and dried under a stream of cold air. To generate autoradiograms the incubated slides were exposed to tritium-sensitive film (Kodak Biomax MS; Kodak, Rochester, NY) together with tritiated plastic standards ([³H]Microscales; Amersham, UK). An AIS computerized image analysis system (Imaging Research Inc., St Catharines, Ontario, Canada) was used to measure binding densities on the autoradiograms and to obtain pseudo-color images shown in Figs. 2 and 4. Data were analyzed using the GraphPad Prism software.

Receptor autoradiography (human)

Brain tissue obtained at autopsy from 6 control patients (4 male, 2 female, mean age±SEM: 65.5±3.58; mean post-mortem delay±SEM: 7.88±2.22) was provided by the Neurologic Tissue Bank of the University of Barcelona-Hospital Clínic. The brains immediately dissected and one hemisphere was fixed in formaline for neuropathological examination and the other hemisphere was sliced, cut into blocks and frozen at 70°C. Blocks from the hippocampus and the low midbrain-upper pons containing the dorsal raphe were cut in a microtome-cryostat (HM500, Microm, Walldorf, Germany) to obtain 14 μm-thick sections that were processed for receptor autoradiography as described above.

Single unit recordings

We examined the reversal by DU-125530 of the responses elicited by 8-OH-DPAT or fluoxetine on serotonergic neurons of the DR and on pyramidal neurons of the mPFC in anaesthetized rats. The prototypical 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 was used to examine the completeness of DU-125530 actions.

Drugs were injected through the femoral vein every 2-3 minutes after the recording of the basal condition.

Rats were administered chloral hydrate (400 mg·kg⁻¹ i.p.) and positioned in a David Kopf stereotaxic frame. Thereafter, chloral hydrate was continuously administered i.p. at 50-70 mg·kg⁻¹h⁻¹ using a perfusion pump. Neurons were recorded extracellularly with glass micropipettes.

For serotonergic neurons in the DR, recordings were made essentially as described in Celada et al. (2001) and Romero et al. (2003). A burr hole was drilled over lambda and the sagittal sinus was ligated, cut and deflected. Descents were carried out along the midline. 5-HT neurons were typically recorded 4.7-6.6 mm below the brain surface and were identified according to previously described electrophysiological criteria (Wang and Aghajanian, 1977).

mPFC pyramidal neurons (AP +3.2-3.4, L -0.5 to -1.0, DV -1.0 to -4.0) were recorded as described in Puig et al. (2003) and Kargieman et al. (2007). Bipolar stimulating electrodes were implanted in the DR (AP -7.3, L -3.1, DV -6.2 angle 30°) for the identification of the mPFC pyramidal neurons by antidromic activation and collision extinction test as described (Puig et al., 2003). At the end of the experiments, rats were killed by an anesthetic overdose and the placement of the electrodes was verified histologically following standard procedures (Puig et al., 2003).

Changes in discharge rate were quantified by averaging the values in the minute before each drug injection. Drug effects were assessed using one-way ANOVA for repeated measures. Data are expressed as the mean±SEM. Statistical significance has been set at the 95% confidence level.

Microdialysis procedures

Microdialysis experiments in rats were conducted in rats and mice, as described in Amargós-Bosch et al., 2004 and Bortolozzi et al., 2005. Briefly, rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) and stereotaxically implanted in mPFC with concentric dialysis probes equipped with a Cuprophan membrane (4-mm long) at the following coordinates (in mm): AP +3.2, L -0.8, DV -6.0. Microdialysis experiments were performed in

freely moving rats the day after surgery. For mice, the manufacture of the probes was adapted from that previously described for rats. Surgical and microdialysis procedures were identical to those for rats except for the dose of anesthesia (sodium pentobarbital, 40 mg/kg, i.p.), the length of dialysis membrane (2 mm) and the brain coordinates (in mm) of the mPFC: AP + 2.2, L -0.2, DV -3.4.

5-HT concentration in dialysate samples was determined by HPLC with electrochemical detection (Hewlett Packard 1049; +0.6 V) as described (Amargós-Bosch et al., 2004). Detection limit was 2 fmol for 5-HT. At the end of experiments, animals were killed by an anesthetic overdose and the brains quickly removed and frozen for histological verification of the placement of dialysis probes.

Data treatment

In autoradiographic studies, inhibition curves were statistically analysed using GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Changes in discharge rate were quantified by averaging the values in the third minute after each drug injection. Neurons were considered to respond to drugs if firing rate was altered $\pm 30\%$ from baseline. Drug effects were assessed using Student's *t*-test or one-way ANOVA for independent or repeated measures, as appropriate. Data are expressed as the mean \pm SEM. Statistical significance has been set at the 95% confidence level.

Dialysate 5-HT concentrations are given as fmol/fraction and expressed in the figures as percentages of baseline. Statistical analysis was carried out using repeated-measures ANOVA using treatment and time as variables. AUC values for selected time periods were also calculated and analyzed by one-way ANOVA.

Clinical studies

Patients

Consecutive eligible patients aged 18 to 70 referred by General Practitioners of Primary Care Centers or from de Psychiatric Emergency Services (Catalonian

Public Health Service) were recruited. Inclusion criteria were: Diagnosis of unipolar major depression using DSM-IV criteria with moderate to severe symptoms (score above 18 on the Hamilton Depression Rating Scale, HDRS-17). There was a wash-out of 1 week of any antidepressant drug (except for fluoxetine, 28 days) prior entering the study. Written informed consent was obtained from all participants. Exclusion criteria were: concurrent psychiatric disorders (DSM IV axis I, II cluster A or B); failure to respond to drug treatment in current depressive episode; previous resistance to SSRIs or other antidepressant drug; suicide risk score; participation in other drug trials within the previous month; presence of delusions or hallucinations; history of substance abuse (including alcohol) in the past three months; pregnancy or lactation; organic brain disease or history of seizures; serious organic illnesses in the past 6 months; frequent or severe allergic reactions; concomitant use of other psychotropic drugs (benzodiazepines were allowed) and blockers or catecholamine-depleting agents; current structured psychotherapy.

Study variables

Demographic, clinical and concomitant treatment data were collected, including age, gender, personal and familial history of psychiatric disorders. Other relevant clinical information to the study was recorded: number of previous episodes, age at first depressive episode, melancholic features and medical history.

Primary variable of the clinical trial was the score on the HDRS. Sustained response was defined as a 50% or greater decrease in the admission HDRS score maintained until day 42, allowing a 5% variation during intermediate visits. Sustained remission was defined as a HDRS score of 8 or less and, likewise, this cut off had to be maintained until endpoint.

As secondary variables, the Montgomery- Asberg Depression Rating Scale (MADRS) and the Clinical Global Impression (CGI) were also included. Safety was assessed by means of UKU (Udvalg for Kliniske Undersogelser Side Effect Rating Scale), biochemical variables and vital signs. ECG was performed at admission, two weeks after beginning active treatment and at the end of the study. Plasma concentration of fluoxetine was obtained at three weeks of treatment and at the end of the trial.

Study design (see figure 1)

Placebo phase: After obtaining informed consent, patients entered a single-blind placebo run-in period of 3-7 days to exclude responders to placebo. Patients received the same number of tabs than during the trial, yet these were placebo. Those patients who showed a reduction of 25% or greater of their admission HDRS score or a HDRS score lower than 18 during this period were excluded from the study.

Active phase: Patients entering the study were randomized and assigned on day 1 to one of two treatment arms: fluoxetine 20 mg/day plus placebo or fluoxetine 20 mg/day plus DU-125530 (20mg/day). Patients, investigators and all personal who participated in the study were blind to treatment. The active phase lasted 6 weeks. Clinical assessments were carried out on day 1 and every 7 days (± 3 days) until day 42. Compliance was assessed by direct questioning patients and by counting returned pills and capsules at the follow-up visits.

The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Sant Pau and was registered with the US National Institutes of Health Protocol Registration System. An independent researcher (Ignasi Gich, MD, Department of Clinical Pharmacology, Hospital de Sant Pau) not involved in the clinical trial, carried out the randomization by means of computer-generated random numbers. Investigators, patients and staff involved in the study did not have access to the randomization list until the end of the study.

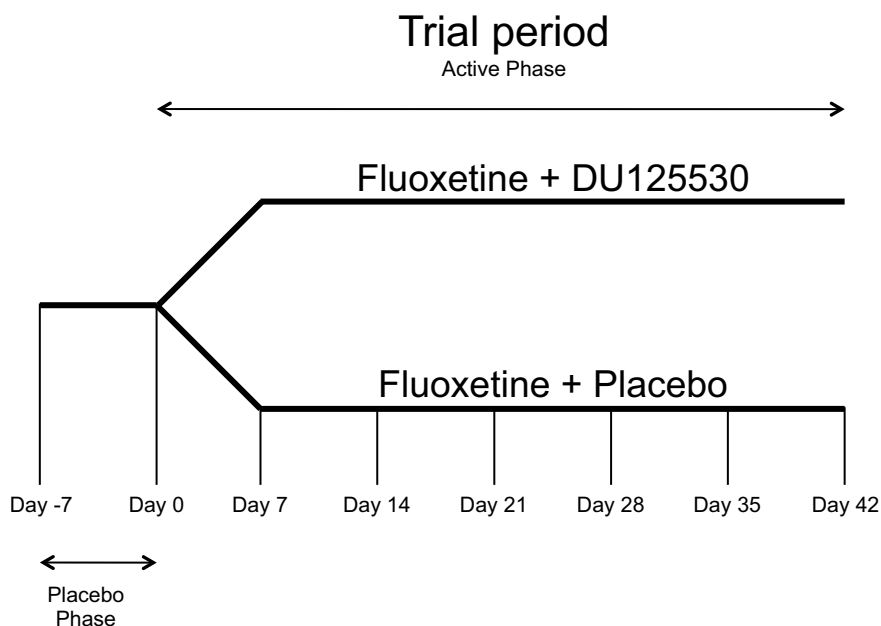


Figure 1 (previous page). Clinical study design. Patients entered in a single-blind placebo phase of 3-7 days. Patients showing a reduction of 25% or greater of their Hamilton Depression Rating Scale score or lower than 18 at day 0 were excluded. Patients entering the study were randomized on day 0 to one of two treatment arms: fluoxetine + placebo or fluoxetine + DU125530.

Data treatment and statistical analyses

The planned sample size for this study was 100 randomly assigned patients (50 in each treatment group), chosen to provide approximately 75% power to detect a difference in the percentage of responders at endpoint of 60% for fluoxetine plus placebo and 80% for fluoxetine plus DU using a one-sided 0.05 level test. Given the absence of previous trials using DU, the use of one-sided test was considered to be more appropriate than increasing the sample size. Thus, one-sided p values were used in safety and efficacy analyses. Data are given as means (Standard Deviation, SD). All scores were computed using a LOCF approach. All analyses were done by intention-to-treat. An interim analysis was performed at n=50 (half of the planned sample) which met the criteria to stop the trial.

Analysis of demographic and clinical data was carried out by Student's *t* or non-parametric tests when appropriate. Main analysis was performed using repeated-measures ANOVA, with time (8-time points) as the within-subjects factor and group (fluoxetine + placebo vs. fluoxetine + DU) as the between-subjects factor. A Huynh-Feldt correction was used where the assumption of sphericity was violated (uncorrected df reported). Further differences were assessed by means of post-hoc analyses. All randomized patients who had a baseline and at least one post-baseline score were included in the analyses. One-way ANOVA (treatment group as the between-subjects factor) was used to examine group differences between other clinical variables. Additionally, a survival analysis was done to establish the velocity of each treatment arm. All statistics were performed by means of statistical package for Windows SPSS 17.0.

Results

Characterization of DU-1255530 as a 5-HT_{1A} receptor antagonist: preclinical studies

Quantitative receptor autoradiography

The binding of both the 5-HT_{1A} agonist [³H]8-OH-DPAT and the 5-HT_{1A} antagonist [³H]WAY-100635 to rat brain structures was inhibited by DU-1255530 at nanomolar concentrations, as illustrated in Fig. 2. Displacement curves of DU-125530 against the two radioligands, as generated from microdensitometric data, fitted to the one site binding competition model (Fig.3). The calculated pIC₅₀ values of DU-125530 for both for [³H]8OH-DPAT and [³H]WAY-100635 did not differ among the regions examined and are reported in Table 1.

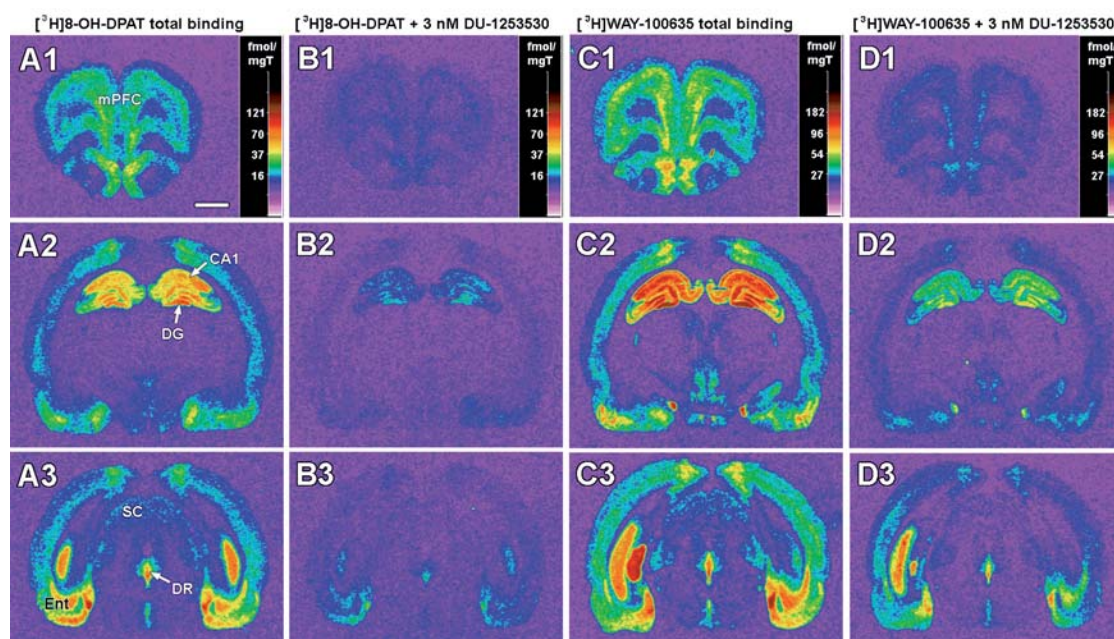


Figure 2. Pseudocolor images from autoradiograms obtained from sections at different brain levels (prefrontal cortex, hippocampus and midbrain-upper pons) incubated with 0.5 nM [³H]8-OH-DPAT alone (A1-A3) and in the presence of 3*10⁻⁹ M DU1255530 (B1-B3), or incubated with 0.5 nM [³H]WAY-100635 alone (C1-C3) and in the presence of 3*10⁻⁹ M DU1255530 (D1-D3). Note that DU1255530 inhibits [³H]8-OH-DPAT and [³H]WAY-100635 binding in all structures, including CA1, DG (dentate gyrus), DR (dorsal raphe), Ent (entorhinal cortex), mPFC (medial prefrontal cortex) and SC (superior colliculus). Bar= 2 mm.

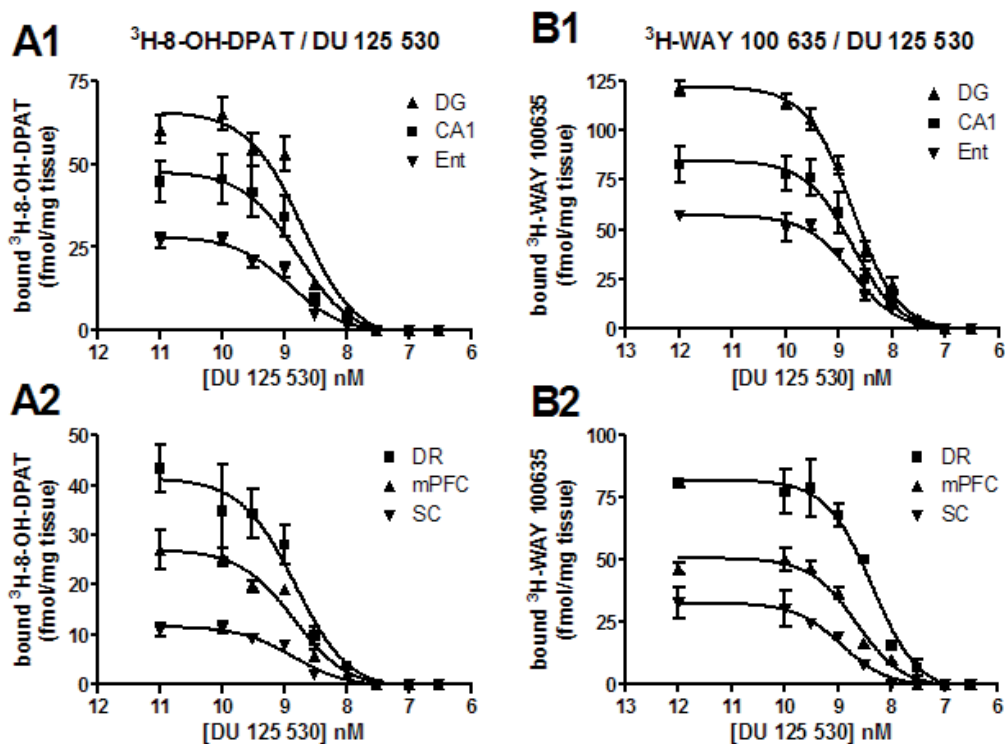


Figure 3. Displacement of [³H]8-OH-DPAT (A1, A2) and [³H]WAY-100635 (B1 and B2) binding by DU125530 in the hippocampus (CA1), dentate gyrus (DG), dorsal raphe (DR), (entorhinal cortex Ent), medial prefrontal cortex (mPFC) and superior colliculus (SC). Data points are means of three animals and were obtained by microdensitometric analysis of autoradiograms.

Table 1. Relative binding affinities (pIC₅₀, M) of DU125530 for [³H]8-OH-DPAT and [³H]WAY-100635 binding sites in various regions of the rat brain.

area	[³ H]8-OH-DPAT pIC ₅₀ ± SD	[³ H]WAY-100635 pIC ₅₀ ± SD
CA1	8.79 ± 0.14	8.74 ± 0.12
DG	8.72 ± 0.11	8.73 ± 0.05
Ent	8.91 ± 0.09	8.74 ± 0.09
DR	8.83 ± 0.15	8.36 ± 0.10
mFCx	8.85 ± 0.10	8.66 ± 0.08
SC	8.85 ± 0.11	8.93 ± 0.15

Autoradiographic studies in human brain ($[^3\text{H}]\text{WAY-100635}$)

In the human hippocampus (Fig. 4), DU-125530 also displaced $[^3\text{H}]\text{WAY-100635}$ binding with high affinity and produced monophasic displacement curves. The pIC50 values calculated for the CA1 hippocampal field and the perirhinal cortex are reported in Table 2.

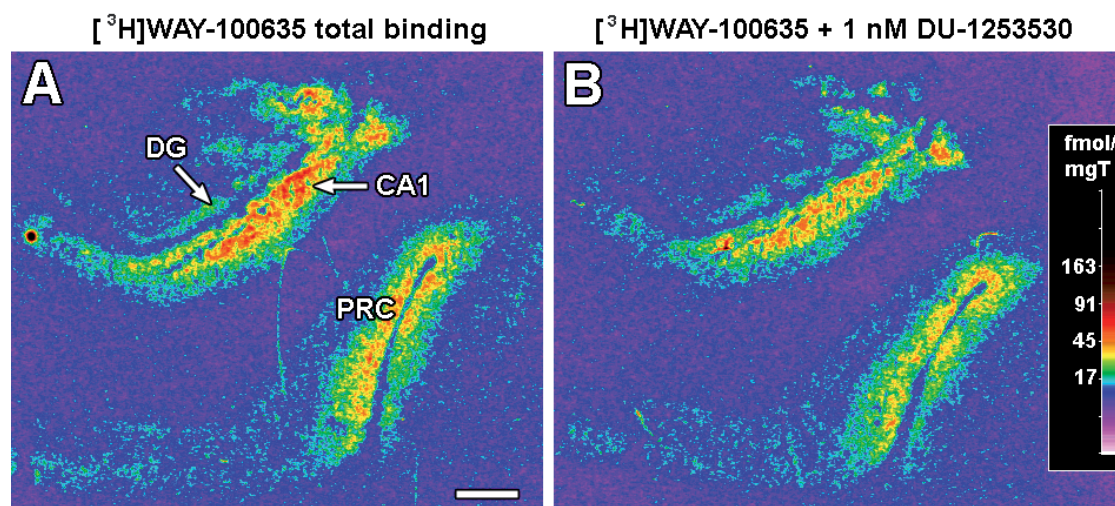


Figure 4. Pseudocolor images from autoradiograms obtained from human hippocampal sections incubated with 0.5 nM $[^3\text{H}]\text{WAY-100635}$ alone (A) or in the presence of 10^{-9} M DU125530 (B). Abbreviations: CA: CA1 hippocampal field; DG: dentate gyrus; PRC: perirhinal cortex. Bar= 2 mm.

Table 2. Relative binding affinities (pIC50, M) of DU-125530 for $[^3\text{H}]\text{WAY-100635}$ binding sites the CA1 hippocampal field and the perirhinal cortex of two human control cases.

area	$[^3\text{H}]\text{WAY-100635}$ pIC50 \pm SD
CA1 case A	8.62 \pm 0.08
CA1 case B	8.72 \pm 0.22
PRC case A	8.85 \pm 0.08
PRC case B	8.39 \pm 0.07

Electrophysiological experiments

We examined the ability of DU-125530 to reverse the inhibition of the cell firing of DR serotonergic neurons induced by either the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT or the SSRI fluoxetine.

The administration of DU-125530 (67-134 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.v.) fully reversed the reduction in the firing rate of DR serotonergic neurons induced by the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT (dose range 1.2-4.8 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.v.) in all neurons examined ($F(3,12)=3.86$; $p<0.04$; $n=5$). Subsequent administration of increasing doses of WAY 100635 (5-60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.v.) did not modify the reversal elicited by DU-125530 (Fig. 5 A, C).

Similarly, the systemic administration of DU-125530 (67-134 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.v.) was also able to reverse the reduction in firing rate of DR serotonergic neurons after the administration of the SSRI fluoxetine (0.8-4 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.v.) ($F(3,15)=3.97$; $p<0.03$; $n=6$). Subsequent administration of WAY 100635 (5-20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ i.v.) was not able to augment the reversal elicited by DU-122530 (Fig. 5 B, D).

Fig. 5 E, F illustrates examples of the reversal by DU-12530 of the excitations produced by the selective 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on at mPFC pyramidal neurons.

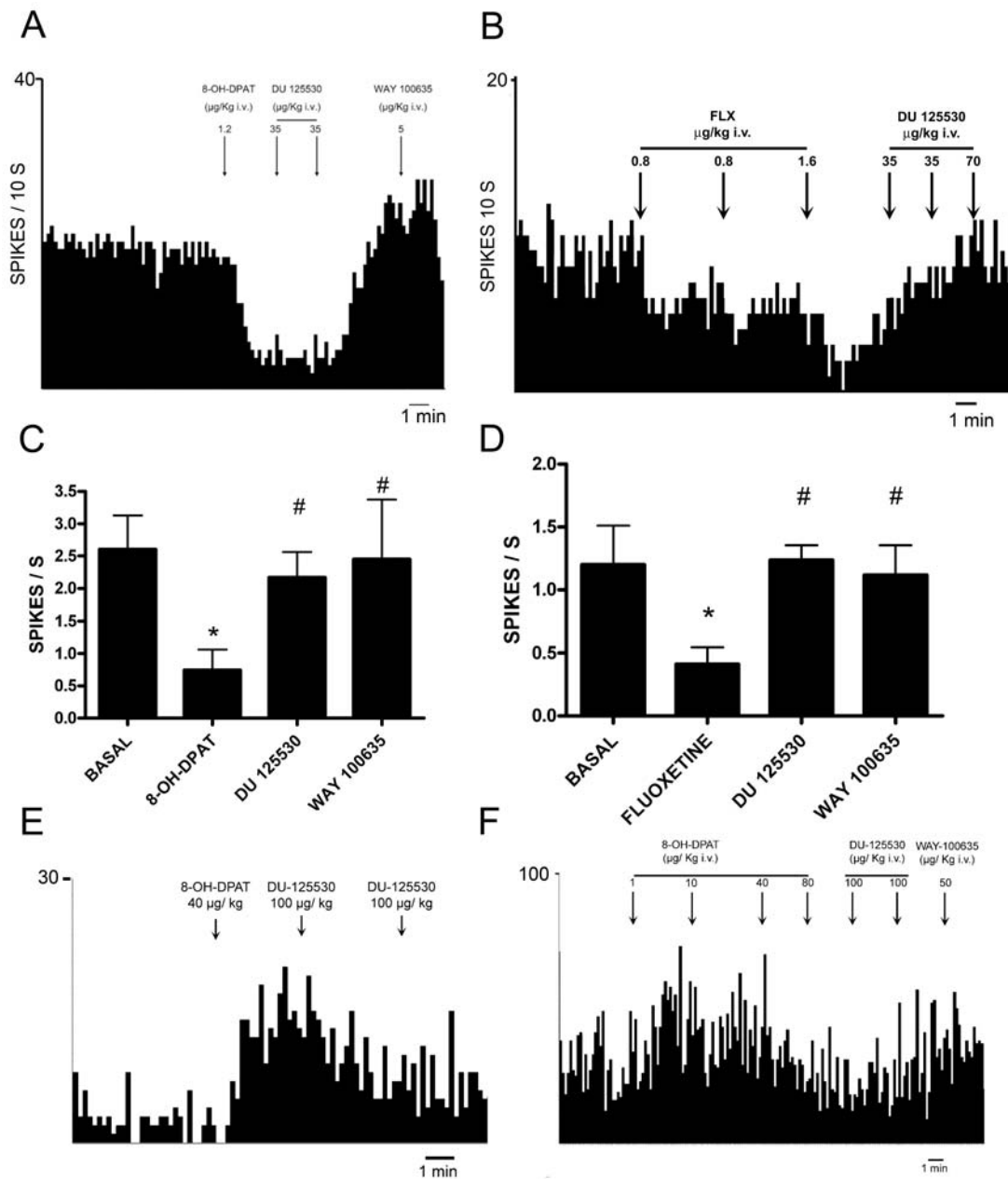


Figure 5. A -B. Integrated firing rate histograms of two serotonergic neurons showing the reversal of the 8-OH-DPAT-induced and fluoxetine –induced inhibition of cell firing by the subsequent injection of DU-125530, respectively. The additional administration of WAY 100635 (5 μg/kg) (A) did not modify the activity of this neuron, indicating a complete reversal by DU-125530. **C-D.** Bar graphs showing the inhibitory effect on 5-HT cell firing produced by 8-OH-DPAT (C) or fluoxetine (D) and the reversal of these effects by DU-125530. **E-F.** Integrated firing rate histograms of two mPFC pyramidal cells projecting to the DR. The administration of the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT evokes excitations (E) or excitations at low doses followed by inhibitions at higher doses (F). Both effects are reversed by the systemic administration of DU-125530, showing its antagonist properties at postsynaptic 5-HT_{1A} heteroreceptors. Arrows mark the time of drug administration.

Microdialysis experiments

We performed microdialysis studies to assess the putative antagonist action of DU-125530 at 5-HT_{1A} receptors *in vivo*. Experiments were conducted in rats and mice (WT and 5-HT_{1A} KO) using four experimental models to assess the effect of DU-125530 on pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors : a) antagonism of 8-OH-DPAT-induced reduction of 5-HT release, b) reversal of paroxetine-induced reduction of 5-HT release (with local 5HT reuptake inhibition in mPFC; see below), c) reversal of the effects produced by the local application of the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT in mPFC, and d) augmentation of the effect of SSRIs on extracellular 5-HT in mPFC.

Rat experiments

The systemic administration of DU-125530 alone had no effect on 5-HT release in mPFC, with non-significant effect of treatment, time or treatment x time interaction (Fig. 6 A; Two-way ANOVA $F(15,165)=0.87$; $p=0.598$, n.s.; fractions 11-16 Two-way ANOVA $F(6,66)= 1.47$; $p = 0.2012$ n.s.; vehicle + vehicle, $n = 6$; vehicle + DU-125530, $n = 7$).

DU-125530 was able to prevent (Newman-Keuls post-ANOVA; $p<0.03$ vs vehicle) the reduction of 5-HT release (Newman-Keuls post-ANOVA; $p<0.02$ vs baseline) induced by systemic administration of 8-OH-DPAT in rats, with significant effects of treatment ($F(1,7) = 7.809$; $p < 0.03$), time ($F(15,105) = 2.4052$; $P<0.01$) and treatment x time interaction (Fig. 6B; $F(15,105) = 5.33$; $p<0.0001$; vehicle + 8-OH-DPAT, $n = 4$; DU-125530 + 8-OH-DPAT, $n=5$).

To test the capacity of DU-125530 to antagonize the actions of 5-HT at somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors, we used an experimental paradigm developed earlier, in which an SSRI (e.g., paroxetine) is administered systemically while locally blocking SERT in the sampling area (mPFC in this case) with the SSRI citalopram. In these experimental conditions, the systemically administered SSRI cannot further block SERT in the sampling area but instead, it blocks SERT in the raphe area, increasing extracellular 5-HT and activating the negative feedback mediated by 5-HT_{1A} autoreceptors, thus reducing terminal 5-HT release (see Romero and Artigas, 1997). In these conditions, the systemic injection of paroxetine produced a significant

decrease of 5-HT release in mPFC (Newman-Keuls post-ANOVA, fractions 6-16, $p < 0.03$ vs baseline) which was blocked by systemic administration of DU-125530 with significant effects of treatment (fractions 11-16; $F(1,8)=9.2563$; $p<0.02$), time ($F(15,120)=38.738$; $p<0.0001$) and treatment x time interaction ($F(15,120)=3.45$; $p<0.0001$; paroxetine + vehicle, $n=5$; paroxetine + DU-125530, $n=5$; Fig. 6C).

To examine whether DU-125530 was also able to block postsynaptic 5-HT_{1A} receptors we performed additional experiments in which we applied locally 8-OH-DPAT in the mPFC by inverse microdialysis. This induces a reduction of the local 5-HT release due to the inhibition of excitatory inputs to DR ascending 5-HT neurons following the local action of 8-OH-DPAT in mPFC (Celada et al., 2001). The local application of 8-OH-DPAT in mPFC reduced extracellular 5-HT levels in this area (Newman-Keuls post-ANOVA; $p < 0.05$ fractions 6-16 vs. baseline). Systemic administration of DU-125530 (fractions 11-16) was able to reverse this decrease with significant effect of treatment ($F(1,9)=6.5088$; $P<0.04$; 8-OH-DPAT + vehicle, $n = 5$; 8-OH-DPAT + DU-125530, $n=6$; Fig. 6D).

Regarding the augmentation of SSRIs-induced increase of extracellular 5-HT concentration, DU-125530 was able to potentiate the increase of extracellular 5-HT produced by fluoxetine in mPFC ($F(15,180) = 20.58$; $p < 0.001$; fractions 6-16 $p < 0.002$ vs baseline and fractions 11-16 $p<0.05$ vs fluoxetine effect; $n=13$; Fig. 6E) as well as the increase of mPFC 5-HT levels induced by paroxetine with significant effects of treatment (fractions 11-16; $F(1,8)= 5,7599$; $p<0.05$), time ($F(15,300)=41.899$; $P<0.04$) and treatment x time interaction ($F(15,300)=1.83$; $P<0.04$; fluoxetine + vehicle, $n = 9$; fluoxetine + DU-125530, $n=13$; Fig. 6F).

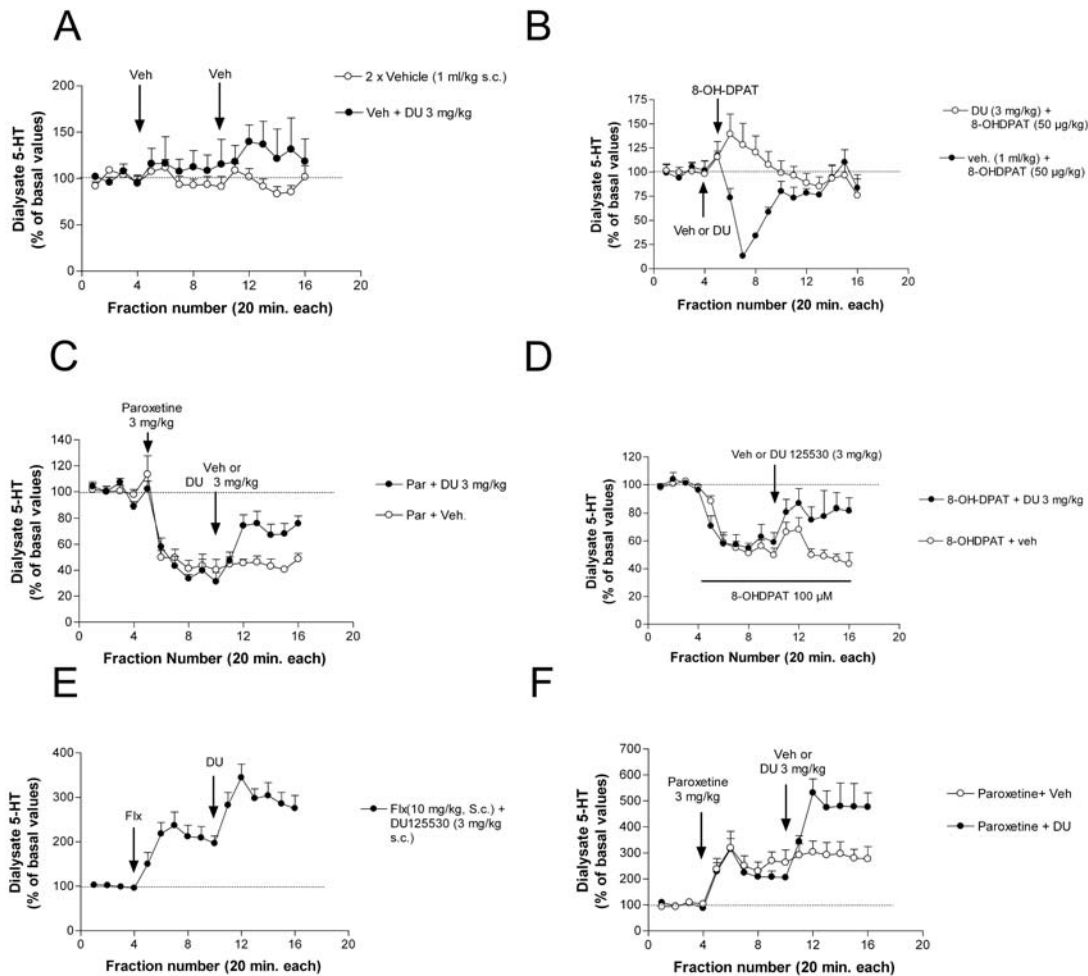


Figure 6. *In vivo* microdialysis experiments showing the antagonism/reversal exerted by DU-125530 in the different experimental models used in rats (the extracellular 5-HT concentration in mPFC was used in all instances): **A)** systemic administration of DU-125530; **B)** prevention by DU-125530 of the 8-OH-DPAT-induced reduction of 5-HT release; **C)** reversal by systemic administration of DU-125530 of the paroxetine-induced decrease in 5-HT release in mPFC during the local perfusion of citalopram by reverse dialysis. Arrows mark systemic injections. Horizontal bars indicate local perfusion by inverse microdialysis. **D)** reversal by systemic DU-125530 administration of the effects produced by local application of 8-OH-DPAT on mPFC; **E)** potentiation by DU-125530 of the fluoxetine-induced increase of the extracellular 5-HT levels in mPFC and **F)** augmentation by DU-125530 of the paroxetine induced increase in mPFC extracellular 5-HT levels.

Mice experiments

Systemic administration of DU-125530 alone had no effect on the extracellular 5-HT concentration in mPFC in wild type mice (WT) ($F(15,120)=0.55$; $p=0.9057$ n.s.; fractions 11-16 $F(5,40) = 0.09$; $p=0.9926$ n.s.; vehicle + vehicle,

n = 5; vehicle + DU-125530, n=5; Fig. 7A) nor in 5-HT_{1A} knock out mice (KO) (F(15,105) = 0.73; p = 0.7502 n.s.; fractions 11-16 F(5,35)=0.75; p=0.5885 n.s.; vehicle + vehicle, n=5; vehicle + DU-125530, n=4; Fig. 7B), with no significant effect of treatment, time or treatment x time interaction in either group.

DU-125530 was able to prevent (Newman-Keuls post-ANOVA; p<0.03 vs vehicle) the reduction of 5-HT release (Newman-Keuls post-ANOVA; p<0.04 vs baseline) induced by systemic administration of 8-OH-DPAT in WT mice, with significant effects of treatment (F(1,10)=16.379; P<0.003), time (F(15,150)=4.102; p<0.0000) and treatment x time interaction (F(15,150)=2.71; P<0.002; vehicle + 8-OH-DPAT, n=4; DU-125530 + 8-OH-DPAT, n=5; Fig. 7C). As expected, 8-OH-DPAT did not reduce the 5-HT release in the mPFC of 5-HT_{1A} KO mice and changes in 5-HT concentration produced by the systemic injections of vehicle + 8-OH-DPAT were identical to those produced by systemic administration of DU-125530 + 8-OH-DPAT (F(15,90)=0.93; p=0.5387 n.s.; vehicle + 8-OH-DPAT, n = 4; DU-125530 + 8-OH-DPAT, n=4; Fig. 7D) (a moderate increase in extracellular 5-HT was noted soon after the injection, as a result of handling and injection stress; Adell et al., 1997).

The systemic administration of the SSRI fluoxetine produced higher increases of mPFC 5-HT concentration in KO mice compared to WT mice (genotype, F(1,8)=5.971; P<0.05; time, F(15,120)=14.713; p<0.0001; time x genotype interaction, F(15,120)=2.45; p<0.004; WT, n=5; KO, n=5; Fig. 7E), consistent with the hypothesis that activation of 5-HT_{1A} autoreceptors by SSRI offsets the increase in 5-HT concentration induced by SERT blockade. The systemic blockade of 5-HT_{1A} receptors by DU-125530 after fluoxetine administration significantly enhanced extracellular 5-HT levels in WT mice to a level similar to that achieved in 5-HT_{1A} KO mice. Two-way ANOVA revealed a significant time x genotype interaction (F(15,135)=2.60; p<0.002; WT, n=5; KO, n=6; Fig. 7F).

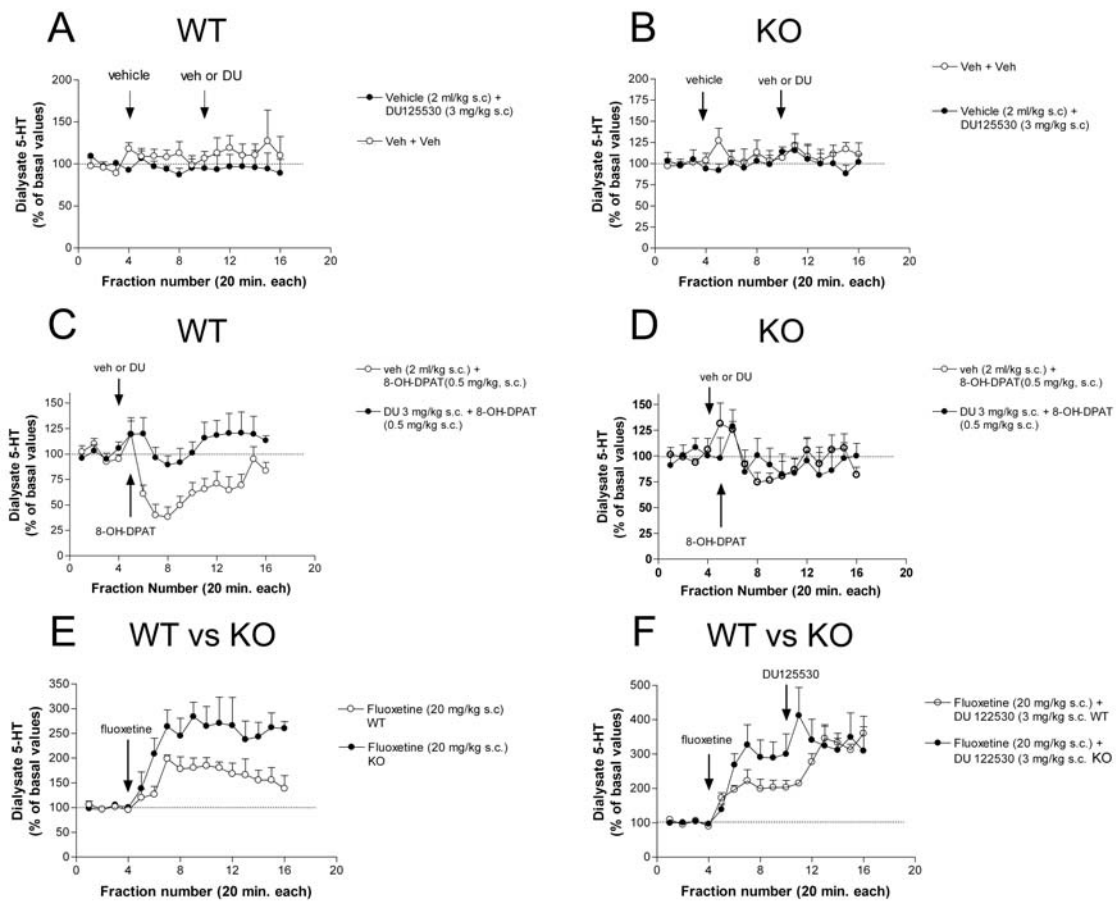


Figure 7. *In vivo* microdialysis experiments in wild type (WT) and 5-HT_{1A} knock out (KO) mice showing drug effects on mPFC 5-HT concentration. **A-B)** Systemic administration of DU-125530 on WT (left) and KO (right) mice had no effect on mPFC 5-HT concentration. **C)** Prevention by DU-125530 of the reduction in 5-HT output induced by systemic 8-OH-DPAT administration in WT mice. **D)** Lack of effects of systemic administration of 8-OH-DPAT and DU-125530 in KO mice. **E)** Comparison of the effects of systemic injections of fluoxetine in WT vs. KO mice. **F)** Augmentation of the effects of fluoxetine by DU-125530 in WT mice but not in KO mice. Note that the treatment of WT with fluoxetine + DU-125530 increases 5-HT concentration to that elicited by fluoxetine alone in the KO mice.

Clinical trial

Fifty-seven patients were screened and entered the study between May 2004 and November 2007. From those, seven had to be excluded due to placebo response, before randomization. Therefore, fifty patients with major depression diagnosis finally entered into the active phase. Twenty-five were randomly

assigned to fluoxetine plus DU125530 arm and twenty-five to fluoxetine plus placebo arm (see Figure 1 with the trial profile). No differences were found in any demographic or clinical variables between the two groups (see table 3).

Table 3. Demographic and clinical variables of the two groups of treatment (DU125530 = patients treated with fluoxetine + DU125530, Placebo = patients treated with fluoxetine + placebo).

Variables	DU125530 (N = 25)	PLACEBO (N = 25)	χ^2 / t	p
Gender (% females)	83.33	84	0.004	N.S.
Age	42.13 (11.48)	42.48(13.93)	0.936	N.S.
Familiar psychiatric history (% present)	64	36	3.74	N.S.
No previous depressive episode (%)	41,7	54,2	0.129	N.S.
Age at first depressive episode	34.04 (14.3)	38.22 (15.47)	0.931	N.S.
Number of depressive episodes (including current episode)	2.59 (2.77)	1.74 (1.14)	1.360	N.S.
Concomitant treatment (% patients taking)				
No treatment	25	35.71		
Benzodiazepines	56.25	28.57	2.445	N.S.
Hypnotic	12.5	21.42		
Benzodiazepines plus hypnotic	6.25	14.28		
HDRS	24,75 (3.66)	25.6 (4.36)	0.737	N.S.
MADRS	31.29 (4.51)	32.64 (5.14)	0.973	N.S.
CGI	4.73 (0.63)	4.67 (0.658)	0.308	N.S.

Neither the percentage of first depressive episode patients (51% receiving DU125530, 48% receiving placebo) nor the percentage of melancholic features (23% and 14% respectively) differed between groups. The episode length ranged from one to 6 months for a 63,6% of patients receiving DU125530 and a 54,5% of patients treated with placebo. Treatment was generally well tolerated with no differences in the presence of adverse events between the two groups (32% DU125530, 16% placebo, $\chi^2 = 1,75$; $p=0.16$). Finally, five patients were withdrawn from the clinical trial because of the side effects, and two due to patient's decision. Biochemical parameters and vital signs were stable during the study and with no differences throughout the trial between groups ($p>0.1$). Plasma concentration of fluoxetine at day 14 and day 42 did not differ between groups. At day 14, fluoxetine mean values

were 57,52 ng/l (SD=31,73) in the fluoxetine + DU125530 group, and 66,4 ng/l (SD= 31,86) in the fluoxetine + placebo group (t=-0.933, p=0.356). At day 42, these mean values were 86,1 ng/l (SD=46,27) in the fluoxetine+ DU125530 group, and 119 ng/l (SD= 76,27) in the fluoxetine + placebo group (t= -1,690, p=0,099). Neither there were differences within groups when plasma concentration were compared longitudinally (p>0.1), obtaining thus steady concentration from the beginning.

Regarding the main analysis with HDRS scores, the repeated measures ANOVA did not show any significant effect or time x group interaction (F=0.3, df=1,47, p=0.9 and F=0.6, df=7,329, p=0.6, respectively). Figure 8 displays the cumulative percentages of sustained response at every time-point for both groups. The response rate of patients receiving DU125530 + fluoxetine overlapped with patients receiving placebo + fluoxetine. The survival analysis confirmed the absence of differences between the two treatment arms, being mean survival times until first response 44 days for DU125530 and 37 days for placebo (Log rank, $\chi^2=0.3$, p=0.6).

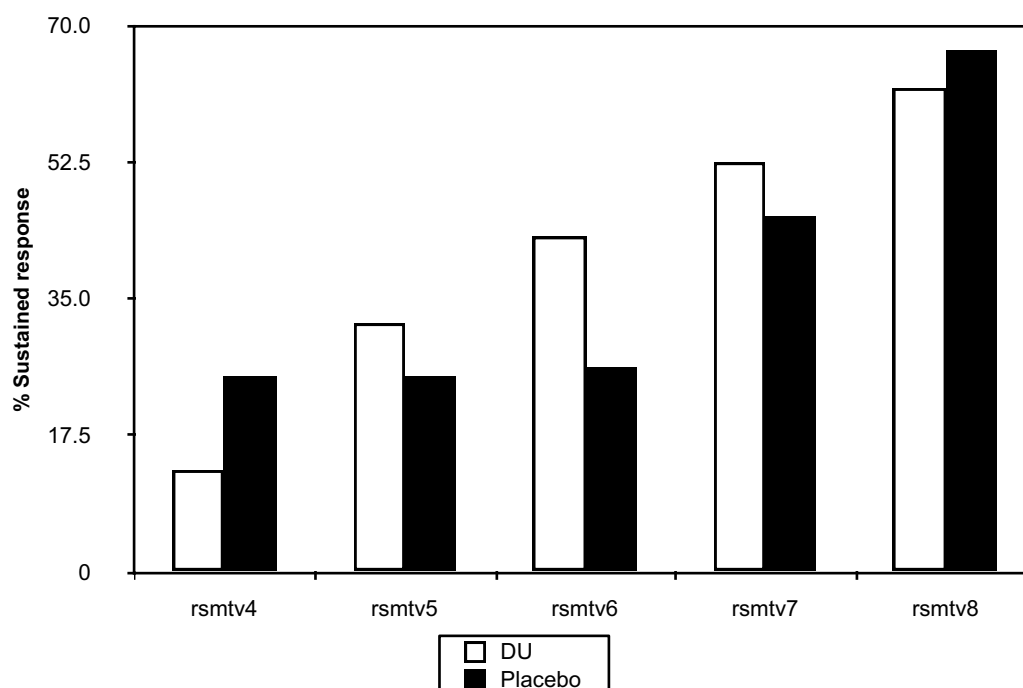


Figure 8. Cumulative percentages of sustained response at every time-point assessed by the Hamilton Depression Rating Scale (HDRS) for both groups (DU = Fluoxetine + DU 125530; Placebo = Fluoxetine + Placebo). The repeated measures ANOVA did not show any significant effect or time x group interaction. See text for statistical result.

Discussion

The present study shows that DU-125530 is a high-affinity and silent 5-HT_{1A} antagonist in rodent brain that prevents and reverses the actions of 5-HT and 5-HT_{1A} agonists (8-OH-DPAT) at pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. It binds to rat and human 5-HT_{1A} receptors with low nM affinity and it antagonizes a) the suppression of 5-HT neuron activity evoked by 8-OH-DPAT and SSRI and b) the reduction in 5-HT release evoked by 8-OH-DPAT and SSRI. As a consequence, it augments the increase in 5-HT levels produced by SSRI in rats and mice by preventing the 5-HT_{1A}-mediated negative feed-back that limits the increase in forebrain extracellular 5-HT induced by the SSRI (Artigas et al., 1996). Despite these excellent pharmacological properties as 5-HT_{1A} receptor antagonist, DU-125530 does not accelerate nor enhance the antidepressant action of fluoxetine.

Preclinical studies

Overall, the preclinical data supports that DU-125530 interacts with 5-HT_{1A} autoreceptors and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in a manner similar to that of the prototypical antagonist WAY-100635 (Fletcher et al., 1996; Forster et al., 1995), which unlike DU-125530 is not available for human use. Indeed, DU-125530 blocked the direct (8-OH-DPAT) and 5-HT-mediated (paroxetine or fluoxetine) suppressing actions on a) 5-HT neuron activity, b) 5-HT release in rats and mice, as previously observed with WAY-100635 using the same experimental conditions (Romero and Artigas, 1997; Casanovas et al., 1999; Celada et al., 2001; Romero et al., 2003; Lladó-Pelfort et al., 2009). Moreover, DU-125530 augmented the increase in extracellular 5-HT induced by SSRI to an extent comparable to that produced by WAY-100635 (Romero and Artigas, 1997; Hervás et al., 1998). Interestingly, the dose used in the present preclinical experiments appears to fully occupy 5-HT_{1A} autoreceptors, as 1) no further antagonism was produced by WAY-100635 administration, and 2) the 5-HT increase induced by fluoxetine + DU-125530 on extracellular 5-HT was identical to that produced by fluoxetine alone in 5-HT_{1A} KO mice.

The ability of DU-125530 to antagonize postsynaptic 5-HT_{1A} receptors is shown by: a) pilot electrophysiological experiments (reversal of 8-OH-DPAT-

induced effects on mPFC pyramidal neurons; an effect depending on postsynaptic 5-HT_{1A} receptor activation; Lladó-Pelfort et al., 2009), and b) microdialysis experiments in which the systemic administration of DU-125530 significantly reversed the reduction in 5-HT release evoked by the activation of mPFC 5-HT_{1A} receptors by local 8-OH-DPAT administration (Celada et al., 2001). Thus, the present preclinical data indicates that:

1. DU-125530 displays nM affinity for pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors
2. DU-125530 is a full pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptor antagonist in rodent brain
3. DU-125530 cancels the 5-HT_{1A}-mediated negative feedback, augmenting the effect of SSRIs on extracellular 5-HT concentration.

Clinical trial

To our knowledge, this is the first clinical trial assessing the effects of the addition of a selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist to a SSRI antidepressant. Previous clinical trials based on the 5-HT_{1A} receptor augmentation strategy (Artigas, 1993; Artigas et al., 1996) have used the non-selective β -adrenoceptor/5-HT_{1A} partial agonist pindolol. These studies have revealed a beneficial effect of pindolol on the acceleration of antidepressant response (Pérez et al., 1997; Bordet et al., 1998; Zanardi et al., 1998; Portella et al., 2010; see review in Artigas et al., 2001 and meta-analysis in Ballesteros and Callado, 2004). However, several remarkable differences exist between pindolol and DU-125530. PET scan studies have revealed a preferential occupancy of presynaptic receptors vs. postsynaptic 5-HT_{1A} receptors by pindolol using ¹¹C-WAY-100635 as a ligand (Martinez et al., 2001; Artigas et al., 2001). However, DU-125530 shows a comparable occupancy of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors using the same ligand (Rabiner et al., 2002). Hence, whereas pindolol occupies ca. 40% of presynaptic and 18% of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors at the dose used in clinical studies (Martinez et al., 2001), the occupancy of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors by the

dose of DU-125530 used herein (20 mg/day) is much higher (e.g., 50-60% in most individuals tested) (Rabiner et al., 2002). These studies are paralleled by electrophysiological (Romero et al., 1996) and histological (Serrats et al., 2004) studies showing a preferential occupancy of pre- vs. postsynaptic 5-HT_{1A} receptors by pindolol. Hence, [³⁵S]GTPγS studies indicated a significantly higher potency of pindolol for 5-HT_{1A} autoreceptors than for postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in the hippocampus and entorhinal cortex in rat, guinea pig and human brain (Serrats et al., 2004).

The failure of DU-125530 to accelerate or augment the antidepressant action of fluoxetine may be attributed to, among other reasons, the simultaneous blockade of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. Hence, 5-HT_{1A} autoreceptor blockade would enhance extracellular 5-HT, thus enhancing the antidepressant effect of fluoxetine whereas postsynaptic 5-HT_{1A} receptor blockade may cancel the benefits of presynaptically enhancing serotonergic function. Indeed, antidepressant drugs of different classes evoke a tonic activation of hippocampal postsynaptic 5-HT_{1A} receptors (Haddjeri et al., 1998; see Blier and Ward, 2003 for review). Additionally, pharmacokinetic factors may also be involved in the different effect of both drugs, since DU-125530 was administered once daily whereas pindolol was administered three times a day, due to its short half-life, thus producing a more persistent occupancy of 5-HT_{1A} receptors. Moreover, pindolol is a partial 5-HT_{1A} receptor agonist, which increases the extracellular concentration of catecholamines when given alone (see Artigas et al., 2001 for review), an effect not produced by silent 5-HT_{1A} antagonists, such as WAY-100635.

In summary, the present study shows that DU-125530 is an excellent antagonist of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. Despite this, its addition to fluoxetine did not accelerate nor enhance its efficacy in depressive patients. These results show that simultaneous blockade of pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors does not improve the antidepressant actions of SSRI, indicating that postsynaptic 5-HT_{1A} receptor activation is a required step to increase the antidepressant effects of SSRIs.

Acknowledgements

This study was supported by grants SAF 2007-62378 and La Marató TV3. Support from Advancell is also acknowledged. LL-P is supported by a JAE fellowship from CSIC. P.C. is supported by the Researcher Stabilization Program of the Health Department of the Generalitat de Catalunya. We thank Judith Ballart, Leticia Campa and Mónica Gutiérrez for skilful technical assistance.

References

Adell A, Casanovas JM, Artigas F (1997) Comparative study in the rat of the actions of different types of stress on the release of 5-HT in raphe nuclei and forebrain areas. *Neuropharmacology*.36(4-5):735-41.

Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G, Artigas F (2004) Co-expression and in vivo interaction of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 14: 281-299.

Andlin-Sobocki P, Wittchen HU 2005 Cost of affective disorders in Europe. *Eur J Neurol*. 1:34-8.

Artigas, F (1993) 5-HT and antidepressants: new views from microdialysis studies. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 262.

Artigas, F, Perez V, Alvarez E (1994) Pindolol induces a rapid improvement of depressed patients treated with serotonin reuptake inhibitors. *Arch. Gen. Psychiatry* 51, 248–251

Artigas F, Romero L, de Montigny C et al. (1996) Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci* 19:378-383.

Artigas F, Celada P, Laruelle M, Adell A (2001) How does pindolol improve antidepressant action? *Trends Pharmacol Sci.* 22(5):224-8. Review.

Artigas F, Adell A, Celada P (2006) Pindolol augmentation of antidepressant response. *Current Drug Targets* 7: 139-147.

Ballesteros J, Callado LF (2004) Effectiveness of pindolol plus serotonin uptake inhibitors in depression: a meta-analysis of early and late outcomes from randomised controlled trials. *J Affect Disord.* 79:137-147.

Bel, N and Artigas, F (1992) Fluvoxamine preferentially increases extracellular 5-hydroxytryptamine in the raphe nuclei: an in vivo microdialysis study. *Eur. J. Pharmacol.*, 229, 101-103.

Bel N, Artigas F (1993) Chronic treatment with fluvoxamine increases extracellular serotonin in frontal cortex but not in raphe nuclei. *Synapse.*15(3): 243-5.

Blier, P, De Montigny, C (1994) Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol. Sci.* 15, 220-226.

Blier P, Bergeron R (1995) Effectiveness of pindolol with selected antidepressant drugs in the treatment of major depression. *J Clin Psychopharmacol.* 15:217-222.

Blier P, Ward NMN (2003) Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? *Biol Psychiatry* 53:193-203

Bordet R, Thomas P, Dupuis B (1998) Effect of pindolol on onset of action of paroxetine in the treatment of major depression: intermediate analysis of a double-blind, placebo-controlled trial. *Réseau de Recherche et d'Expérimentation Psychopharmacologique. Am J Psychiatry.* 155(10): 1346-51.

Bortolozzi A, Díaz-Mataix L, Scorza MC, Celada P, Artigas F (2005) The activation of 5-HT_{2A} receptors in prefrontal cortex enhances dopaminergic activity. *J Neurochem*, 25(47):10831-43.

Casanovas JM, Hervás I, Artigas F (1999) Postsynaptic 5-HT_{1A} receptors control 5-HT release in the rat medial prefrontal cortex. *NeuroReport* 10:1441–1445.

Celada P, Puig MV, Casanovas JM, Guillazo G, Artigas F (2001) Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: Involvement of 5-HT_{1A}, GABA(A), and glutamate receptors. *J Neurosci* 21: 9917-9929.

Danish University Antidepressant Group (1986) Citalopram: clinical effect profile in comparison with clomipramine. A controlled multicenter study. *Psychopharmacol.*,90, 131-138.

Danish University Antidepressant Group (1990) Paroxetine: a selective serotonin reuptake inhibitor showing better tolerance, but weaker antidepressant effect than clomipramine in a controlled multicenter study. *J. Affect. Disord.*,18, 289-299.

Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ (1997) A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry.* 54; 597-606.

Fletcher A, Forster EA, Bill DJ, Brown G, Cliffe IA, Hartley JE, Jones DE, McLenachan A, Stanhope KJ, Critchley DJ, Childs KJ, Middlefell VC, Lanfumey L, Corradetti R, Laporte AM, Gozlan H, Hamon M, Dourish CT (1996) Electrophysiological, biochemical, neurohormonal and behavioural studies with WAY-100635, a potent, selective and silent 5-HT_{1A} receptor antagonist. *Behav Brain Res.* 73(1-2):337-53

Forster EA, Cliffe IA, Bill DJ, Dover GM, Jones D, Reilly Y, Fletcher A (1995) A pharmacological profile of the selective silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY-100635. *Eur J Pharmacol.* 281(1):81-8.

Haddjeri, N.; Blier, P. and de Montigny, C (1998) Acute and long-term actions of the antidepressant drug mirtazapine on central 5-HT neurotransmission. *J. Affect. Disorders.*, 51, 255-266.

Hervás I, Bel N, Fernández AG, Palacios JM, Artigas F (1998) In vivo control of 5-hydroxytryptamine release by terminal autoreceptors in rat brain areas differentially innervated by the dorsal and median raphe nuclei. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 358(3):315-22.

Hervás I, Vilaró MT, Romero L, Scorza MC, Mengod G, Artigas F (2001) Desensitization of 5-HT(1A) autoreceptors by a low chronic fluoxetine dose effect of the concurrent administration of WAY-100635. *Neuropsychopharmacology*. 24(1):11-20.

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.

Lladó-Pelfort L, Santana N, Artigas F, Celada P (2009) Postsynaptic 5-HT_{1A} Receptors Are Involved in the Excitatory Action of 8-OH-DPAT on Prefrontal Cortex Pyramidal Neurons. 748.2. 2009 Neuroscience Meeting Planner. Society for Neuroscience: Chicago, IL. Online.

Lladó-Pelfort L, Assié MB, Newman-Tancredi A, Artigas F, Celada P (2010) Preferential in vivo action of F15599, a novel 5-HT_{1A} receptor agonist, at postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *British Journal of Pharmacology* (in press).

Martinez, D.; Hwang, D.R.; Mawlawi, O.; Slifstein, M.; Kent, J.; Simpson, N.; Parsey, R.V.; Hashimoto, T.; Huang, Y.Y.; Shinn, A.; VanHeertum, R.; Abidargham, A.; Caltabiano, S.; Malizia, A.; Cowley, H.; Mann, J.J. and Laruelle, M (2001) Differential occupancy of somatodendritic and postsynaptic 5HT(1A) receptors by pindolol: a dose-occupancy study with [¹¹C]WAY 100635 and positron emission tomography in humans. *Neuropsychopharmacology*, 24, 209-229.

Mengod G, Vilaró MT, Raurich A, López-Giménez JF, Cortés R, Palacios JM (1996) 5-HT receptors in mammalian brain: receptor autoradiography and in situ hybridization studies of new ligands and newly identified receptors. *Histochem J* 28:747-758.

Murray CJ, Lopez AD (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 349(9064): 1498-1504.

Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press: Sydney.

Pazos A, Palacios JM (1985) Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res* 346:205-230.

Pérez, V. Gilaberte I, Faries D, Alvarez E, Artigas F (1997) Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of pindolol in combination with fluoxetine antidepressant treatment. *Lancet* 349, 1594–1597.

Pérez V, Soler J, Puigdemont D, Alvarez E, Artigas F (1999) A double-blind, randomized, placebo-controlled trial of pindolol augmentation in depressive patients resistant to serotonin reuptake inhibitors. *Grup de Recerca en Trastorns Afectius. Arch Gen Psychiatry.* 56(4):375-9.

Portella M, De Diego-Adeliño J, Ballesteros J, Puigdemont D, Oller S, Santos B, Álvarez E, Artigas F, Pérez V (2010) Can pindolol really accelerate and enhance the SSRI antidepressant effect? A randomised clinical trial and a meta-analysis on non-resistant depressive patients. *J. Clinical Psychiatry.* Submitted and accepted.

Puig MV, Celada P, Diaz-Mataix L, Artigas F (2003) In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT_{2A} receptors: relationship to thalamocortical afferents. *Cereb Cortex* 13, 870-882.

Rabiner EA, Wilkins MR, Turkheimer F, Gunn RN, Udo de Haes J, de Vries M, Grasby PM (2002) 5-Hydroxytryptamine_{1A} receptor occupancy by novel full antagonist 2-[4-[4-(7-chloro-2,3-dihydro-1,4-benzodioxyn-5-yl)-1-piperazinyl]butyl]-1,2-benzisothiazol-3-(2H)-one-1,1-dioxide: a [¹¹C][O-methyl-³H]-N-(2-(4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl)ethyl)-N-(2-pyridinyl)cyclohexanecarboxamide trihydrochloride (WAY-100635) positron emission tomography study in humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 301(3):1144-50.

Romero L, Artigas F (1997) Preferential potentiation of the effects of serotonin uptake inhibitors by 5-HT_{1A} receptor antagonists in the dorsal raphe pathway: role of somatodendritic autoreceptors. *J Neurochem.* 68(6):2593-603.

Romero L, Bel N, Artigas F, de Montigny C, Blier P (1996) Effect of pindolol at pre- and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors: In vivo microdialysis and

electrophysiological studies in the rat brain. *Neuropsychopharmacology* 15: 349-360.

Romero L, Celada P, Martín-Ruiz R, Díaz-Mataix L, Mourelle M, Delgadillo J, et al. (2003) Modulation of serotonergic function in rat brain by VN2222, a 5-HT reuptake inhibitor and 5-HT_{1A} receptor agonist. *Neuropsychopharmacology* 28:445-56.

Serrats J, Artigas F, Mengod G, Cortés R (2004) An autoradiographic study of the influence of pindolol upon [³⁵S]GTPγ binding in rat, guinea pig and human brain. *Int J Neuropsychopharmacol.* 7(1):27-34.

Stahl SM, Nierenberg AA, Gorman JM (2001) Evidence of early onset of antidepressant effect in randomized controlled trials. *J Clin Psychiatry.* 62:17-23; discussion 37-40.Rev.

Stoudemire A, Frank R, Hedemark N, Kamlet M, Blazer D (1986) The economic burden of depression. *Gen Hosp Psychiatry.* 8(6):387-94.

Wang RY, Aghajanian GK (1977) Antidromically identified serotonergic neurons in the rat midbrain raphe: evidence for collateral inhibition. *Brain Res.* 132, 186-193.

Zanardi, R. Artigas F, Franchini L, Sforzini L, Gasperini M, Smeraldi E, Perez J (1997) How long should pindolol be associated with paroxetine to improve the antidepressant response? *J. Clin. Psychopharmacol.* 17, 446–450

Zanardi, R. Franchini L, Gasperini M, Lucca A, Smeraldi E, Perez J (1998) Faster onset of action of fluvoxamine in combination with pindolol in the treatment of delusional depression: a controlled study. *J. Clin. Psychopharmacol.* 18, 441–446.

Discussió general

Els resultats presentats en aquesta tesi mostren com fàrmacs agonistes del receptor 5-HT_{1A} poden excitar les neurones piramidals d'EPF (treballs 1-3) a través d'un mecanisme que segurament implica les interneurons GABAèrgiques de la mateixa regió cerebral (treball 1). A més, existeixen diferències regionals importants entre els fàrmacs emprats (treballs 1-4): l'F15599 és l'únic agonista del receptor 5-HT_{1A} amb activitat preferent sobre els heteroreceptors postsinàptics i no sobre els autoreceptors dels nuclis del rafe. Aquests resultats plantegen l'existència -a banda de les diferències regionals ja conegudes- de diferències en el receptor 5-HT_{1A} segons el tipus cel·lular.

Per altra banda, el treball 5 mostra com un antagonista del receptor 5-HT_{1A} que en estudis preclínic és capaç d'antagonitzar respostes degudes a l'activació dels receptors presinàptics i postsinàptics així com de potenciar l'efecte de la fluoxetina sobre l'alliberament de serotonina cortical, és per altra banda incapaç de potenciar l'efecte antidepressiu de la fluoxetina en un estudi clínic en pacients depressius.

SELECTIVITAT REGIONAL

Diferents treballs d'aquesta tesi (1-3) mostren que els agonistes 5-HT_{1A} utilitzats difereixen en les àrees per les quals mostren accions preferents.

Tradicionalment s'havia suggerit que els agonistes 5-HT_{1A} com les azapirones activaven preferentment els autoreceptors de rafe [201, 376] degut a l'existència d'una **reserva de receptors**¹³ en aquesta àrea [717, 718]. Aquests fàrmacs es comportaven com a agonistes totals a rafe i com a agonistes parcials a zones com l'hipocamp i es creia que la major eficàcia dels agonistes en una zona comparada amb altres era purament produïda per diferències quantitatives en el receptor. Posteriorment s'ha observat que, en comptes de ser una propietat que depèn del receptor, depèn de l'agonista que s'utilitza ja que existeixen, per exemple, agonistes parcials per totes dues estructures com l'asenapina [719] o agonistes totals a rafe i

¹³ El concepte de reserva de receptors fou proposat per Stephenson, R.P., *A modification of receptor theory*. Br J Pharmacol Chemother, 1956. 11(4): p. 379-93. Estudiant les accions dels anàlegs de l'acetilcolina, trobà que aquests eren capaços de provocar respostes màximes a molt baixa ocupació dels receptors, suggerint que aquest sistema tenia reserva de receptors. L'existència de reserva de receptors no implicava que hi hagués una subdivisió funcional entre grups de receptors, sinó que la quantitat de receptors disponibles era més gran que el que es necessitava per provocar la resposta màxima.

hipocamp com el BAY x 3702 [720]. A més, el treball 2 mostra com un nou agonista 5-HT_{1A}, l'F15599, pot provocar efectes deguts a l'activació d'heteroreceptors postsinàptics (excitacions de les neurones piramidals d'EPF) a dosis a les que encara no s'observen efectes degut a l'activació dels autoreceptors presinàptics dels nuclis del rafe (inhibició de les neurones serotoninèrgiques de NRD).

Com s'ha presentat en la introducció d'aquesta tesi, el receptor 5-HT_{1A} mostra importants diferències regionals sobretot pel que fa a les subunitats G α a les que es troba acoblat. Així, en escorça i hipocamp el receptor 5-HT_{1A} es pot acoblar a G α_0 , i G α_{i3} , tot i que en hipocamp sembla que el receptor mostra preferència per G α_0 [337]. En canvi en el rafe, l'estudi de Mannoury la Cour [337] només detecta acoblament del receptor 5-HT_{1A} amb la subunitat G α_{i3} .

Fins fa uns quinze anys s'assumia que diferents agonistes podien tenir perfils farmacològics diferents en termes de afinitat (l'atracció entre lligand i el seu receptor) i eficàcia (la producció d'una resposta), però que tots activaven les mateixes vies de transducció de senyal, que eren dependents del receptor. A més, es considerava que els receptors només existien en un estat inactiu (R) i un estat actiu (R^{*}). Els agonistes canviarien l'equilibri cap a l'estat actiu, mentre que els agonistes inversos farien el contrari.

Actualment, resultats de diversos estudis de diferents receptors de neurotransmissors com els cannabinoids [721], els serotoninèrgics 2A i 2C [722] i els beta-adrenèrgics [723] han mostrat que diferents agonistes actuant sobre el mateix receptor poden activar de manera selectiva/preferent diferents vies de transducció de senyal [724, per revisió: 725]. Aquest fenomen s'ha anomenat *senyalització dirigida per agonista (agonist directed trafficking)* [726] o *selectivitat funcional* i ha estat demostrat tant en sistemes heteròlegs com en sistemes no manipulats [721]. Diferents lligands produïrien diferents conformacions del receptor [727-730]. La unió del receptor a les proteïnes G depèn de les afinitats mútues i de les proporcions de les molècules que hi participen. Per tant, diferents conformacions del receptor podrien afavorir diferents proteïnes G, el que es traduiria en l'activació preferent de determinades vies de transducció de senyal. Per altra banda, diferents conformacions del receptor també es poden veure reflexades en diferents conformacions de la proteïna G acoblada a ell, i per tant, dels mecanismes de transducció que s'acoblen a aquestes proteïnes G.

Un exemple de la importància funcional d'aquest concepte el trobem en el cas dels agonistes 5-HT_{2A} al·lucinògens i no al·lucinògens [731]: mentre els agonistes no al·lucinògens regulen la via acoblada a fosfolipasa C (PLC), les drogues al·lucinògenes també actuen en les proteïnes G sensibles a toxina pertussis G(i/o) i Src.

Una de les premisses per a la senyalització dirigida per agonista és que el receptor es pugui acoblar a diferents mecanismes de transducció de senyal, com és el cas del receptor 5-HT_{1A}. A més, l'activació de les diferents vies també dependrà de si els mecanismes de transducció s'expressen en una determinada àrea o tipus cel·lular, així com de les proporcions dels diferents mecanismes de transducció i efectors. La complexitat en l'acoblament del receptor 5-HT_{1A}, evidenciada en sistemes recombinants i en sistemes no manipulats [per revisió: 338], encaixa amb la teoria de senyalització de receptors de tràfic dirigit per agonista.

La combinació de les diferències regionals de l'acoblament del receptor 5-HT_{1A} amb la senyalització dirigida per agonista (que dependrà dels mecanismes de transducció disponibles en cada àrea), permet un ampli ventall de possibilitats de senyalització diferent en cada àrea cerebral segons l'agonista utilitzat.

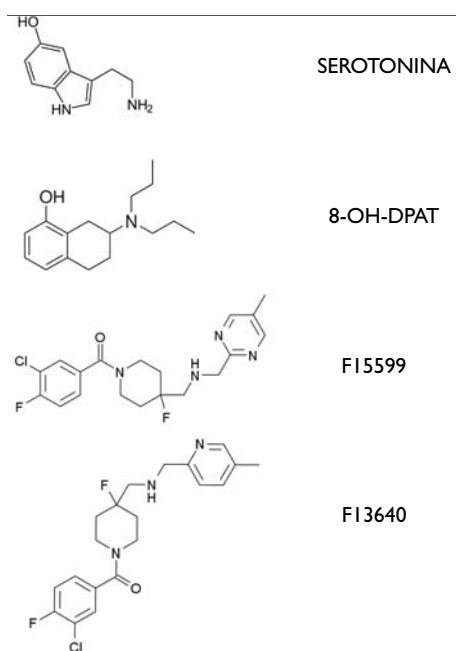
Dels treballs d'aquesta tesi que mostren agonistes del receptor 5-HT_{1A} amb perfils d'acció preferent diferents pel que fa a les àrees cerebrals on actuen, cal destacar el cas de l'F15599, el qual, a diferència dels altres fàrmacs estudiats, és el primer agonista 5-HT_{1A} descrit que a dosis baixes actua preferentment sobre l'heteroreceptor postsinàptic i no sobre l'autoreceptor dels nuclis del rafe.

Estudis de biologia molecular han mostrat que l'F15599 estimula l'expressió de *c-fos* a l'escorça frontal, el sèptum i l'hipotàlem però molt poc al NRD, el NRM, l'escorça entorinal, l'hipocamp o el globus pàl·lid [732]. En canvi, són necessàries dosis molt més altes d' F13640 per regular pERK1/2 en l'EPF i l'hipotàlem comparat amb els efectes dependents del receptor dels nuclis del rafe. En el cas de la 8-OH-DPAT, aquesta és activa sobre la formació de pERK1/2 en dosis similars a les diferents regions [733]. Així, l'F15599 difereix de la 8-OH-DPAT i l'F13640, mostrant preferència per actuar sobre el receptor 5-HT_{1A} postsinàptic d'escorça també a nivell molecular [732].

Així, els diferents agonistes podrien activar preferentment vies de transducció de senyals disponibles en regions cerebrals determinades. Això podria ser la base de les diferències en la selectivitat regional dels fàrmacs emprats en aquesta tesi (treballs 1-4).

SENYALITZACIÓ DIRIGIDA PER AGONISTA

L'estimulació dels nuclis del rafe i, per tant, l'alliberament de serotonina endògena, produeix majoritàriament inhibicions de les neurones piramidals d'EPF a través de l'acció de la serotonina sobre el receptor 5-HT_{1A} [221, 734, 735]. Tres dels treballs (1, 2, 3) presentats en aquesta tesi mostren que les respostes majoritàries de les neurones piramidals d'EPF després



SEROTONINA

8-OH-DPAT

F15599

F13640

Fig 21. Estructura molecular de la serotonina i els agonistes 5-HT_{1A} utilitzats en aquesta tesi.

de l'administració sistèmica de diferents agonistes 5-HT_{1A} (Fig. 21) són, paradoxalment, excitacions. Tant les inhibicions produïdes per l'agonista endogen (serotonina) com les respostes produïdes per l'administració sistèmica d'agonistes exògens són revertides per l'antagonista específic del receptor 5-HT_{1A} WAY100635, sent, per tant, mediatades per l'acció sobre el mateix receptor 5-HT_{1A}. Aquest fet fa excloure que els diferents perfils d'afinitat que mostren els agonistes estudiats (Taula 10) siguin la causa dels diferents patrons de resposta. Llavors, la pregunta que sorgeix és com diferents agonistes 5-HT_{1A} poden produir diferents patrons de resposta en les neurones piramidals d'EPF actuant sobre el mateix receptor.

Taula 10. Comparació d'afinitats dels agonistes 5-HT_{1A} emprats en la present tesi. Afinitats determinades *in vitro* i expressades com pK_i ± SEM. Modificat de Newman-Tancredi [732] i Colpaert [855].

Receptor	Teixit	F15599	F13640	(+)8-OH-DPAT
h 5-HT _{1A}	Cèl·lules CHO	8.57 ± 0.08	9.49 ± 0.18	9.50 ± 0.03
r 5-HT _{1A}	Hipocamp rata	8.47 ± 0.08	9.07 ± 0.05	9.15 ± 0.11
r 5-HT _{1B}	Escorça rata	< 5	< 5	5.28 ± 0.18
r 5-HT _{2A}	Escorça rata	< 5	< 5	< 5
p 5-HT _{2C}	Escorça porc	< 5	< 5	5.12 ± 0.05
r α ₁	Escorça rata	< 5	< 5	5.82 ± 0.12
r α ₂	Escorça rata	< 5	< 5	6.52 ± 0.04
r D ₁	Estriat rata	< 5	< 5	< 5
r D ₂	Estriat rata	< 5	< 5	6.08 ± 0.03

Seguint la idea de la selectivitat funcional o senyalització dirigida per agonista, dades recents [341] mostren l'existència de senyalització dirigida per lligand en l'acoblament de les proteïnes G amb el receptor 5-HT_{1A} de rafe en teixit cerebral no manipulat. Mentre la 8-OH-DPAT fa que el receptor 5-HT_{1A} s'acobli preferentment a proteïna G amb subunitat Gα_{i3}, la buspirona produeix que el receptor s'acobli a proteïnes amb subunitats Gα_{i3}, Gα_o i Gα_{i2}.

Altres grups també han suggerit l'existència de senyalització dirigida per lligand pel receptor 5-HT_{1A} en sistemes heteròlegs [736].

En el cas d'alguns dels agonistes utilitzats en els treballs d'aquesta tesi, Newman-Tancredi [732] ha mostrat diferències en els mecanismes de transducció de senyal entre l'F15599, la (+)-8-OH-DPAT i la serotonina (Fig. 22). Les diferències en segons missatgers entre els diferents agonistes són mediades per proteïnes G, suggerint així que diferents subtipus de proteïnes G podrien ser les responsables dels diferents efectes per cada fàrmac. Aquesta observació és recolzada pel fet que cadascun dels agonistes mostra un perfil d'activació de proteïnes G específic. Mentre l'F15599 mostra preferència per activar G α_i (gairebé un ordre de magnitud major que per G α_o), la serotonina mostra potències similars per les dues subunitats de proteïnes G i la 8-OH-DPAT mostra perfils intermitjos.

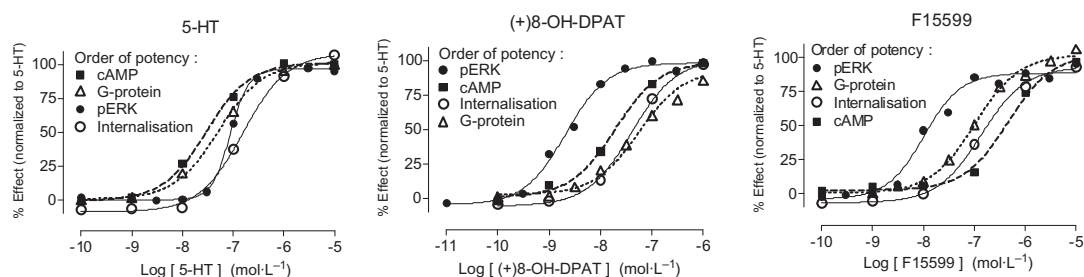


Fig 22. Influència de la serotonina, la (+)-8-OH-DPAT i l'F15599 en: l'estimulació de l'activació de proteïna G utilitzant [³⁵S]-GTP γ S en receptors h5-HT_{1A} en membranes de cèl·lules HeLa; la inhibició de l'acumulació d'AMPc en cèl·lules HeLa-h5-HT_{1A}; l'estimulació de les fosforilació d'ERK1/2 en receptors h5-HT_{1A} expressats en cèl·lules CHO; la inducció de la internalització en cèl·lules HEK-293. Dades expressades com a % de l'efecte induït per la màxima concentració de serotonina (10 μ M). Modificat de Newman-Tancredi [732].

Aquestes diferències en la selectivitat funcional entre els agonistes 5-HT_{1A} podrien ser la base dels diferents perfils d'acció de cadascun d'ells.

EXCITACIONS PRODUÏDES PER AGONISTES D'UN RECEPTOR INHIBITORI

Un dels resultats que criden l'atenció en aquests treballs és que l'agonisme d'un receptor inhibitori produeixi majoritàriament excitacions de les neurones piramidals d'EPF de projecció a ÀTV, especialment tenint en compte que: i) quan s'estimulen els nuclis del rafe i es produeix per tant un alliberament de serotonina endògena, aquesta produeix majoritàriament inhibicions de les neurones piramidals d'EPF a través del receptor 5-HT_{1A} [22I, 734, 735]; ii) estudis *in vitro* han mostrat accions inhibidores dels agonistes 5-HT_{1A} sobre l'activitat de les neurones piramidals d'EPF [250]; iii) l'aplicació iontoforètica d'agonistes 5-HT_{1A} a l'EPF inhibeix les neurones piramidals d'aquesta regió [220, 737].

Si l'agonista estigués actuant sobre els receptors 5-HT_{1A} de les neurones piramidals registrades hauríem de veure directament inhibicions almenys en un 50-60% de les neurones, ja que segons estudis d'histologia és aquest el percentatge de neurones piramidals d'EPF [223] o neurones piramidals d'EPF que projecten a l'ÀTV [738] que expressen aquest receptor. De fet, en els treballs 1,2 i 3 veiem també inhibicions de les neurones piramidals d'EPF després de l'administració d'agonistes del receptor 5-HT_{1A}, però o no són l'efecte majoritari (20% en el cas de l'F15599, 12% en el cas de l'F13640) o es produeixen preferentment de manera secundària a l'activació d'aquestes neurones (8-OH-DPAT).

Aquesta activació de les neurones piramidals d'EPF després de l'administració d'agonistes 5-HT_{1A} ja havia estat descrita en altres treballs on s'utilitzaven altres agonistes [739] o on no s'identificaven les neurones piramidals [740, 741]. Cal destacar la importància de la identificació de les neurones com a neurones de projecció a l'ÀTV en els presents treballs, ja que d'aquesta manera l'EPF podria estar controlant l'activitat de les neurones dopaminèrgiques i de retruc l'alliberament de dopamina a la mateixa EPF i a altres zones (veure *Control de la via dopaminèrgica cortical i esquizofrènia* d'aquest mateix capítol).

L'augment d'activitat de les neurones piramidals d'EPF es podria explicar per diferents hipòtesis. Ja que la serotonina té una influència inhibidòria a l'EPF, la disminució del to serotoninèrgic degut a l'acció dels agonistes 5-HT_{1A} sobre els autoreceptors de rafe, podria provocar la desinhibició de l'EPF per la retirada de la influència inhibidòria. En el cas de la 8-OH-DPAT aquesta no en sembla ser la causa, ja que en rates depletades de serotonina seguim observant l'excitació de les neurones piramidals d'EPF. El cas de l'F15599 tampoc recolza aquesta hipòtesi, ja que l'activació de les neurones piramidals d'EPF es produeix a dosis en les quals l'agonista encara no ha fet efecte en la descàrrega de les neurones serotoninèrgiques del rafe. El cas de l'F13640 és l'únic en el qual aquest mecanisme hi podria estar implicat.

Una altra possibilitat seria que els fàrmacs estiguessin fent efecte en àrees aferents a l'EPF com podria ser el cas de l'hipocamp. Però en el nostre model de registre en animal anestesiats amb hidrat de cloral, l'hipocamp és inactiu i no sembla canviar el seu estat després de l'administració d'agonistes 5-HT_{1A}, almenys en el cas de la 8-OH-DPAT. Tot i això, no es podrien descartar altres àrees aferents a l'EPF.

Finalment, una possibilitat discutida en el següent apartat seria que les interneurones GABAèrgiques participessin en l'excitació de les neurones piramidals d'EPF després de l'administració d'agonistes del receptor 5-HT_{1A}.

LES INTERNEURONES GABAÈRGIQUES PODRIEN TENIR UN PAPER CLAU EN LA DESINHIBICIÓ DE LES NEURONES PIRAMIDALS D'EPF

Un cop descartades les projeccions serotoninèrgiques i hipocampals com a possible explicació per a l'excitació de les neurones piramidals d'EPF després de l'administració d'agonistes 5-HT_{1A}, la hipòtesi més plausible és que l'activació de les neurones piramidals d'EPF sigui conseqüència de la inhibició de les neurones GABAèrgiques que les controlen. Aquestes interneurones GABAèrgiques podrien ser inhibides directament per l'acció de l'agonista sobre els seus receptors 5-HT_{1A} de membrana o indirectament per la supressió de projeccions excitatòries procedents d'àrees aferents a l'EPF. Aquest podria ser el cas de l'hipocamp, el qual expressa una gran quantitat d'aquest receptor, controla les neurones piramidals i GABAèrgiques d'EPF [708] i s'inhibeix després de l'administració d'agonistes 5-HT_{1A} en animal despert [742]. Però com ja hem descrit, l'hipocamp és inactiu i no sembla canviar el seu estat després de l'administració d'agonistes 5-HT_{1A} en el nostre model experimental. Així, semblaria que la desinhibició de les neurones piramidals d'EPF seria deguda a l'acció dels agonistes 5-HT_{1A} sobre els receptors 5-HT_{1A} de les interneurones GABAèrgiques.

Tot i que només un 20% d'interneurones GABAèrgiques expressa el receptor 5-HT_{1A} [223], en el treball 1 hem vist que la majoria d'interneurones GABAèrgiques FS responen amb inhibicions després de l'administració sistèmica d'agonista 5-HT_{1A}. Com ha estat descrit en la introducció, aquestes neurones formen xarxes molt interconnectades (entre interneurones del mateix tipus i de tipus diferents) mitjançant unions *gap* [743]. Per tant, l'efecte de l'agonista sobre una interneurona que expressi el receptor 5-HT_{1A} pot ser transmès a múltiples neurones en un radi que pot arribar a ser de centenars de micròmetres [96].

Cal recordar que les neurones registrades en el treball 1 corresponen a interneurones GABAèrgiques FS i diferents estudis han descrit que aquestes neurones corresponen al fenotip PV⁺, i per tant, formen part del grup de neurones perisomàtiques que exerceixen un fort control sobre la descàrrega de les neurones piramidals que regulen (Taula 11). Segons estudis immunohistoquímics, les entrades GABAèrgiques de neurones PV⁺ sobre les neurones piramidals així com els receptors 5-HT_{1A} gaudeixen d'una posició privilegiada en el con axònic de les neurones piramidals (Fig. 23) [216]. A més, aquestes neurones tenen arbres dendrítics molt ramificats, estimant-se que una sola neurona podria fer sinapsi en més de 200 neurones piramidals [744]. Així, la inhibició de les interneurones GABAèrgiques FS es podria veure reflexada en una desinhibició de les nombroses neurones piramidals que poden arribar a innervar i es podria magnificar per la presència d'unions *gap* entre diferents tipus d'interneurones GABAèrgiques.

Taula 11. Resum de les característiques morfològiques, neuroquímiques i electrofisiològiques dels principals tipus d'interneurons corticals.

Morfologia	Proteïnes d'unió a calci	Descàrrega	Relació amb piramidal
Cistell	La majoria PV	FS	Perisomàtiques. Sinapsis axo-dendrítiques i axo-somàtiques.
Canelobre	PV	FS	Perisomàtiques. Sinapsis axo-axòniques (segment inicial del con axònic de la piramidal).
Doble ram	CB o CR	No FS	Dendrítiques

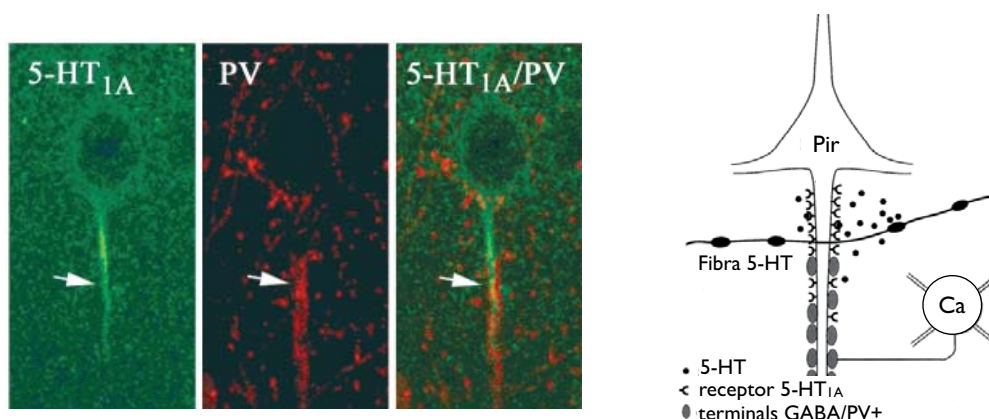


Fig 23. Esquerra: Imatges pseudoacolorides de microscopia confocal, cadascuna de la mateixa secció i camp del gir inferior temporal de mono, mostrant axons de neurones piramidals immunoreactius per 5-HT_{1A} en verd i terminals de neurones en canelobre PV+, en vermell. Dreta: Esquema il·lustratiu de la relació entre les fibres serotoninèrgiques, les connexions sinàptiques de les cèl·lules en canelobre (Ca) i la porció proximal de l'axó de les neurones piramidals amb marcatge immunohistoquímic pel receptor 5-HT_{1A}. Modificat de DeFelipe [216].

L'estimulació dels nuclis del rafe i, per tant, l'alliberament de serotonina endògena, produeix majoritàriament inhibicions, tant de les neurones piramidals d'EPF [221, 734, 735], com de les interneurons FS de l'EPF [265]. A més, altres estudis han mostrat que la serotonina redueix l'alliberament de GABA de les neurones FS corticals [745]. Tant les inhibicions de les neurones piramidals com les inhibicions de les interneurons GABAèrgiques FS induïdes per serotonina són mediatdes per un mecanisme dependent de l'activació del receptor 5-HT_{1A} [265, 735]. Per altra banda, l'administració sistèmica de 8-OH-DPAT excita les neurones piramidals d'EPF mentre que inhibeix les interneurons GABAèrgiques FS, tal com mostrem en el treball 1. La pregunta que sorgeix d'aquests resultats és per què, si tant la serotonina com la 8-OH-DPAT produeixen inhibicions de les neurones GABAèrgiques FS d'EPF, només els agonistes exògens són capaços de desinhibir les neurones piramidals d'EPF.

Es plantegen dues possibles explicacions: a) l'estimulació dels nuclis del rafe provoca un alliberament de serotonina massiu o més dirigit als llocs d'expressió de receptors serotoninèrgics de manera que la inhibició produïda pel receptor 5-HT_{1A} de les neurones piramidals superi la desinhibició que hauria de produir la inhibició de les interneurons GABAèrgiques, o b) els agonistes 5-HT_{1A} exògens mostren diferent sensibilitat en les neurones piramidals i en les interneurons GABAèrgiques mentre que la serotonina afecta per igual els dos tipus neuronals per un mecanisme de selectivitat funcional.

La qüestió que quedaria per resoldre és per què aquestes interneurons podrien ser més sensibles a l'acció de l'agonista 5-HT_{1A} exogen que les neurones piramidals. La majoria d'estudis d'acoblament a proteïnes G, mecanismes de transducció de senyals etc. estan fets considerant l'EPF una àrea homogènia, sense tenir en compte els diferents tipus cel·lulars que la formen. De la mateixa manera que diferents àrees poden tenir una sensibilitat diferent als mateixos fàrmacs, diferents tipus cel·lulars també podrien estar acoblats a mecanismes de transducció més sensibles, podrien tenir més expressió del receptor [746] o dels mecanismes de transducció o es podria afavorir la formació d'oligòmers etc. que fes que els agonistes 5-HT_{1A} fossin més efectius sobre el receptor de les interneurons GABAèrgiques.

Una altra possibilitat és que al ser neurones tan actives, les interneurons GABAèrgiques siguin més sensibles a l'acció d'un receptor inhibitori, com es dona en el cas dels antagonistes NMDA [747]. Això podria anar lligat amb la possibilitat que neurones piramidals i interneurons GABAèrgiques fossin igual de sensibles enfront d'agonistes del receptor 5-HT_{1A} però que en la piramidal es veiés més reflexat l'efecte de la retirada de to GABAèrgic per la inhibició de la GABAèrgica que no pas l'efecte sobre el receptor 5-HT_{1A}. S'ha de tenir present que el GABA és el principal neurotransmissor inhibitori, mentre que la serotonina actua principalment com a neuromodulador. En en aquest cas però, la serotonina endògena també hauria de desinhibir les neurones piramidals.

CONTROL DE LA VIA DOPAMINÈRGICA MESOCORTICAL I ESQUIZOFRÈNIA

Com hem vist en la introducció d'aquesta tesi, una de les hipòtesis monoaminèrgiques de l'esquizofrènia suggereix que hi podria haver una disfunció del sistema dopaminèrgic en la malaltia [440, 441]. Aquesta disfunció afectaria de manera diferent les vies mesocortical i mesolímbica, de manera que la primera patiria una hipofunció i la segona una hiperfunció [443]. La hipoactivitat de la via mesocortical podria ser la responsable de la simptomatologia negativa i cognitiva en pacients esquizofrènics.

concentracions baixes del fàrmac i una disminució de l'alliberament de dopamina a concentracions més altes en la mateixa EPF. A més, l'augment dels nivells extracel·lulars de dopamina cortical produït per l'aplicació local de concentracions baixes de l'agonista a EPF no es produeix si s'aplica alhora l'antagonista GABA_A bicuculina, mentre que es manté la disminució de l'alliberament de dopamina a concentracions més altes [501]. Aquest perfil de resposta concorda amb el perfil de dosi-resposta de les neurones piramidals d'EPF després de l'administració de de 8-OH-DPAT (treball 1) tant en la situació control (activacions de les neurones piramidals d'EPF que projecten a ÀTV a dosis baixes i inhibicions a dosis més altes) com amb el bloqueig local de les entrades GABA_A amb bicuculina (es conserven majoritàriament les inhibicions a dosis altes).

Estudis en els quals s'administren sistèmicament diferents antipsicòtics atípics (amb agonisme pel receptor 5-HT_{1A}) també han mostrat tant augments de l'activitat de les neurones dopaminèrgiques de projecció a EPF [750], com augments de l'alliberament de dopamina a EPF per un mecanisme dependent dels receptors 5-HT_{1A} segurament situats a la mateixa EPF [452, 500, 501, 751-753]. Es creu que aquest augment dels nivells de dopamina cortical és el que atorga als antipsicòtics atípics la capacitat de revertir alguns dels dèficits cognitius en pacients esquizofrènics, a diferència dels fàrmacs clàssics [754].

Com s'ha descrit en la introducció, les projeccions de l'EPF a l'ÀTV són unes de les principals entrades glutamatèrgiques a l'ÀTV. Si les alteracions en diferents nivells de l'EPF observades en l'esquizofrènia disminueixen la sortida excitatòria de les neurones piramidals d'EPF cap a l'ÀTV, això es podria traduir en una excitació reduïda de les neurones dopaminèrgiques d'aquesta àrea i podria portar a alteracions en el sistema dopaminèrgic, la innervació dopaminèrgica de l'EPF [755], l'alliberació de dopamina a l'EPF i canvis en expressió de receptors. El receptor D₁ de dopamina ha estat bastament relacionat amb la WM [per revisió: 756]. Una estimulació deficient d'aquest receptor podria portar a la sobrerregulació compensatòria del receptor D₁ descrita en estudis de PET en pacients esquizofrènics i correlacionada inversament amb el rendiment en tasques de WM [757]. En un estudi recent, Elsworth [758] mostra com la clozapina és capaç de revertir la disminució de la transmissió dopaminèrgica a EPF provocat per l'administració crònica d'antagonistes NMDA (model animal d'esquizofrènia) a dosis que són també efectives revertint els dèficits cognitius d'aquest model.

Totes aquestes evidències junt amb els resultats dels treballs d'aquesta tesi suggereixen que l'activació dels receptors 5-HT_{1A} postsinàptics, segurament situats en les interneurones GABAèrgiques d'EPF, produeix una desinhibició de les neurones piramidals d'EPF que projecten a l'ÀTV. Aquesta desinhibició provocaria l'activació de les neurones

dopaminèrgiques de la via mesocortical, augmentat així l'alliberament de dopamina a l'EPF i normalitzant la neurotransmissió dopaminèrgica en aquesta àrea, important en la modulació de funcions cognitives com la memòria de treball.

Per altra banda, la interacció preferent de l'F15599 amb receptors 5-HT_{1A} corticals es tradueix en un perfil d'acció favorable en tests de memòria o cognició [759], on atenua la disrupció de la memòria de treball i la inflexibilitat cognitiva produïdes en models animals d'esquizofrènia (antagonistes NMDA) amb més eficàcia que la 8-OH-DPAT. El disseny de fàrmacs com l'F15599, que és capaç d'activar aquest mecanisme a dosis en les quals no provoca efectes adversos deguts a l'autoreceptor presinàptic, podrien ser de gran ajuda per augmentar l'especificitat del tractament així com per minimitzar els efectes secundaris.

INTERNEURONES GABAÈRGIQUES I ESQUIZOFRÈNIA

Actualment s'han proposat diferents hipòtesis per explicar les múltiples alteracions descrites en l'EPF de pacients esquizofrènics [747, 760, 761] (Fig. 25). Una d'elles proposa que una deficiència en les neurones piramidals (per exemple en receptors NMDA) o una deficiència en les entrades excitatòries a l'EPF podria ser el punt de partida de les alteracions de la malaltia [760]. Aquesta deficiència tindria dos efectes principals:

- i) Per una banda, com hem mencionat, podria portar a una sortida excitatòria reduïda de l'escorça. Un dèficit en les entrades excitadores a les neurones DA que projecten a l'EPF causaria una hipoactivitat sostinguda i conseqüentment, canvis morfològics i bioquímics en aquestes neurones DA. Això, al seu torn portaria a una disminució de la innervació DA del EPF i una sobrerregulació compensatòria però no suficient dels receptors D₁ a les neurones piramidals, a les interneurones o a ambdues.
- ii) Per altra banda, podria reduir la neurotransmissió GABAèrgica ja que l'expressió de la GAD 67, un enzim que regula la síntesi de GABA, depèn de la quantitat d'activitat excitatòria rebuda per les neurones GABAèrgiques [762]. En relació amb aquesta suposició, una de les observacions més replicades en estudis post-mortem de pacients esquizofrènics és la presència de nivells disminuïts de l'ARNm de l'enzim GAD67 [763]. Per altra banda, l'expressió de la subunitat α_2 del receptor GABA_A (present en el segment inicial de l'axó de les neurones piramidals de capes 2-3) es troba augmentat en pacients d'esquizofrènia [764, 765]. Les interneurones GABAèrgiques PV+ mostren disminucions en l'expressió de gens que controlen tant la síntesi com en la recaptació de GABA així com l'expressió de proteïnes d'unió a calci en l'EPF de pacients esquizofrènics [765, 766]. La disminució de l'expressió de PV podria significar una facilitació (compensatòria o

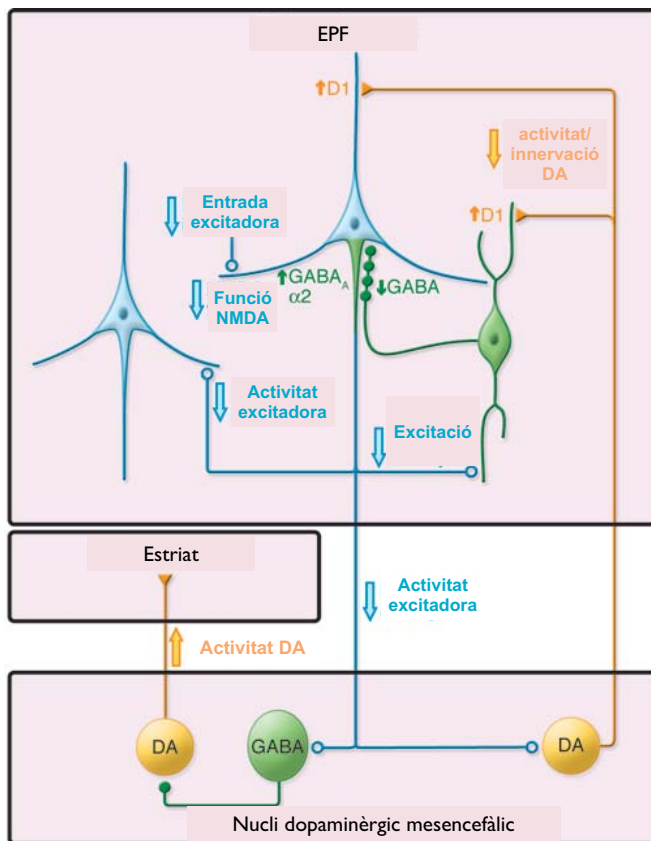


Fig 25. Il·lustració esquemàtica de les possibles alteracions en la circuiteria de l'EPF-DL en l'esquizofrènia. Modificat de Lewis i Sweet [760].

patològica) de la neurotransmissió GABAèrgica, ja que en animals KO per la PV hi ha una facilitació de l'alliberament de GABA [767]. Les alteracions en les neurones FS/PV+ podrien contribuir de manera important en la fisiopatologia de l'esquizofrènia ja que la seva activitat sembla ser essencial per la generació de l'oscil·lació gamma [764], oscil·lació implicada en tasques de memòria de treball [142] i alterada en pacients esquizofrènics [105].

Aquests dos efectes podrien estar relacionats entre ells ja que si l'activació del D1 augmenta l'activitat de les

interneurones PV+, una reducció de la senyalització mediada pel D1 podria reduir l'activitat d'aquestes neurones i contribuir a la disminució de la síntesi de GABA dependent d'activitat. Per altra banda, si la disminució de PV fos primària i provoqués un facilitació de la senyalització GABAèrgica, aquesta podria disminuir les sortides excitatòries d'EPF a ÀTV, reduint així la senyalització dopaminèrgica a EPF. Per tant, l'augment d'activitat de les neurones piramidals d'EPF després de l'administració sistèmica d'agonistes del receptor 5-HT_{1A} podria tenir efectes beneficiosos en ambdós casos. Per una banda, podria produir un augment de la transmissió dopaminèrgica a EPF, que contribuiria a l'augment de la transmissió a través del receptor D1 tant en neurones piramidals com en neurones GABAèrgiques. Això podria afavorir la síntesi de GABA dependent d'activitat i per tant, regular la disfunció de les interneurones GABAèrgiques d'una manera indirecta si hi hagués una hipofunció GABAèrgica. Per altra banda, si la disminució de l'expressió de PV no fos compensatòria sinó que fos primària en la malaltia, causaria un augment de la neurotransmissió GABAèrgica. Per tant, la inhibició de les neurones FS/PV+ per agonistes 5-HT_{1A} també podria tenir efectes beneficiosos en aquest cas, equilibrant altra vegada el balanç excitació/ inhibició. Semblaria més provable que la disminució de PV en les

interneurones GABAèrgiques fos compensatòria, ja que en ratolins KO per la PV hi ha un augment significatiu de l'ona gamma almenys a hipocamp [767], just al contrari del que s'observa en pacients esquizofrènics.

MILLORA DEL TRACTAMENT ANTIDEPRESSIU

En la introducció d'aquesta tesi ja hem vist la importància que pot tenir el receptor 5-HT_{1A} postsinàptic en el tractament de la depressió. Entre altres evidències, en la introducció hem descrit com l'al·lel G de l'SNP rs6295 (HTR1A: -1019C/G) situat en la regió promotora del gen del receptor 5-HT_{1A} és més freqüent en pacients depressius que en individus controls [573] i provoca un augment de l'expressió de l'autoreceptor [573-576] i una disminució l'expressió del receptor postsinàptic [574, 577, 578]. Un estudi recent [768] ha proporcionat un model animal equivalent a aquest polimorfisme d'humans: ratolins manipulats genèticament de manera que poden tenir sobreexpressió o expressió reduïda de l'autoreceptor 5-HT_{1A} dels nuclis del rafe. En aquest model, els ratolins amb sobreexpressió de l'autoreceptor equivaldrien a l'al·lel G humà, ja que mostren menor resposta a l'estrès agut i no responen al tractament antidepressiu. A més, tan sols la reducció dels nivells de l'autoreceptor abans d'iniciar la teràpia antidepressiva és suficient per fer que responguin al tractament antidepressiu. Altres estudis en els quals s'administra localment a rafe siRNA del receptor 5-HT_{1A} per tal de disminuir els nivells de receptor traduït han mostrat també efectes antidepressius [769].

Per altra banda, estudis farmacològics han mostrat que el principal problema dels tractaments antidepressius existents és que hi ha un retard en efectivitat terapèutica d'aquests tractaments provocat per l'activació dual de receptors 5-HT_{1A} situats als nuclis del rafe i de receptors situats a zones postsinàptiques. L'activació de l'autoreceptor provocaria primerament una disminució de la neurotransmissió serotoninèrgica i no seria fins després de la desensibilització dels autoreceptors que els fàrmacs antidepressius podrien augmentar la transmissió serotoninèrgica a àrees de projecció i, per tant, exercir efectes terapèutics.

Tenint en compte que el receptor 5-HT_{1A} postsinàptic sembla ser el responsable de l'efecte antidepressiu i que l'activació de l'autoreceptor dels nuclis del rafe sembla ser contraproduent per a la teràpia antidepressiva, farmacològicament es poden dur a terme dues estratègies per tal d'evitar aquest retard:

- i) La utilització d'antagonistes 5-HT_{1A} per evitar l'efecte primari sobre els autoreceptors de rafe. Aquesta estratègia havia donat resultats esperançadors combinant l'antagonista no selectiu del receptor 5-HT_{1A} pindolol amb SSRIs o agonistes parcials del receptor 5-HT_{1A} [562, 632-638, 770]. El problema de la utilització del pindolol és que el seu ús primari és

com a antagonista beta-adrenèrgic no selectiu amb activitat simpatomimètica intrínseca i indicat en el tractament de la hipertensió. Per altra banda poseeix caràcter d'agonista parcial pels receptors 5-HT_{1A} que fa que augmenti també l'alliberament de dopamina i noradrenalina a EPF, fet que qüestiona si els seus efectes clínics siguin deguts solament a una facilitació de la transmissió serotoninèrgica.

En el treball 5 proposàvem la utilització de l'antagonista 5-HT_{1A} DU 125530 per a la potenciació de la teràpia antidepressiva amb fluoxetina, però l'estudi pilot ha donat resultats negatius. Tot i que els estudis de microdiàlisi mostren que l'addició de DU 125530 a un tractament previ (agut) amb fluoxetina és capaç d'augmentar l'alliberament de serotonina a zones postsinàptiques, els resultats dels estudis preclínics en animals de laboratori confirmen que aquest fàrmac és capaç de bloquejar els efectes deguts a l'activació dels autoreceptors 5-HT_{1A} dels nuclis del rafe així com els efectes deguts a l'activació dels heteroreceptors postsinàptics. El fet que l'addició de DU 125530 al tractament no millori però tampoc empitjori els símptomes depressius fa pensar que:

- a) L'addició a la teràpia antidepressiva d'un antagonista del receptor 5-HT_{1A} que bloqueja tant l'autoreceptor com l'heteroreceptor no semblaria ser beneficiós per a la potenciació del tractament antidepressiu, ja que l'addició de DU 125530 no millora els símptomes comparat amb l'addició de placebo. L'efectivitat del pindolol comparada amb la del DU 125530 podria ser deguda a la preferència per bloquejar l'autoreceptor que mostra el pindolol. És cert però que les dificultats per a realitzar estudis clínics només han permès testar una sola dosi, de manera que amb la dosi escollida, el fàrmac bloquejava aproximadament el 50% dels autoreceptors de rafe i el 50% dels heteroreceptors postsinàptics [771], per tant potser dosis diferents del fàrmac podrien tenir efectes potenciadors del tractament antidepressiu
 - b) En aquestes condicions, l'heteroreceptor 5-HT_{1A} postsinàptic no sembla ser necessari per al manteniment de l'eficàcia antidepressiva per SSRIs, ja que els pacients no empitjoren després de l'addició de DU 125530 al seu tractament. Seria interessant poder fer el mateix estudi en pacients no medicats prèviament per entendre si l'activació de l'heteroreceptor 5-HT_{1A} postsinàptic és necessària per a la teràpia antidepressiva.
- ii) L'acció selectiva sobre el receptor 5-HT_{1A} postsinàptic. Estudis en models animals han mostrat que l'activació del receptor 5-HT_{1A} postsinàptic té efectes semblants als antidepressius comuns [627]. Fins al moment, l'acció selectiva sobre aquest subgrup de receptors no era possible en humans, ja que tots els agonistes descrits fins al moment tenien efectes o bé més selectius en l'autoreceptor o bé actuaven d'igual manera en les

dues subpoblacions de receptors 5-HT_{1A}. En el treball 2 caracteritzem *in vivo*, tant per electrofisiologia com per microdialisi intracerebral, un agonista 5-HT_{1A} amb acció preferent en els receptors 5-HT_{1A} postsinàptics comparat amb els autoreceptors de rafe.

En estudis *in vitro* de tests d'activació de proteïnes G, expressió de *c-fos* i fosforilació d'ERK1/2, l'F15599 produeix preferentment respostes mediades pel receptor 5-HT_{1A} d'EPF [732, 733]. A més, en estudis de PET en gat, [¹⁸F]F15599 marca preferentment regions corticals i molt menys hipocampals, tot i el fet que aquesta última regió expressa nivells molt més alts de receptors 5-HT_{1A} [772].

Aquest fàrmac mostra activitat antidepressiva en models animals (reduïx la immobilitat en el test de natació forçada) a dosis baixes i els efectes es mantenen després de l'administració repetida del fàrmac. A més, aquests efectes es donen a dosis molt més baixes que les que produeixen símptomes somàtics (síndrome serotoninèrgic, hipotèrmia, etc.) [629].

Així doncs, l'activació preferent del receptor 5-HT_{1A} postsinàptic d'EPF *in vivo* mostra ser efectiva en models animals de depressió i obre les portes a un tractament antidepressiu més dirigit i específic.

ÚS D'AGONISTES 5-HT_{1A} PEL TRACTAMENT DEL DOLOR

L'F13640 (befiradol) és un agonista 5-HT_{1A} que es troba en fase II per al tractament del dolor. Mostra una gran afinitat per als receptors 5-HT_{1A} i, com es pot observar en el treball 3, és altament efectiu a dosis baixes tant en els heteroreceptors postsinàptics d'EPF com en els autoreceptors de rafe.

Com s'ha descrit en la introducció, diferents estudis han mostrat que mentre els estímuls dolorosos provoquen una activació de l'EPF en subjectes normals [654, 655, 773], els pacients amb diferents desordres del dolor mostren hipoactivitat [652, 653] i una disminució de la matèria grisa en aquesta àrea [657]. L'F13640 provoca bàsicament activacions de les neurones piramidals d'EPF i podria contribuir així en la facilitació de l'activitat cortical en pacients amb trastorns del dolor.

Per altra banda, el fet que sigui igualment efectiu en els autoreceptors dels nuclis del rafe significa que també està modulant la neurotransmissió serotoninèrgica. La serotonina provoca majoritàriament inhibicions de les neurones que responen a estímuls nocius a l'asta dorsal de la medulla espinal [685-688]. La inhibició d'aquestes neurones podria portar a l'atenuació de l'estímul nociceptiu i, per tant, a analgèsia. El fet que l'F13640, a diferència dels analgèsics opioides, causi primerament una hiperalgèsia, coincidiria amb l'activació de

L'autoreceptor dels nuclis del rafe que, com es mostra en el treball 3, inhibeix les neurones serotoninèrgiques dels nuclis del rafe a dosis baixes i podria disminuir la neurotransmissió serotoninèrgica a àrees postsinàptiques com la medul·la espinal. Posteriorment, la desensibilització dels receptors 5-HT_{1A} de rafe podria portar a la facilitació de la transmissió serotoninèrgica i a l'analgèsia secundària descrita per aquest fàrmac [692].

La gran interrelació que existeix entre dolor i depressió [666-670], junt amb el fet que una de les principals hipòtesis de la depressió així com gran part del seu tractament estiguin basats en la modulació del sistema serotoninèrgic, suggereix que les alteracions en aquest sistema descrites en la depressió podrien estar implicades també en la fisiopatologia del dolor. En estudis independents s'ha descrit que pacients depressius tenen un BP pel receptor 5-HT_{1A} disminuït en diferents àrees cerebrals i s'ha correlacionat inversament el BP pel receptor 5-HT_{1A} amb la intensitat de dolor reportada en tests de pressió de fred en individus controls [696]. Això suggeriria que alteracions en l'expressió del receptor 5-HT_{1A} en pacients depressius podrien afectar també la percepció del dolor. Per tant, fàrmacs com l'F13640 que augmentin la transmissió sobre aquest receptor poden ser de gran interès pel tractament del dolor.

ACTIVITAT OSCIL·LATÒRIA

L'activitat oscil·latòria cortical és una part fonamental del funcionament cerebral [103] i alteracions d'aquesta activitat oscil·latòria s'han associat amb trastorns neuropsiquiàtrics greus com l'esquizofrènia [104-106] o la depressió [108][112, 113].

Els registres del potencial de camp (*local field potential*, LFP) reflexen la sumació de potencials postsinàptics a les dendrites i són independents de la generació de potencials d'acció, mentre que l'activitat de descàrrega resulta del processament local [774, 775].

En el treball 4, on s'analitza l'activitat cortical a través dels registres del potencial de camp, veiem com els fàrmacs administrats tenen diferents efectes sobre la sincronia cortical. Mentre la 8-OH-DPAT produeix un patró bifàsic de disminució de la potència de les oscil·lacions de baixa freqüència a dosis baixes i recuperació a dosis més altes, l'F15599 no produeix cap efecte sobre aquesta activitat oscil·latòria i l'F13640 produeix disminucions en la potència d'aquesta ona de manera dosi-depenent. Aquesta diferència entre tres fàrmacs que actuen sobre el mateix receptor 5-HT_{1A} podria ser deguda als diferents perfils d'acció que mostren, tant pel que fa a mecanismes de transducció de senyal (tràfic dirigit per agonista) com a la diferent efectivitat en àrees cerebrals determinades.

Cal recordar que en el cas dels agonistes 5-HT_{2A} les diferències en selectivitat funcional són capaces de diferenciar entre grups de drogues al·lucinògenes i no-al·lucinògenes. A més, els al·lucinògens com el DOI provoquen una desincronització de les ones de baixa freqüència [265, 776].

L'oscil·lació analitzada en aquesta tesi correspon a les ones de baixa freqüència predominants en l'animal anestesià, incloent ones lentes (<1 Hz) i ones delta (1-4 Hz). Com s'ha descrit en la introducció, aquestes ones tenen una gran importància en la coordinació de diferents d'àrees cerebrals i la sincronització dels ritmes de més altes freqüències [115][114, 117]. Aquestes ones participarien en fenòmens de facilitació sinàptica, contribuint en processos de memòria i aprenentatge [112, 122-127, 430]. En pacients d'esquizofrènia i depressió s'han descrit alteracions en el son d'ones lentes (SWS) i disminucions de l'amplitud de les ones lentes durant el son [108]. En esquizofrènia fins i tot ha aparegut la hipòtesi de la desconexió per intentar explicar la malaltia [777]. Si la funció depèn de la interacció entre diferents ritmes corticals [114], una desincronització de l'ona que orquestra la resta de ritmes cerebrals podria significar la descoordinació de la l'activitat entre diferents àrees i processos i tenir efectes importants sobre el funcionament cerebral.

El fet que l'F15599 pugui canviar la descàrrega de les neurones piramidals d'EPF sense afectar el patró de generació d'aquestes ones en models animals (treball 2 i 4), podria representar un avantatge important per al tractament d'aquestes dues malalties respecte els altres agonistes 5-HT_{1A} i fa interessant analitzar l'acció d'aquest fàrmac sobre l'activitat oscil·latòria en models animals d'esquizofrènia i depressió.

La mesura del potencial de camp o l'EEG podria arribar a ser una eina de gran importància pel possible caràcter translacional que permet entre models animals i malalties humanes així com entre individus sans i pacients.

Conclusions

1. Agonistes del receptor 5-HT_{1A} amb diferent estructura química provoquen majoritàriament, però amb patrons de resposta distintius, excitacions de les neurones piramidals d'EPFm mitjançant un mecanisme dependent de circuit que implica les interneurons GABAèrgiques de la mateixa EPFm. Aquesta excitació podria facilitar la neurotransmissió dels nuclis aminèrgics mesencefàlics a aquesta àrea i afavorir l'activitat de l'EPFm en tasques com la memòria de treball.
2. Els diferents agonistes 5-HT_{1A} emprats en la present tesi inhibeixen les neurones serotoninèrgiques del NRD però actuen amb diferent potència relativa sobre els heteroreceptors 5-HT_{1A} postsinàptics *vs.* els autoreceptors presinàptics. Així, dels tres fàrmacs testats, l'F15599 mostra un perfil novedós amb una acció preferent sobre els heteroreceptors corticals comparat amb l'F13640 i la 8-OH-DPAT. L'eficàcia de l'F15599 en models animals de depressió i dèficits cognitius el fa interessant per al tractament de malalties psiquiàtriques, evitant els efectes secundaris produïts per activació de l'autoreceptor.
3. El DU 125530 és un antagonista del receptor 5-HT_{1A} molt potent en models animals, capaç d'antagonitzar tant respostes a nivell d'autoreceptor com a nivell d'heteroreceptor postsinàptic. Aquest fàrmac permet potenciar l'augment de serotonina produït per antagonistes selectius de la recaptació de serotonina però també bloqueja els heteroreceptors 5-HT_{1A} postsinàptics. Així, l'augment de funció serotoninèrgica produït pel bloqueig dels autoreceptors sembla que no es tradueix en una major efecte antidepressiu possiblement degut al bloqueig dels receptors 5-HT_{1A} postsinàptics.
4. A part de les diferències regionals en la funcionalitat del receptor 5-HT_{1A} ja conegudes, la present tesi planteja possibles diferències a nivell cel·lular entre subpoblacions de receptors 5-HT_{1A} situats en tipus neuronals diferents (piramidals *vs.* GABAèrgiques i *vs.* serotoninèrgiques). El disseny de fàrmacs amb capacitat d'actuar preferentment sobre els receptors situats en tipus cel·lulars determinats podria ser una estratègia interessant pel tractament de malalties psiquiàtriques.

Bibliografia

1. Fuster, J.M., *The prefrontal cortex : anatomy, physiology, and neuropsychology of the frontal lobe*. 3rd ed. 1997, Philadelphia: Lippincott-Raven. xvi, 333 p.
2. Brodmann, K., *Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde*. Lokalisationslehre der Grosshirnrinde. , 1909: p. 324.
3. Northcutt, R.G. and J.H. Kaas, *The emergence and evolution of mammalian neocortex*. Trends Neurosci, 1995, **18**(9): p. 373-9.
4. Rose, J.E. and C.N. Woolsey, *The orbitofrontal cortex and its connections with the mediodorsal nucleus in rabbit, sheep and cat*. Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis, 1948. **27** (1vol.): p. 210-32.
5. Akert, K. and K. Hartmann-von Monakow, *Relationships of precentral premotor and prefrontal cortex to the mediodorsal and intralaminar nuclei of the monkey thalamus*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 1980. **40**(1): p. 7-25.
6. Dinopoulos, A., et al., *Thalamic projections to motor, prefrontal, and somatosensory cortex in the sheep studied by means of the horseradish peroxidase retrograde transport method*. J Comp Neurol, 1985. **241**(1): p. 63-81.
7. Kievit, J. and H.G. Kuypers, *Organization of the thalamo-cortical connexions to the frontal lobe in the rhesus monkey*. Exp Brain Res, 1977. **29**(3-4): p. 299-322.
8. Moran, A. and F. Reinoso-Suarez, *Topographical organization of the thalamic afferent connections to the motor cortex in the cat*. J Comp Neurol, 1988. **270**(1): p. 64-85.
9. Stepniewska, I. and G. Rajkowska, *The sensory projections to the frontal association cortex in the dog*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 1989. **49**(6): p. 299-310.
10. Giguere, M. and P.S. Goldman-Rakic, *Mediodorsal nucleus: areal, laminar, and tangential distribution of afferents and efferents in the frontal lobe of rhesus monkeys*. J Comp Neurol, 1988. **277**(2): p. 195-213.
11. Barbas, H., T.H. Henion, and C.R. Dermon, *Diverse thalamic projections to the prefrontal cortex in the rhesus monkey*. J Comp Neurol, 1991. **313**(1): p. 65-94.

12. Berendse, H.W. and H.J. Groenewegen, *Restricted cortical termination fields of the midline and intralaminar thalamic nuclei in the rat*. Neuroscience, 1991. **42**(1): p. 73-102.
13. Jones, E.G. and R.Y. Leavitt, *Retrograde axonal transport and the demonstration of non-specific projections to the cerebral cortex and striatum from thalamic intralaminar nuclei in the rat, cat and monkey*. J Comp Neurol, 1974. **154**(4): p. 349-77.
14. Uylings, H.B., H.J. Groenewegen, and B. Kolb, *Do rats have a prefrontal cortex?* Behav Brain Res, 2003. **146**(1-2): p. 3-17.
15. Uylings, H.B. and C.G. van Eden, *Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans*. Prog Brain Res, 1990. **85**: p. 31-62.
16. Miller, E.K., C.A. Erickson, and R. Desimone, *Neural mechanisms of visual working memory in prefrontal cortex of the macaque*. J Neurosci, 1996. **16**(16): p. 5154-67.
17. Kesner, R.P. and T. Holbrook, *Dissociation of item and order spatial memory in rats following medial prefrontal cortex lesions*. Neuropsychologia, 1987. **25**(4): p. 653-64.
18. Chaillan, F.A., et al., *Opposite effects depending on learning and memory demands in dorsomedial prefrontal cortex lesioned rats performing an olfactory task*. Behav Brain Res, 1997. **82**(2): p. 203-12.
19. Dietrich, A. and J.D. Allen, *Functional dissociation of the prefrontal cortex and the hippocampus in timing behavior*. Behav Neurosci, 1998. **112**(5): p. 1043-7.
20. Delatour, B. and P. Gisquet-Verrier, *Lesions of the prelimbic-infralimbic cortices in rats do not disrupt response selection processes but induce delay-dependent deficits: evidence for a role in working memory?* Behav Neurosci, 1999. **113**(5): p. 941-55.
21. Chiba, A.A., R.P. Kesner, and C.J. Gibson, *Memory for temporal order of new and familiar spatial location sequences: role of the medial prefrontal cortex*. Learn Mem, 1997. **4**(4): p. 311-7.
22. Shallice, T., *Specific impairments of planning*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1982. **298**(1089): p. 199-209.

23. Delatour, B. and P. Gisquet-Verrier, *Functional role of rat prelimbic-infralimbic cortices in spatial memory: evidence for their involvement in attention and behavioural flexibility*. Behav Brain Res, 2000. **109**(1): p. 113-28.
24. Dias, R. and J.P. Aggleton, *Effects of selective excitotoxic prefrontal lesions on acquisition of nonmatching- and matching-to-place in the T-maze in the rat: differential involvement of the prelimbic-infralimbic and anterior cingulate cortices in providing behavioural flexibility*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(12): p. 4457-66.
25. Godefroy, O., C. Lhullier, and M. Rousseaux, *Non-spatial attention disorders in patients with frontal or posterior brain damage*. Brain, 1996. **119** (Pt 1): p. 191-202.
26. Godefroy, O. and M. Rousseaux, *Divided and focused attention in patients with lesion of the prefrontal cortex*. Brain Cogn, 1996. **30**(2): p. 155-74.
27. Chao, L.L. and R.T. Knight, *Contribution of human prefrontal cortex to delay performance*. J Cogn Neurosci, 1998. **10**(2): p. 167-77.
28. Groenewegen, H.J., *Organization of the afferent connections of the mediodorsal thalamic nucleus in the rat, related to the mediodorsal-prefrontal topography*. Neuroscience, 1988. **24**(2): p. 379-431.
29. Cavada, C. and P.S. Goldman-Rakic, *Posterior parietal cortex in rhesus monkey: II. Evidence for segregated corticocortical networks linking sensory and limbic areas with the frontal lobe*. J Comp Neurol, 1989. **287**(4): p. 422-45.
30. Preuss, T.M. and P.S. Goldman-Rakic, *Connections of the ventral granular frontal cortex of macaques with perisylvian premotor and somatosensory areas: anatomical evidence for somatic representation in primate frontal association cortex*. J Comp Neurol, 1989. **282**(2): p. 293-316.
31. Van Eden, C.G., V.A. Lamme, and H.B. Uylings, *Heterotopic Cortical Afferents to the Medial Prefrontal Cortex in the Rat. A Combined Retrograde and Anterograde Tracer Study*. Eur J Neurosci, 1992. **4**(1): p. 77-97.
32. Groenewegen, H.J. and H.B. Uylings, *The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information*. Prog Brain Res, 2000. **126**: p. 3-28.
33. Vertes, R.P., *Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat*. Synapse, 2004. **51**(1): p. 32-58.

34. Brown, V.J. and E.M. Bowman, *Rodent models of prefrontal cortical function*. Trends Neurosci, 2002. **25**(7): p. 340-3.
35. Terreberry, R.R. and E.J. Neafsey, *Rat medial frontal cortex: a visceral motor region with a direct projection to the solitary nucleus*. Brain Res, 1983. **278**(1-2): p. 245-9.
36. Verberne, A.J., et al., *Medial prefrontal cortical lesions modulate baroreflex sensitivity in the rat*. Brain Res, 1987. **426**(2): p. 243-9.
37. Neafsey, E.J., *Prefrontal cortical control of the autonomic nervous system: anatomical and physiological observations*. Prog Brain Res, 1990. **85**: p. 147-65; discussion 165-6.
38. Milad, M.R. and G.J. Quirk, *Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction*. Nature, 2002. **420**(6911): p. 70-4.
39. Morgan, M.A., J. Schulkin, and J.E. LeDoux, *Ventral medial prefrontal cortex and emotional perseveration: the memory for prior extinction training*. Behav Brain Res, 2003. **146**(1-2): p. 121-30.
40. Conde, F., et al., *Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. A study using retrograde transport of fluorescent dyes. I. Thalamic afferents*. Brain Res Bull, 1990. **24**(3): p. 341-54.
41. Heidbreder, C.A. and H.J. Groenewegen, *The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics*. Neurosci Biobehav Rev, 2003. **27**(6): p. 555-79.
42. Groenewegen, H.J., C.I. Wright, and H.B. Uylings, *The anatomical relationships of the prefrontal cortex with limbic structures and the basal ganglia*. J Psychopharmacol, 1997. **11**(2): p. 99-106.
43. Jay, T.M. and M.P. Witter, *Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin*. J Comp Neurol, 1991. **313**(4): p. 574-86.
44. Verwer, R.W., et al., *Collateral projections from the rat hippocampal formation to the lateral and medial prefrontal cortex*. Hippocampus, 1997. **7**(4): p. 397-402.

45. Sesack, S.R., et al., *Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin*. J Comp Neurol, 1989. **290**(2): p. 213-42.
46. Groenewegen, H.J., et al., *The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus and the amygdala: evidence for a parallel organization*. Prog Brain Res, 1990. **85**: p. 95-116; discussion 116-8.
47. Middleton, F.A. and P.L. Strick, *Basal-ganglia 'projections' to the prefrontal cortex of the primate*. Cereb Cortex, 2002. **12**(9): p. 926-35.
48. Hajos, M., et al., *An electrophysiological and neuroanatomical study of the medial prefrontal cortical projection to the midbrain raphe nuclei in the rat*. Neuroscience, 1998. **87**(1): p. 95-108.
49. Jodo, E., C. Chiang, and G. Aston-Jones, *Potent excitatory influence of prefrontal cortex activity on noradrenergic locus coeruleus neurons*. Neuroscience, 1998. **83**(1): p. 63-79.
50. Kandel, E.R., J.H. Schwartz, and T.M. Jessell, *Principles of neural science*. 4th edition ed. 2000, New York: McGraw-Hill.
51. Swanson, L.W., *Brain maps: structure of the rat brain*. 1998, Amsterdam: Elsevier Science.
52. DeFelipe, J. and I. Farinas, *The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs*. Prog Neurobiol, 1992. **39**(6): p. 563-607.
53. Neafsey, E.J., K.M. Hurley-Gius, and D. Arvanitis, *The topographical organization of neurons in the rat medial frontal, insular and olfactory cortex projecting to the solitary nucleus, olfactory bulb, periaqueductal gray and superior colliculus*. Brain Res, 1986. **377**(2): p. 561-70.
54. de la Pena, E. and E. Geijo-Barrientos, *Laminar localization, morphology, and physiological properties of pyramidal neurons that have the low-threshold calcium current in the guinea-pig medial frontal cortex*. J Neurosci, 1996. **16**(17): p. 5301-11.

55. Yang, C.R., J.K. Seamans, and N. Gorelova, *Electrophysiological and morphological properties of layers V-VI principal pyramidal cells in rat prefrontal cortex in vitro*. J Neurosci, 1996. **16**(5): p. 1904-21.
56. McCormick, D.A., et al., *Comparative electrophysiology of pyramidal and sparsely spiny stellate neurons of the neocortex*. J Neurophysiol, 1985. **54**(4): p. 782-806.
57. Llinas, R.R., *The intrinsic electrophysiological properties of mammalian neurons: insights into central nervous system function*. Science, 1988. **242**(4886): p. 1654-64.
58. Degenetais, E., et al., *Electrophysiological properties of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study*. Cereb Cortex, 2002. **12**(1): p. 1-16.
59. Steriade, M., et al., *Dynamic properties of corticothalamic neurons and local cortical interneurons generating fast rhythmic (30-40 Hz) spike bursts*. J Neurophysiol, 1998. **79**(1): p. 483-90.
60. Traub, R.D., et al., *Fast rhythmic bursting can be induced in layer 2/3 cortical neurons by enhancing persistent Na⁺ conductance or by blocking BK channels*. J Neurophysiol, 2003. **89**(2): p. 909-21.
61. Steriade, M., I. Timofeev, and F. Grenier, *Natural waking and sleep states: a view from inside neocortical neurons*. J Neurophysiol, 2001. **85**(5): p. 1969-85.
62. Steriade, M., *Neocortical cell classes are flexible entities*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**(2): p. 121-34.
63. Beaulieu, C., *Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population*. Brain Res, 1993. **609**(1-2): p. 284-92.
64. DeFelipe, J. and E.G. Jones, *High-Resolution Light and Electron Microscopic Immunocytochemistry of Colocalized GABA and Calbindin D-28k in Somata and Double Bouquet Cell Axons of Monkey Somatosensory Cortex*. Eur J Neurosci, 1992. **4**(1): p. 46-60.
65. Jones, E.G., *GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates*. Cereb Cortex, 1993. **3**(5): p. 361-72.

66. DeFelipe, J., *Neocortical neuronal diversity: chemical heterogeneity revealed by colocalization studies of classic neurotransmitters, neuropeptides, calcium-binding proteins, and cell surface molecules*. Cereb Cortex, 1993. **3**(4): p. 273-89.
67. Kawaguchi, Y. and Y. Kubota, *Physiological and morphological identification of somatostatin- or vasoactive intestinal polypeptide-containing cells among GABAergic cell subtypes in rat frontal cortex*. J Neurosci, 1996. **16**(8): p. 2701-15.
68. Thomson, A.M. and J. Deuchars, *Synaptic interactions in neocortical local circuits: dual intracellular recordings in vitro*. Cereb Cortex, 1997. **7**(6): p. 510-22.
69. Somogyi, P., et al., *Salient features of synaptic organisation in the cerebral cortex*. Brain Res Brain Res Rev, 1998. **26**(2-3): p. 113-35.
70. Galarreta, M. and S. Hestrin, *Electrical synapses between GABA-releasing interneurons*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(6): p. 425-33.
71. DeFelipe, J., *Cortical interneurons: from Cajal to 2001*. Prog Brain Res, 2002. **136**: p. 215-38.
72. Silberberg, G., A. Gupta, and H. Markram, *Stereotypy in neocortical microcircuits*. Trends Neurosci, 2002. **25**(5): p. 227-30.
73. Wang, Y., et al., *Anatomical, physiological, molecular and circuit properties of nest basket cells in the developing somatosensory cortex*. Cereb Cortex, 2002. **12**(4): p. 395-410.
74. Ramon y Cajal, S., *Manual de Histología normal y Técnica micrográfica*. 1893, València: Pascual Aguilar.
75. Somogyi, P., T.F. Freund, and A. Cowey, *The axo-axonic interneuron in the cerebral cortex of the rat, cat and monkey*. Neuroscience, 1982. **7**(11): p. 2577-607.
76. Marin-Padilla, M., *The chandelier cell of the human visual cortex: a Golgi study*. J Comp Neurol, 1987. **256**(1): p. 61-70.
77. Xu, X., K.D. Roby, and E.M. Callaway, *Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells*. J Comp Neurol, 2010. **518**(3): p. 389-404.

78. Kawaguchi, Y. and S. Kondo, *Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex*. J Neurocytol, 2002. **31**(3-5): p. 277-87.
79. Connors, B.W. and M.J. Gutnick, *Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons*. Trends Neurosci, 1990. **13**(3): p. 99-104.
80. Erisir, A., et al., *Function of specific K(+) channels in sustained high-frequency firing of fast-spiking neocortical interneurons*. J Neurophysiol, 1999. **82**(5): p. 2476-89.
81. Rudy, B. and C.J. McBain, *Kv3 channels: voltage-gated K⁺ channels designed for high-frequency repetitive firing*. Trends Neurosci, 2001. **24**(9): p. 517-26.
82. Chow, A., et al., *K(+) channel expression distinguishes subpopulations of parvalbumin- and somatostatin-containing neocortical interneurons*. J Neurosci, 1999. **19**(21): p. 9332-45.
83. Jones, E.G., *Varieties and distribution of non-pyramidal cells in the somatic sensory cortex of the squirrel monkey*. J Comp Neurol, 1975. **160**(2): p. 205-67.
84. Somogyi, P., *An interneurone making synapses specifically on the axon initial segment of pyramidal cells in the cerebral cortex of the cat [proceedings]*. J Physiol, 1979. **296**: p. 18P-19P.
85. Tamas, G., et al., *Proximally targeted GABAergic synapses and gap junctions synchronize cortical interneurons*. Nat Neurosci, 2000. **3**(4): p. 366-71.
86. Szabadics, J., A. Lorincz, and G. Tamas, *Beta and gamma frequency synchronization by dendritic gabaergic synapses and gap junctions in a network of cortical interneurons*. J Neurosci, 2001. **21**(15): p. 5824-31.
87. Sloper, J.J. and T.P. Powell, *Gap junctions between dendrites and somata of neurons in the primate sensori-motor cortex*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1978. **203**(1150): p. 39-47.
88. Sloper, J.J., *Gap junctions between dendrites in the primate neocortex*. Brain Res, 1972. **44**(2): p. 641-6.
89. Nadarajah, B., et al., *Gap junctions in the adult cerebral cortex: regional differences in their distribution and cellular expression of connexins*. J Comp Neurol, 1996. **376**(2): p. 326-42.

90. McBain, C.J. and A. Fisahn, *Interneurons unbound*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(1): p. 11-23.
91. Gibson, J.R., M. Beierlein, and B.W. Connors, *Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex*. Nature, 1999. **402**(6757): p. 75-9.
92. Galarreta, M. and S. Hestrin, *A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses*. Nature, 1999. **402**(6757): p. 72-5.
93. Fukuda, T. and T. Kosaka, *Ultrastructural study of gap junctions between dendrites of parvalbumin-containing GABAergic neurons in various neocortical areas of the adult rat*. Neuroscience, 2003. **120**(1): p. 5-20.
94. Fukuda, T., et al., *Gap junctions among dendrites of cortical GABAergic neurons establish a dense and widespread intercolumnar network*. J Neurosci, 2006. **26**(13): p. 3434-43.
95. Simon, A., et al., *Gap-junctional coupling between neurogliaform cells and various interneuron types in the neocortex*. J Neurosci, 2005. **25**(27): p. 6278-85.
96. Fukuda, T., *Structural organization of the gap junction network in the cerebral cortex*. Neuroscientist, 2007. **13**(3): p. 199-207.
97. Fuster, J.M., *Cortex and mind. Unifying cognition*. 2003, New York: Oxford University Press.
98. Mountcastle, V.B., *Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex*. J Neurophysiol, 1957. **20**(4): p. 408-34.
99. DeFelipe, J., L. Alonso-Nanclares, and J.I. Arellano, *Microstructure of the neocortex: comparative aspects*. J Neurocytol, 2002. **31**(3-5): p. 299-316.
100. Selemon, L.D. and P.S. Goldman-Rakic, *Common cortical and subcortical targets of the dorsolateral prefrontal and posterior parietal cortices in the rhesus monkey: evidence for a distributed neural network subserving spatially guided behavior*. J Neurosci, 1988. **8**(11): p. 4049-68.
101. Dolan, R.J. and P.C. Fletcher, *Dissociating prefrontal and hippocampal function in episodic memory encoding*. Nature, 1997. **388**(6642): p. 582-5.
102. Buzsaki, G., *Rhythms of the brain*. 2006, New York: Oxford University Press.

103. Buzsaki, G. and A. Draguhn, *Neuronal oscillations in cortical networks*. Science, 2004. **304**(5679): p. 1926-9.
104. Spencer, K.M., et al., *Abnormal neural synchrony in schizophrenia*. J Neurosci, 2003. **23**(19): p. 7407-11.
105. Cho, R.Y., R.O. Konecky, and C.S. Carter, *Impairments in frontal cortical gamma synchrony and cognitive control in schizophrenia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(52): p. 19878-83.
106. Uhlhaas, P.J., et al., *The role of oscillations and synchrony in cortical networks and their putative relevance for the pathophysiology of schizophrenia*. Schizophr Bull, 2008. **34**(5): p. 927-43.
107. Uhlhaas, P.J. and W. Singer, *Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia*. Nat Rev Neurosci, 2010. **11**(2): p. 100-13.
108. Hoffmann, R., et al., *Slow-wave activity during non-REM sleep in men with schizophrenia and major depressive disorders*. Psychiatry Res, 2000. **95**(3): p. 215-25.
109. Babiloni, C., et al., *Mapping distributed sources of cortical rhythms in mild Alzheimer's disease. A multicentric EEG study*. Neuroimage, 2004. **22**(1): p. 57-67.
110. Dierks, T., et al., *Dementia of the Alzheimer type: effects on the spontaneous EEG described by dipole sources*. Psychiatry Res, 1993. **50**(3): p. 151-62.
111. Jeong, J., *EEG dynamics in patients with Alzheimer's disease*. Clin Neurophysiol, 2004. **115**(7): p. 1490-505.
112. Basar, E. and B. Guntekin, *A review of brain oscillations in cognitive disorders and the role of neurotransmitters*. Brain Res, 2008. **1235**: p. 172-93.
113. Uhlhaas, P.J. and W. Singer, *Neural synchrony in brain disorders: relevance for cognitive dysfunctions and pathophysiology*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 155-68.
114. Steriade, M., *Grouping of brain rhythms in corticothalamic systems*. Neuroscience, 2006. **137**(4): p. 1087-106.
115. Knyazev, G.G., *Motivation, emotion, and their inhibitory control mirrored in brain oscillations*. Neurosci Biobehav Rev, 2007. **31**(3): p. 377-95.

116. von Stein, A., C. Chiang, and P. Konig, *Top-down processing mediated by interareal synchronization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14748-53.
117. Steriade, M., *The corticothalamic system in sleep*. Front Biosci, 2003. **8**: p. d878-99.
118. Steriade, M., A. Nunez, and F. Amzica, *A novel slow (< 1 Hz) oscillation of neocortical neurons in vivo: depolarizing and hyperpolarizing components*. J Neurosci, 1993. **13**(8): p. 3252-65.
119. Cowan, R.L. and C.J. Wilson, *Spontaneous firing patterns and axonal projections of single corticostriatal neurons in the rat medial agranular cortex*. J Neurophysiol, 1994. **71**(1): p. 17-32.
120. Contreras, D. and M. Steriade, *Cellular basis of EEG slow rhythms: a study of dynamic corticothalamic relationships*. J Neurosci, 1995. **15**(1 Pt 2): p. 604-22.
121. Crunelli, V. and S.W. Hughes, *The slow (< 1 Hz) rhythm of non-REM sleep: a dialogue between three cardinal oscillators*. Nat Neurosci, 2010. **13**(1): p. 9-17.
122. Sanchez-Vives, M.V. and D.A. McCormick, *Cellular and network mechanisms of rhythmic recurrent activity in neocortex*. Nat Neurosci, 2000. **3**(10): p. 1027-34.
123. Bodizs, R., et al., *Sleep-dependent hippocampal slow activity correlates with waking memory performance in humans*. Neurobiol Learn Mem, 2002. **78**(2): p. 441-57.
124. Stickgold, R., *Sleep-dependent memory consolidation*. Nature, 2005. **437**(7063): p. 1272-8.
125. Marshall, L., et al., *Boosting slow oscillations during sleep potentiates memory*. Nature, 2006. **444**(7119): p. 610-3.
126. Miyamoto, H. and T.K. Hensch, *Reciprocal interaction of sleep and synaptic plasticity*. Mol Interv, 2003. **3**(7): p. 404-17.
127. Sirota, A., et al., *Communication between neocortex and hippocampus during sleep in rodents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 2065-9.
128. Steriade, M. and I. Timofeev, *Neuronal plasticity in thalamocortical networks during sleep and waking oscillations*. Neuron, 2003. **37**(4): p. 563-76.

129. Steriade, M., A. Nunez, and F. Amzica, *Intracellular analysis of relations between the slow (< 1 Hz) neocortical oscillation and other sleep rhythms of the electroencephalogram*. J Neurosci, 1993. **13**(8): p. 3266-83.
130. Petsche, H., H. Pockberger, and P. Rappelsberger, *On the search for the sources of the electroencephalogram*. Neuroscience, 1984. **11**(1): p. 1-27.
131. Leresche, N., et al., *Pacemaker-like and other types of spontaneous membrane potential oscillations of thalamocortical cells*. Neurosci Lett, 1990. **113**(1): p. 72-7.
132. McCormick, D.A. and H.C. Pape, *Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones*. J Physiol, 1990. **431**: p. 291-318.
133. Llinas, R.R. and M. Steriade, *Bursting of thalamic neurons and states of vigilance*. J Neurophysiol, 2006. **95**(6): p. 3297-308.
134. Kahana, M.J., D. Seelig, and J.R. Madsen, *Theta returns*. Curr Opin Neurobiol, 2001. **11**(6): p. 739-44.
135. Steriade, M., F. Amzica, and D. Contreras, *Synchronization of fast (30-40 Hz) spontaneous cortical rhythms during brain activation*. J Neurosci, 1996. **16**(1): p. 392-417.
136. Pesaran, B., et al., *Temporal structure in neuronal activity during working memory in macaque parietal cortex*. Nat Neurosci, 2002. **5**(8): p. 805-11.
137. Tallon-Baudry, C., O. Bertrand, and C. Fischer, *Oscillatory synchrony between human extrastriate areas during visual short-term memory maintenance*. J Neurosci, 2001. **21**(20): p. RC177.
138. Tallon-Baudry, C., et al., *Oscillatory synchrony in the monkey temporal lobe correlates with performance in a visual short-term memory task*. Cereb Cortex, 2004. **14**(7): p. 713-20.
139. Slotnick, S.D., et al., *Interactions between thalamic and cortical rhythms during semantic memory recall in human*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(9): p. 6440-3.
140. Palva, J.M., S. Palva, and K. Kaila, *Phase synchrony among neuronal oscillations in the human cortex*. J Neurosci, 2005. **25**(15): p. 3962-72.

141. Singer, W., *Neuronal synchrony: a versatile code for the definition of relations?* Neuron, 1999. **24**(1): p. 49-65, 111-25.
142. Howard, M.W., et al., *Gamma oscillations correlate with working memory load in humans.* Cereb Cortex, 2003. **13**(12): p. 1369-74.
143. Ward, L.M., *Synchronous neural oscillations and cognitive processes.* Trends Cogn Sci, 2003. **7**(12): p. 553-9.
144. Sirota, A., et al., *Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm.* Neuron, 2008. **60**(4): p. 683-97.
145. Bartos, M., I. Vida, and P. Jonas, *Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks.* Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(1): p. 45-56.
146. Tukker, J.J., et al., *Cell type-specific tuning of hippocampal interneuron firing during gamma oscillations in vivo.* J Neurosci, 2007. **27**(31): p. 8184-9.
147. Hajos, N., et al., *Spike timing of distinct types of GABAergic interneuron during hippocampal gamma oscillations in vitro.* J Neurosci, 2004. **24**(41): p. 9127-37.
148. Briand, L.A., et al., *Modulators in concert for cognition: modulator interactions in the prefrontal cortex.* Prog Neurobiol, 2007. **83**(2): p. 69-91.
149. Walker, L.C., et al., *Noncollateral projections of basal forebrain neurons to frontal and parietal neocortex in primates.* Brain Res Bull, 1985. **15**(3): p. 307-14.
150. Gritti, I., et al., *Parvalbumin, calbindin, or calretinin in cortically projecting and GABAergic, cholinergic, or glutamatergic basal forebrain neurons of the rat.* J Comp Neurol, 2003. **458**(1): p. 11-31.
151. Del Arco, A., et al., *Changes in dialysate concentrations of glutamate and GABA in the brain: an index of volume transmission mediated actions?* J Neurochem, 2003. **85**(1): p. 23-33.
152. Whitaker-Azmitia, P.M., *The discovery of serotonin and its role in neuroscience.* Neuropsychopharmacology, 1999. **21**(2 Suppl): p. 2S-8S.

153. Azmitia, E.C., *The visualization and characterization of 5HT reuptake sites in the rodent and primate hippocampus. A preliminary study.* J Physiol (Paris), 1981. 77(2-3): p. 175-82.
154. Fuxe, K., et al., *Quantitative autoradiographic localization of [³H]imipramine binding sites in the brain of the rat: relationship to ascending 5-hydroxytryptamine neuron systems.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. 80(12): p. 3836-40.
155. Katz, D.M. and H.K. Kimelberg, *Kinetics and autoradiography of high affinity uptake of serotonin by primary astrocyte cultures.* J Neurosci, 1985. 5(7): p. 1901-8.
156. Kimelberg, H.K. and D.M. Katz, *High-affinity uptake of serotonin into immunocytochemically identified astrocytes.* Science, 1985. 228(4701): p. 889-91.
157. Dahlstroem, A. and K. Fuxe, *Evidence for the Existence of Monoamine-Containing Neurons in the Central Nervous System. I. Demonstration of Monoamines in the Cell Bodies of Brain Stem Neurons.* Acta Physiol Scand Suppl, 1964: p. SUPPL 232:1-55.
158. Audet, M.A., L. Descarries, and G. Doucet, *Quantified regional and laminar distribution of the serotonin innervation in the anterior half of adult rat cerebral cortex.* J Chem Neuroanat, 1989. 2(1): p. 29-44.
159. Azmitia, E.C. and P.J. Gannon, *The primate serotonergic system: a review of human and animal studies and a report on Macaca fascicularis.* Adv Neurol, 1986. 43: p. 407-68.
160. Baker, K.G., et al., *Cytoarchitecture of serotonin-synthesizing neurons in the pontine tegmentum of the human brain.* Synapse, 1991. 7(4): p. 301-20.
161. Fuxe, K., *Evidence for the Existence of Monoamine Neurons in the Central Nervous System. Iv. Distribution of Monoamine Nerve Terminals in the Central Nervous System.* Acta Physiol Scand Suppl, 1965: p. SUPPL 247:37+.
162. Tork, I., *Anatomy of the serotonergic system.* Ann N Y Acad Sci, 1990. 600: p. 9-34; discussion 34-5.
163. Takahashi, H., et al., *Distribution of serotonin-containing cell bodies in the brainstem of the human fetus determined with immunohistochemistry using antiserotonin serum.* Brain Dev, 1986. 8(4): p. 355-65.

164. Jacobs, B.L. and E.C. Azmitia, *Structure and function of the brain serotonin system*. *Physiol Rev*, 1992. **72**(1): p. 165-229.
165. Azmitia, E.C. and M. Segal, *An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat*. *J Comp Neurol*, 1978. **179**(3): p. 641-67.
166. Adell, A., et al., *Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei*. *Brain Res Brain Res Rev*, 2002. **39**(2-3): p. 154-80.
167. Peyron, C., et al., *Forebrain afferents to the rat dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods*. *Neuroscience*, 1998. **82**(2): p. 443-68.
168. Aghajanian, G.K. and R.Y. Wang, *Habenular and other midbrain raphe afferents demonstrated by a modified retrograde tracing technique*. *Brain Res*, 1977. **122**(2): p. 229-42.
169. Takagishi, M. and T. Chiba, *Efferent projections of the infralimbic (area 25) region of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tracer PHA-L study*. *Brain Res*, 1991. **566**(1-2): p. 26-39.
170. Lee, H.S., et al., *Glutamatergic afferent projections to the dorsal raphe nucleus of the rat*. *Brain Res*, 2003. **963**(1-2): p. 57-71.
171. Jankowski, M.P. and S.R. Sesack, *Prefrontal cortical projections to the rat dorsal raphe nucleus: ultrastructural features and associations with serotonin and gamma-aminobutyric acid neurons*. *J Comp Neurol*, 2004. **468**(4): p. 518-29.
172. Stern, W.C., et al., *Neuropharmacology of the afferent projections from the lateral habenula and substantia nigra to the anterior raphe in the rat*. *Neuropharmacology*, 1981. **20**(10): p. 979-89.
173. Kalen, P., et al., *Regulation of striatal serotonin release by the lateral habenula-dorsal raphe pathway in the rat as demonstrated by in vivo microdialysis: role of excitatory amino acids and GABA*. *Brain Res*, 1989. **492**(1-2): p. 187-202.
174. Kalen, P., M. Karlson, and L. Wiklund, *Possible excitatory amino acid afferents to nucleus raphe dorsalis of the rat investigated with retrograde wheat germ agglutinin and D-[3H]aspartate tracing*. *Brain Res*, 1985. **360**(1-2): p. 285-97.

175. Baraban, J.M. and G.K. Aghajanian, *Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: demonstration by electron microscopic autoradiography*. Brain Res, 1981. **204**(1): p. 1-11.
176. Peyron, C., et al., *Lower brainstem catecholamine afferents to the rat dorsal raphe nucleus*. J Comp Neurol, 1996. **364**(3): p. 402-413.
177. Sakai, K., et al., *Afferent connections of the nucleus raphe dorsalis in the cat as visualized by the horseradish peroxidase technique*. Brain Res, 1977. **137**(1): p. 11-35.
178. Lee, E.H. and M.A. Geyer, *Indirect effects of apomorphine on serotonergic neurons in rats*. Neuroscience, 1984. **11**(2): p. 437-42.
179. Kalen, P., G. Skagerberg, and O. Lindvall, *Projections from the ventral tegmental area and mesencephalic raphe to the dorsal raphe nucleus in the rat. Evidence for a minor dopaminergic component*. Exp Brain Res, 1988. **73**(1): p. 69-77.
180. Peyron, C., et al., *Origin of the dopaminergic innervation of the rat dorsal raphe nucleus*. Neuroreport, 1995. **6**(18): p. 2527-31.
181. Ferre, S., R. Cortes, and F. Artigas, *Dopaminergic regulation of the serotonergic raphe-striatal pathway: microdialysis studies in freely moving rats*. J Neurosci, 1994. **14**(8): p. 4839-46.
182. Martin-Ruiz, R., et al., *Control of serotonergic neurons in rat brain by dopaminergic receptors outside the dorsal raphe nucleus*. J Neurochem, 2001. **77**(3): p. 762-75.
183. Hokfelt, T., et al., *Immunohistochemical studies on the localization and distribution of monoamine neuron systems in the rat brain. I. Tyrosine hydroxylase in the mes- and diencephalon*. Med Biol, 1976. **54**(6): p. 427-53.
184. Geffard, M., et al., *Simultaneous detection of indoleamines and dopamine in rat dorsal raphe nuclei using specific antibodies*. Histochemistry, 1987. **88**(1): p. 61-4.
185. Nanopoulos, D., et al., *Immunocytochemical evidence for the existence of GABAergic neurons in the nucleus raphe dorsalis. Possible existence of neurons containing serotonin and GABA*. Brain Res, 1982. **232**(2): p. 375-89.
186. Stamp, J.A. and K. Semba, *Extent of colocalization of serotonin and GABA in the neurons of the rat raphe nuclei*. Brain Res, 1995. **677**(1): p. 39-49.

187. Belin, M.F., et al., *Immunohistochemical evidence for the presence of gamma-aminobutyric acid and serotonin in one nerve cell. A study on the raphe nuclei of the rat using antibodies to glutamate decarboxylase and serotonin.* Brain Res, 1983. **275**(2): p. 329-39.
188. Johnson, M.D., *Synaptic glutamate release by postnatal rat serotonergic neurons in microculture.* Neuron, 1994. **12**(2): p. 433-42.
189. Gras, C., et al., *A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons.* J Neurosci, 2002. **22**(13): p. 5442-51.
190. Aghajanian, G.K., R.Y. Wang, and J. Baraban, *Serotonergic and non-serotonergic neurons of the dorsal raphe: reciprocal changes in firing induced by peripheral nerve stimulation.* Brain Res, 1978. **153**(1): p. 169-75.
191. Datiche, F., P.H. Luppi, and M. Cattarelli, *Serotonergic and non-serotonergic projections from the raphe nuclei to the piriform cortex in the rat: a cholera toxin B subunit (CTb) and 5-HT immunohistochemical study.* Brain Res, 1995. **671**(1): p. 27-37.
192. Li, Y.Q., et al., *Morphological features and electrophysiological properties of serotonergic and non-serotonergic projection neurons in the dorsal raphe nucleus. An intracellular recording and labeling study in rat brain slices.* Brain Res, 2001. **900**(1): p. 110-8.
193. Kohler, C. and H. Steinbusch, *Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain.* Neuroscience, 1982. **7**(4): p. 951-75.
194. Sharp, T., et al., *In vivo measurement of extracellular 5-hydroxytryptamine in hippocampus of the anaesthetized rat using microdialysis: changes in relation to 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity.* J Neurochem, 1989. **53**(1): p. 234-40.
195. Rudnick, G. and S.C. Wall, *The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1817-21.

196. Kuhn, D.M., W.A. Wolf, and M.B. Youdim, *5-Hydroxytryptamine release in vivo from a cytoplasmic pool: studies on the 5-HT behavioural syndrome in reserpinized rats*. Br J Pharmacol, 1985. **84**(1): p. 121-9.
197. Crespi, D., T. Mennini, and M. Gobbi, *Carrier-dependent and Ca(2+)-dependent 5-HT and dopamine release induced by (+)-amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, p-chloroamphetamine and (+)-fenfluramine*. Br J Pharmacol, 1997. **121**(8): p. 1735-43.
198. Adell, A., et al., *An in vivo dialysis and behavioural study of the release of 5-HT by p-chloroamphetamine in reserpine-treated rats*. Br J Pharmacol, 1989. **97**(1): p. 206-12.
199. Rudnick, G. and S.C. Wall, *p-Chloroamphetamine induces serotonin release through serotonin transporters*. Biochemistry, 1992. **31**(29): p. 6710-8.
200. Adell, A., P. Celada, and F. Artigas, *The role of 5-HT_{1B} receptors in the regulation of serotonin cell firing and release in the rat brain*. J Neurochem, 2001. **79**(1): p. 172-82.
201. Sprouse, J.S. and G.K. Aghajanian, *Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists*. Synapse, 1987. **1**(1): p. 3-9.
202. Wang, R.Y. and G.K. Aghajanian, *Antidromically identified serotonergic neurons in the rat midbrain raphe: evidence for collateral inhibition*. Brain Res, 1977. **132**(1): p. 186-93.
203. Aghajanian, G.K. and C.P. Vandermaelen, *Intracellular recording in vivo from serotonergic neurons in the rat dorsal raphe nucleus: methodological considerations*. J Histochem Cytochem, 1982. **30**(8): p. 813-4.
204. Aghajanian, G.K., *Modulation of a transient outward current in serotonergic neurones by alpha 1-adrenoceptors*. Nature, 1985. **315**(6019): p. 501-3.
205. Hajos, M., et al., *Evidence for a repetitive (burst) firing pattern in a sub-population of 5-hydroxytryptamine neurons in the dorsal and median raphe nuclei of the rat*. Neuroscience, 1995. **69**(1): p. 189-97.
206. Hajos, M. and T. Sharp, *Burst-firing activity of presumed 5-HT neurones of the rat dorsal raphe nucleus: electrophysiological analysis by antidromic stimulation*. Brain Res, 1996. **740**(1-2): p. 162-8.

207. Hajos, M., T. Sharp, and N.R. Newberry, *Intracellular recordings from burst-firing presumed serotonergic neurones in the rat dorsal raphe nucleus in vivo*. Brain Res, 1996. **737**(1-2): p. 308-12.
208. Hajos, M. and T. Sharp, *5-HT neurones--bursting with information?* Trends Neurosci, 1997. **20**(6): p. 244.
209. Hoyer, D., et al., *International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)*. Pharmacol Rev, 1994. **46**(2): p. 157-203.
210. Pazos, A. and J.M. Palacios, *Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors*. Brain Res, 1985. **346**(2): p. 205-30.
211. Pompeiano, M., J.M. Palacios, and G. Mengod, *Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding*. J Neurosci, 1992. **12**(2): p. 440-53.
212. Kia, H.K., et al., *Immunocytochemical localization of serotonin_{1A} receptors in the rat central nervous system*. J Comp Neurol, 1996. **365**(2): p. 289-305.
213. Willins, D.L., A.Y. Deutch, and B.L. Roth, *Serotonin 5-HT_{2A} receptors are expressed on pyramidal cells and interneurons in the rat cortex*. Synapse, 1997. **27**(1): p. 79-82.
214. Jakab, R.L. and P.S. Goldman-Rakic, *5-Hydroxytryptamine_{2A} serotonin receptors in the primate cerebral cortex: possible site of action of hallucinogenic and antipsychotic drugs in pyramidal cell apical dendrites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 735-40.
215. Jakab, R.L. and P.S. Goldman-Rakic, *Segregation of serotonin 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors in inhibitory circuits of the primate cerebral cortex*. J Comp Neurol, 2000. **417**(3): p. 337-48.
216. DeFelipe, J., et al., *Pyramidal cell axons show a local specialization for GABA and 5-HT inputs in monkey and human cerebral cortex*. J Comp Neurol, 2001. **433**(1): p. 148-55.
217. Cornea-Hebert, V., et al., *Cellular and subcellular distribution of the serotonin 5-HT_{2A} receptor in the central nervous system of adult rat*. J Comp Neurol, 1999. **409**(2): p. 187-209.

218. Xu, T. and S.C. Pandey, *Cellular localization of serotonin(2A) (5HT_{2A}) receptors in the rat brain*. Brain Res Bull, 2000. **51**(6): p. 499-505.
219. Araneda, R. and R. Andrade, *5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine 1A receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex*. Neuroscience, 1991. **40**(2): p. 399-412.
220. Ashby, C.R., Jr., E. Edwards, and R.Y. Wang, *Electrophysiological evidence for a functional interaction between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in the rat medial prefrontal cortex: an iontophoretic study*. Synapse, 1994. **17**(3): p. 173-81.
221. Amargos-Bosch, M., et al., *Co-expression and in vivo interaction of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex*. Cereb Cortex, 2004. **14**(3): p. 281-99.
222. Morales, M. and F.E. Bloom, *The 5-HT₃ receptor is present in different subpopulations of GABAergic neurons in the rat telencephalon*. J Neurosci, 1997. **17**(9): p. 3157-67.
223. Santana, N., et al., *Expression of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal and GABAergic neurons of the rat prefrontal cortex*. Cereb Cortex, 2004. **14**(10): p. 1100-9.
224. Puig, M.V., et al., *In vivo excitation of GABA interneurons in the medial prefrontal cortex through 5-HT₃ receptors*. Cereb Cortex, 2004. **14**(12): p. 1365-75.
225. Aznar, S., et al., *The 5-HT_{1A} serotonin receptor is located on calbindin- and parvalbumin-containing neurons in the rat brain*. Brain Res, 2003. **959**(1): p. 58-67.
226. Arnsten, A.F., *Catecholamine regulation of the prefrontal cortex*. J Psychopharmacol, 1997. **11**(2): p. 151-62.
227. Everitt, B.J. and T.W. Robbins, *Central cholinergic systems and cognition*. Annu Rev Psychol, 1997. **48**: p. 649-84.
228. Gaykema, R.P., et al., *Prefrontal cortical projections to the cholinergic neurons in the basal forebrain*. J Comp Neurol, 1991. **303**(4): p. 563-83.
229. Ghashghaei, H.T. and H. Barbas, *Neural interaction between the basal forebrain and functionally distinct prefrontal cortices in the rhesus monkey*. Neuroscience, 2001. **103**(3): p. 593-614.

230. Zaborszky, L., et al., *Cortical input to the basal forebrain*. Neuroscience, 1997. **79**(4): p. 1051-78.
231. Jodo, E. and G. Aston-Jones, *Activation of locus coeruleus by prefrontal cortex is mediated by excitatory amino acid inputs*. Brain Res, 1997. **768**(1-2): p. 327-32.
232. Carr, D.B. and S.R. Sesack, *Projections from the rat prefrontal cortex to the ventral tegmental area: target specificity in the synaptic associations with mesoaccumbens and mesocortical neurons*. J Neurosci, 2000. **20**(10): p. 3864-73.
233. Naito, A. and H. Kita, *The cortico-nigral projection in the rat: an anterograde tracing study with biotinylated dextran amine*. Brain Res, 1994. **637**(1-2): p. 317-22.
234. Mason, S.T. and H.C. Fibiger, *Regional topography within noradrenergic locus coeruleus as revealed by retrograde transport of horseradish peroxidase*. J Comp Neurol, 1979. **187**(4): p. 703-24.
235. Loughlin, S.E., S.L. Foote, and F.E. Bloom, *Efferent projections of nucleus locus coeruleus: topographic organization of cells of origin demonstrated by three-dimensional reconstruction*. Neuroscience, 1986. **18**(2): p. 291-306.
236. Van Eden, C.G., et al., *Immunocytochemical localization of dopamine in the prefrontal cortex of the rat at the light and electron microscopical level*. Neuroscience, 1987. **22**(3): p. 849-62.
237. Mayo, W., et al., *Cortical cholinergic projections from the basal forebrain of the rat, with special reference to the prefrontal cortex innervation*. Neurosci Lett, 1984. **47**(2): p. 149-54.
238. Kosofsky, B.E. and M.E. Molliver, *The serotonergic innervation of cerebral cortex: different classes of axon terminals arise from dorsal and median raphe nuclei*. Synapse, 1987. **1**(2): p. 153-68.
239. Adell, A. and R.D. Myers, *Selective destruction of midbrain raphe nuclei by 5,7-DHT: is brain 5-HT involved in alcohol drinking in Sprague-Dawley rats?* Brain Res, 1995. **693**(1-2): p. 70-9.
240. McQuade, R. and T. Sharp, *Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis*. J Neurochem, 1997. **69**(2): p. 791-6.

241. Blue, M.E., et al., *Correspondence between 5-HT₂ receptors and serotonergic axons in rat neocortex*. Brain Res, 1988. **453**(1-2): p. 315-28.
242. Kim, M.A., et al., *Reciprocal connections between subdivisions of the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat*. Brain Res, 2004. **1026**(1): p. 56-67.
243. Espana, R.A. and C.W. Berridge, *Organization of noradrenergic efferents to arousal-related basal forebrain structures*. J Comp Neurol, 2006. **496**(5): p. 668-83.
244. Hajszan, T. and L. Zaborszky, *Direct catecholaminergic-cholinergic interactions in the basal forebrain. III. Adrenergic innervation of choline acetyltransferase-containing neurons in the rat*. J Comp Neurol, 2002. **449**(2): p. 141-57.
245. Dinopoulos, A., I. Dori, and J.G. Parnavelas, *The serotonin innervation of the basal forebrain shows a transient phase during development*. Brain Res Dev Brain Res, 1997. **99**(1): p. 38-52.
246. Jones, B.E. and A.C. Cuello, *Afferents to the basal forebrain cholinergic cell area from pontomesencephalic--catecholamine, serotonin, and acetylcholine--neurons*. Neuroscience, 1989. **31**(1): p. 37-61.
247. Gaykema, R.P. and L. Zaborszky, *Direct catecholaminergic-cholinergic interactions in the basal forebrain. II. Substantia nigra-ventral tegmental area projections to cholinergic neurons*. J Comp Neurol, 1996. **374**(4): p. 555-77.
248. Di Giovanni, G., V. Di Matteo, and E. Esposito, *SEROTONIN-DOPAMINE INTERACTION: EXPERIMENTAL EVIDENCE AND THERAPEUTIC RELEVANCE*. Progress in Brain Research, 172. 2008, Amsterdam Oxford: Elsevier.
249. Ashby, C.R., Jr., et al., *Characterization of 5-hydroxytryptamine₂ receptors in the medial prefrontal cortex: a microiontophoretic study*. Eur J Pharmacol, 1989. **173**(2-3): p. 193-6.
250. Tanaka, E. and R.A. North, *Actions of 5-hydroxytryptamine on neurons of the rat cingulate cortex*. J Neurophysiol, 1993. **69**(5): p. 1749-57.

251. Aghajanian, G.K. and G.J. Marek, *Serotonin induces excitatory postsynaptic potentials in apical dendrites of neocortical pyramidal cells*. *Neuropharmacology*, 1997. **36**(4-5): p. 589-99.
252. Zhou, F.M. and J.J. Hablitz, *Activation of serotonin receptors modulates synaptic transmission in rat cerebral cortex*. *J Neurophysiol*, 1999. **82**(6): p. 2989-99.
253. Puig, M.V., et al., *In vivo modulation of the activity of pyramidal neurons in the rat medial prefrontal cortex by 5-HT_{2A} receptors: relationship to thalamocortical afferents*. *Cereb Cortex*, 2003. **13**(8): p. 870-82.
254. Newberry, N.R., et al., *Actions of 5-HT on human neocortical neurones in vitro*. *Brain Res*, 1999. **833**(1): p. 93-100.
255. Ferezou, I., et al., *5-HT₃ receptors mediate serotonergic fast synaptic excitation of neocortical vasoactive intestinal peptide/cholecystinin interneurons*. *J Neurosci*, 2002. **22**(17): p. 7389-97.
256. Yuen, E.Y., et al., *Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism*. *J Neurosci*, 2005. **25**(23): p. 5488-501.
257. Yuen, E.Y., et al., *Activation of 5-HT_{2A/C} receptors counteracts 5-HT_{1A} regulation of n-methyl-D-aspartate receptor channels in pyramidal neurons of prefrontal cortex*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(25): p. 17194-204.
258. Gullledge, A.T., et al., *M₁ receptors mediate cholinergic modulation of excitability in neocortical pyramidal neurons*. *J Neurosci*, 2009. **29**(31): p. 9888-902.
259. Branchereau, P., et al., *Pyramidal neurons in rat prefrontal cortex show a complex synaptic response to single electrical stimulation of the locus coeruleus region: evidence for antidromic activation and GABAergic inhibition using in vivo intracellular recording and electron microscopy*. *Synapse*, 1996. **22**(4): p. 313-31.
260. Marek, G.J. and G.K. Aghajanian, *5-HT_{2A} receptor or alpha₁-adrenoceptor activation induces excitatory postsynaptic currents in layer V pyramidal cells of the medial prefrontal cortex*. *Eur J Pharmacol*, 1999. **367**(2-3): p. 197-206.
261. Trantham-Davidson, H., et al., *Mechanisms underlying differential D₁ versus D₂ dopamine receptor regulation of inhibition in prefrontal cortex*. *J Neurosci*, 2004. **24**(47): p. 10652-9.

262. Tseng, K.Y. and P. O'Donnell, *Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms*. J Neurosci, 2004. **24**(22): p. 5131-9.
263. Wang, Y. and P.S. Goldman-Rakic, *D₂ receptor regulation of synaptic burst firing in prefrontal cortical pyramidal neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(14): p. 5093-8.
264. Tseng, K.Y. and P. O'Donnell, *D₂ dopamine receptors recruit a GABA component for their attenuation of excitatory synaptic transmission in the adult rat prefrontal cortex*. Synapse, 2007. **61**(10): p. 843-50.
265. Puig, M.V., et al., *Serotonin modulates fast-spiking interneuron and synchronous activity in the rat prefrontal cortex through 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors*. J Neurosci, 2010. **30**(6): p. 2211-22.
266. Robbins, T.W., *Chemistry of the mind: neurochemical modulation of prefrontal cortical function*. J Comp Neurol, 2005. **493**(1): p. 140-6.
267. Goto, Y. and A.A. Grace, *Dopaminergic modulation of limbic and cortical drive of nucleus accumbens in goal-directed behavior*. Nat Neurosci, 2005. **8**(6): p. 805-12.
268. Gais, S. and J. Born, *Declarative memory consolidation: mechanisms acting during human sleep*. Learn Mem, 2004. **11**(6): p. 679-85.
269. Hasselmo, M.E., *Neuromodulation: acetylcholine and memory consolidation*. Trends Cogn Sci, 1999. **3**(9): p. 351-359.
270. Gill, T.M., M. Sarter, and B. Givens, *Sustained visual attention performance-associated prefrontal neuronal activity: evidence for cholinergic modulation*. J Neurosci, 2000. **20**(12): p. 4745-57.
271. Turchi, J. and M. Sarter, *Cortical acetylcholine and processing capacity: effects of cortical cholinergic deafferentation on crossmodal divided attention in rats*. Brain Res Cogn Brain Res, 1997. **6**(2): p. 147-58.
272. Carli, M., et al., *Effects of lesions to ascending noradrenergic neurones on performance of a 5-choice serial reaction task in rats; implications for theories of dorsal noradrenergic bundle function based on selective attention and arousal*. Behav Brain Res, 1983. **9**(3): p. 361-80.

273. Cole, B.J. and T.W. Robbins, *Forebrain norepinephrine: role in controlled information processing in the rat*. Neuropsychopharmacology, 1992. 7(2): p. 129-42.
274. Harrison, A.A., B.J. Everitt, and T.W. Robbins, *Central 5-HT depletion enhances impulsive responding without affecting the accuracy of attentional performance: interactions with dopaminergic mechanisms*. Psychopharmacology (Berl), 1997. 133(4): p. 329-42.
275. Robbins, T.W., *The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry*. Psychopharmacology (Berl), 2002. 163(3-4): p. 362-80.
276. Koskinen, T., S. Ruotsalainen, and J. Sirvio, *The 5-HT₂ receptor activation enhances impulsive responding without increasing motor activity in rats*. Pharmacol Biochem Behav, 2000. 66(4): p. 729-38.
277. Winstanley, C.A., et al., *Intra-prefrontal 8-OH-DPAT and M100907 improve visuospatial attention and decrease impulsivity on the five-choice serial reaction time task in rats*. Psychopharmacology (Berl), 2003. 167(3): p. 304-14.
278. Williams, G.V. and P.S. Goldman-Rakic, *Modulation of memory fields by dopamine D₁ receptors in prefrontal cortex*. Nature, 1995. 376(6541): p. 572-5.
279. Goldman-Rakic, P.S., *Memory: recording experience in cells and circuits: diversity in memory research*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(24): p. 13435-7.
280. Seamans, J.K. and C.R. Yang, *The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex*. Prog Neurobiol, 2004. 74(1): p. 1-58.
281. Tzschentke, T.M., *Pharmacology and behavioral pharmacology of the mesocortical dopamine system*. Prog Neurobiol, 2001. 63(3): p. 241-320.
282. O'Donnell, P., *Dopamine gating of forebrain neural ensembles*. Eur J Neurosci, 2003. 17(3): p. 429-35.
283. Aultman, J.M. and B. Moghaddam, *Distinct contributions of glutamate and dopamine receptors to temporal aspects of rodent working memory using a clinically relevant task*. Psychopharmacology (Berl), 2001. 153(3): p. 353-64.
284. Brozoski, T.J., et al., *Cognitive deficit caused by regional depletion of dopamine in prefrontal cortex of rhesus monkey*. Science, 1979. 205(4409): p. 929-32.

285. Broersen, L.M., et al., *The role of the medial prefrontal cortex of rats in short-term memory functioning: further support for involvement of cholinergic, rather than dopaminergic mechanisms*. Brain Res, 1995. **674**(2): p. 221-9.
286. Floresco, S.B. and A.G. Phillips, *Delay-dependent modulation of memory retrieval by infusion of a dopamine D₁ agonist into the rat medial prefrontal cortex*. Behav Neurosci, 2001. **115**(4): p. 934-9.
287. Zahrt, J., et al., *Supranormal stimulation of D₁ dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance*. J Neurosci, 1997. **17**(21): p. 8528-35.
288. Robbins, T.W., *Chemical neuromodulation of frontal-executive functions in humans and other animals*. Exp Brain Res, 2000. **133**(1): p. 130-8.
289. Dunnett, S.B., A.T. Wareham, and E.M. Torres, *Cholinergic blockade in prefrontal cortex and hippocampus disrupts short-term memory in rats*. Neuroreport, 1990. **1**(1): p. 61-4.
290. Ragozzino, M.E. and R.P. Kesner, *The effects of muscarinic cholinergic receptor blockade in the rat anterior cingulate and Prelimbic/Infralimbic cortices on spatial working memory*. Neurobiol Learn Mem, 1998. **69**(3): p. 241-57.
291. Levin, E.D., E. Weber, and L. Icenogle, *Baclofen interactions with nicotine in rats: effects on memory*. Pharmacol Biochem Behav, 2004. **79**(2): p. 343-8.
292. Williams, G.V., S.G. Rao, and P.S. Goldman-Rakic, *The physiological role of 5-HT_{2A} receptors in working memory*. J Neurosci, 2002. **22**(7): p. 2843-54.
293. Kalaria, R.N. and A.C. Andorn, *Adrenergic receptors in aging and Alzheimer's disease: decreased alpha 2-receptors demonstrated by [³H]p-aminoclonidine binding in prefrontal cortex*. Neurobiol Aging, 1991. **12**(2): p. 131-6.
294. Laruelle, M. and A. Abi-Dargham, *Dopamine as the wind of the psychotic fire: new evidence from brain imaging studies*. J Psychopharmacol, 1999. **13**(4): p. 358-71.
295. Arango, V., M.D. Underwood, and J.J. Mann, *Serotonin brain circuits involved in major depression and suicide*. Prog Brain Res, 2002. **136**: p. 443-53.

296. Mattes, J.A., *The role of frontal lobe dysfunction in childhood hyperkinesia*. Compr Psychiatry, 1980. **21**(5): p. 358-69.
297. Kroeze, W.K. and B.L. Roth, *The molecular biology of serotonin receptors: therapeutic implications for the interface of mood and psychosis*. Biol Psychiatry, 1998. **44**(11): p. 1128-42.
298. Meltzer, H.Y., *The role of serotonin in antipsychotic drug action*. Neuropsychopharmacology, 1999. **21**(2 Suppl): p. 106S-115S.
299. Tyson, P.J., K.H. Roberts, and A.M. Mortimer, *Are the cognitive effects of atypical antipsychotics influenced by their affinity to 5HT-2A receptors?* Int J Neurosci, 2004. **114**(6): p. 593-611.
300. Kobilka, B.K., et al., *An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins*. Nature, 1987. **329**(6134): p. 75-9.
301. Fargin, A., et al., *The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor*. Nature, 1988. **335**(6188): p. 358-60.
302. Albert, P.R., et al., *Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene*. J Biol Chem, 1990. **265**(10): p. 5825-32.
303. Fujiwara, Y., et al., *The cloning and sequence analysis of the rat serotonin-1A receptor gene*. Life Sci, 1990. **47**(22): p. PL127-32.
304. Oakey, R.J., et al., *Genomic organization of adrenergic and serotonin receptors in the mouse: linkage mapping of sequence-related genes provides a method for examining mammalian chromosome evolution*. Genomics, 1991. **10**(2): p. 338-44.
305. Thierry-Mieg, D., et al. *The AceView genes*. December 12, 2009; Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly.
306. Thierry-Mieg, D. and J. Thierry-Mieg, *AceView: a comprehensive cDNA-supported gene and transcripts annotation*, in *Genome Biology*. 2006.
307. Laporte, A.M., et al., *Autoradiographic mapping of serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors in the aged human spinal cord*. J Chem Neuroanat, 1996. **11**(1): p. 67-75.

308. Pierce, P.A., et al., *5-Hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and sympathetic ganglia: a polymerase chain reaction study*. Neuroscience, 1996. **70**(2): p. 553-9.
309. Day, H.E., et al., *Differential expression of 5-HT_{1A}, alpha 1b adrenergic, CRF-R₁, and CRF-R₂ receptor mRNA in serotonergic, gamma-aminobutyric acidergic, and catecholaminergic cells of the rat dorsal raphe nucleus*. J Comp Neurol, 2004. **474**(3): p. 364-78.
310. Sotelo, C., et al., *Direct Immunohistochemical Evidence of the Existence of 5-HT_{1A} Autoreceptors on Serotonergic Neurons in the Midbrain Raphe Nuclei*. Eur J Neurosci, 1990. **2**(12): p. 1144-1154.
311. Verge, D., et al., *Presynaptic 5-HT autoreceptors on serotonergic cell bodies and/or dendrites but not terminals are of the 5-HT_{1A} subtype*. Eur J Pharmacol, 1985. **113**(3): p. 463-4.
312. Burnet, P.W., et al., *The distribution of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNA in human brain*. Brain Res, 1995. **676**(1): p. 157-68.
313. Chalmers, D.T. and S.J. Watson, *Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain--a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study*. Brain Res, 1991. **561**(1): p. 51-60.
314. Wright, D.E., et al., *Comparative localization of serotonin_{1A}, 1C, and 2 receptor subtype mRNAs in rat brain*. J Comp Neurol, 1995. **351**(3): p. 357-73.
315. Hoyer, D., et al., *Serotonin receptors in the human brain. I. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1A} recognition sites. Apparent absence of 5-HT_{1B} recognition sites*. Brain Res, 1986. **376**(1): p. 85-96.
316. Khawaja, X., *Quantitative autoradiographic characterisation of the binding of [³H]WAY-100635, a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist*. Brain Res, 1995. **673**(2): p. 217-25.
317. Sandell, J., et al., *New halogenated [¹¹C]WAY analogues, [¹¹C]6FPWAY and [¹¹C]6BPWAY--radiosynthesis and assessment as radioligands for the study of brain 5-HT_{1A} receptors in living monkey*. Nucl Med Biol, 2001. **28**(2): p. 177-85.

318. Shiue, C.Y., et al., *P-[18F]-MPPF: a potential radioligand for PET studies of 5-HT_{1A} receptors in humans*. Synapse, 1997. **25**(2): p. 147-54.
319. Farde, L., et al., *PET-characterization of [carbonyl-11C]WAY-100635 binding to 5-HT_{1A} receptors in the primate brain*. Psychopharmacology (Berl), 1997. **133**(2): p. 196-202.
320. Pike, V.W., et al., *[carbonyl-11C]Desmethyl-WAY-100635 (DWAY) is a potent and selective radioligand for central 5-HT_{1A} receptors in vitro and in vivo*. Eur J Nucl Med, 1998. **25**(4): p. 338-46.
321. Moller, M., A. Rodell, and A. Gjedde, *Parametric mapping of 5HT_{1A} receptor sites in the human brain with the Hypotime method: theory and normal values*. J Nucl Med, 2009. **50**(8): p. 1229-36.
322. Pike, V.W., et al., *First delineation of 5-HT_{1A} receptors in human brain with PET and [11C]WAY-100635*. Eur J Pharmacol, 1995. **283**(1-3): p. R1-3.
323. Ito, H., C. Halldin, and L. Farde, *Localization of 5-HT_{1A} receptors in the living human brain using [carbonyl-11C]WAY-100635: PET with anatomic standardization technique*. J Nucl Med, 1999. **40**(1): p. 102-9.
324. Passchier, J., et al., *Quantitative imaging of 5-HT_{1A} receptor binding in healthy volunteers with [(18)f]p-MPPF*. Nucl Med Biol, 2000. **27**(5): p. 473-6.
325. Houle, S., et al., *Imaging 5-HT_{1A} receptors with positron emission tomography: initial human studies with [11C]CPC-222*. Nucl Med Commun, 1997. **18**(12): p. 1130-4.
326. de Almeida, J. and G. Mengod, *Serotonin 1A receptors in human and monkey prefrontal cortex are mainly expressed in pyramidal neurons and in a GABAergic interneuron subpopulation: implications for schizophrenia and its treatment*. J Neurochem, 2008. **107**(2): p. 488-96.
327. Kia, H.K., et al., *Ultrastructural localization of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in the rat brain*. J Neurosci Res, 1996. **46**(6): p. 697-708.
328. Riad, M., et al., *Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain*. J Comp Neurol, 2000. **417**(2): p. 181-94.

329. Azmitia, E.C., et al., *Cellular localization of the 5-HT_{1A} receptor in primate brain neurons and glial cells*. Neuropsychopharmacology, 1996. **14**(1): p. 35-46.
330. Czyrak, A., et al., *Serotonin 5-HT_{1A} receptors might control the output of cortical glutamatergic neurons in rat cingulate cortex*. Brain Res, 2003. **989**(1): p. 42-51.
331. Cruz, D.A., et al., *Serotonin_{1A} receptors at the axon initial segment of prefrontal pyramidal neurons in schizophrenia*. Am J Psychiatry, 2004. **161**(4): p. 739-42.
332. Hartig, P.R., *Molecular biology of 5-HT receptors*. Trends Pharmacol Sci, 1989. **10**(2): p. 64-9.
333. Raymond, J.R., C.L. Olsen, and T.W. Gettys, *Cell-specific physical and functional coupling of human 5-HT_{1A} receptors to inhibitory G protein alpha-subunits and lack of coupling to G_s alpha*. Biochemistry, 1993. **32**(41): p. 11064-73.
334. Innis, R.B. and G.K. Aghajanian, *Pertussis toxin blocks 5-HT_{1A} and GABAB receptor-mediated inhibition of serotonergic neurons*. Eur J Pharmacol, 1987. **143**(2): p. 195-204.
335. Innis, R.B., E.J. Nestler, and G.K. Aghajanian, *Evidence for G protein mediation of serotonin- and GABAB-induced hyperpolarization of rat dorsal raphe neurons*. Brain Res, 1988. **459**(1): p. 27-36.
336. Andrade, R., R.C. Malenka, and R.A. Nicoll, *A G protein couples serotonin and GABAB receptors to the same channels in hippocampus*. Science, 1986. **234**(4781): p. 1261-5.
337. Mannoury la Cour, C., et al., *Regional differences in the coupling of 5-hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(3): p. 1013-21.
338. Albert, P.R. and M. Tiberi, *Receptor signaling and structure: insights from serotonin-1 receptors*. Trends Endocrinol Metab, 2001. **12**(10): p. 453-60.
339. De Vivo, M. and S. Maayani, *Characterization of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor-mediated inhibition of forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in guinea pig and rat hippocampal membranes*. J Pharmacol Exp Ther, 1986. **238**(1): p. 248-53.

340. Clarke, W.P., F.D. Yocca, and S. Maayani, *Lack of 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated inhibition of adenylyl cyclase in dorsal raphe of male and female rats*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **277**(3): p. 1259-66.
341. Valdizan, E.M., E. Castro, and A. Pazos, *Agonist-dependent modulation of G-protein coupling and transduction of 5-HT_{1A} receptors in rat dorsal raphe nucleus*. Int J Neuropsychopharmacol, 2009: p. 1-9.
342. Palego, L., et al., *Effects of postmortem delay on serotonin and (+)8-OH-DPAT-mediated inhibition of adenylyl cyclase activity in rat and human brain tissues*. Brain Res, 1999. **816**(1): p. 165-74.
343. Marazziti, D., et al., *Region-dependent effects of flibanserin and buspirone on adenylyl cyclase activity in the human brain*. Int J Neuropsychopharmacol, 2002. **5**(2): p. 131-40.
344. Andrade, R. and R.A. Nicoll, *Pharmacologically distinct actions of serotonin on single pyramidal neurones of the rat hippocampus recorded in vitro*. J Physiol, 1987. **394**: p. 99-124.
345. Aghajanian, G.K. and J.M. Lakoski, *Hyperpolarization of serotonergic neurons by serotonin and LSD: studies in brain slices showing increased K⁺ conductance*. Brain Res, 1984. **305**(1): p. 181-5.
346. Colino, A. and J.V. Halliwell, *Differential modulation of three separate K-conductances in hippocampal CA₁ neurons by serotonin*. Nature, 1987. **328**(6125): p. 73-7.
347. Lei, Q., et al., *Activation and inhibition of G protein-coupled inwardly rectifying potassium (Kir₃) channels by G protein beta gamma subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(17): p. 9771-6.
348. Williams, J.T., W.F. Colmers, and Z.Z. Pan, *Voltage- and ligand-activated inwardly rectifying currents in dorsal raphe neurons in vitro*. J Neurosci, 1988. **8**(9): p. 3499-506.
349. Penington, N.J. and J.S. Kelly, *Serotonin receptor activation reduces calcium current in an acutely dissociated adult central neuron*. Neuron, 1990. **4**(5): p. 751-8.

350. Penington, N.J., J.S. Kelly, and A.P. Fox, *A study of the mechanism of Ca²⁺ current inhibition produced by serotonin in rat dorsal raphe neurons*. J Neurosci, 1991. **11**(11): p. 3594-609.
351. Albert, P.R., et al., *Constitutive G(i2)-dependent activation of adenylyl cyclase type II by the 5-HT_{1A} receptor. Inhibition by anxiolytic partial agonists*. J Biol Chem, 1999. **274**(50): p. 35469-74.
352. Fargin, A., et al., *Effector coupling mechanisms of the cloned 5-HT_{1A} receptor*. J Biol Chem, 1989. **264**(25): p. 14848-52.
353. Liu, Y.F. and P.R. Albert, *Cell-specific signaling of the 5-HT_{1A} receptor. Modulation by protein kinases C and A*. J Biol Chem, 1991. **266**(35): p. 23689-97.
354. Lembo, P.M. and P.R. Albert, *Multiple phosphorylation sites are required for pathway-selective uncoupling of the 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor by protein kinase C*. Mol Pharmacol, 1995. **48**(6): p. 1024-9.
355. Chaput, Y., C. de Montigny, and P. Blier, *Presynaptic and postsynaptic modifications of the serotonin system by long-term administration of antidepressant treatments. An in vivo electrophysiologic study in the rat*. Neuropsychopharmacology, 1991. **5**(4): p. 219-29.
356. Chaput, Y., C. de Montigny, and P. Blier, *Effects of a selective 5-HT reuptake blocker, citalopram, on the sensitivity of 5-HT autoreceptors: electrophysiological studies in the rat brain*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1986. **333**(4): p. 342-8.
357. Hervas, I., et al., *Desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors by a low chronic fluoxetine dose effect of the concurrent administration of WAY-100635*. Neuropsychopharmacology, 2001. **24**(1): p. 11-20.
358. Le Poul, E., et al., *Fluoxetine-induced desensitization of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors is independent of glucocorticoid(s)*. Synapse, 1997. **27**(4): p. 303-12.
359. Blier, P. and C. de Montigny, *Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT_{1A} agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain*. Synapse, 1987. **1**(5): p. 470-80.

360. Le Poul, E., et al., *Chronic alnespirone-induced desensitization of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in the rat dorsal raphe nucleus*. Eur J Pharmacol, 1999. **365**(2-3): p. 165-73.
361. Mannoury la Cour, C., et al., *Functional consequences of 5-HT transporter gene disruption on 5-HT(1a) receptor-mediated regulation of dorsal raphe and hippocampal cell activity*. J Neurosci, 2001. **21**(6): p. 2178-85.
362. Elena Castro, M., et al., *Chronic fluoxetine induces opposite changes in G protein coupling at pre and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in rat brain*. Neuropharmacology, 2003. **44**(1): p. 93-101.
363. Hensler, J.G., *Differential regulation of 5-HT_{1A} receptor-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration*. Neuropsychopharmacology, 2002. **26**(5): p. 565-73.
364. Riad, M., et al., *Agonist-induced internalization of serotonin-1a receptors in the dorsal raphe nucleus (autoreceptors) but not hippocampus (heteroreceptors)*. J Neurosci, 2001. **21**(21): p. 8378-86.
365. Zimmer, L., et al., *Toward brain imaging of serotonin 5-HT_{1A} autoreceptor internalization*. Neuroimage, 2004. **22**(3): p. 1421-6.
366. Lukasiewicz, S., et al., *Fluorescence studies of homooligomerization of adenosine A_{2A} and serotonin 5-HT_{1A} receptors reveal the specificity of receptor interactions in the plasma membrane*. Pharmacol Rep, 2007. **59**(4): p. 379-92.
367. Salim, K., et al., *Oligomerization of G-protein-coupled receptors shown by selective co-immunoprecipitation*. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15482-5.
368. Goodwin, G.M. and A.R. Green, *A behavioural and biochemical study in mice and rats of putative selective agonists and antagonists for 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors*. Br J Pharmacol, 1985. **84**(3): p. 743-53.
369. Hjorth, S., *Hypothermia in the rat induced by the potent serotonergic agent 8-OH-DPAT*. J Neural Transm, 1985. **61**(1-2): p. 131-5.
370. Maswood, N., M. Caldarola-Pastuszka, and L. Uphouse, *Functional integration among 5-hydroxytryptamine receptor families in the control of female rat sexual behavior*. Brain Res, 1998. **802**(1-2): p. 98-103.

371. Yamada, J., Y. Sugimoto, and T. Yoshikawa, *Effects of adrenalectomy on hyperphagia induced by the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT and 2-deoxy-D-glucose in rats*. *Neuroreport*, 1998. **9**(8): p. 1831-3.
372. Iken, K., et al., *Serotonin upregulates mitogen-stimulated B lymphocyte proliferation through 5-HT_{1A} receptors*. *Cell Immunol*, 1995. **163**(1): p. 1-9.
373. Sumiyoshi, T. and H.Y. Meltzer, *Serotonin 1A receptors in memory function*. *Am J Psychiatry*, 2004. **161**(8): p. 1505; author reply 1505-6.
374. Galeotti, N., C. Ghelardini, and A. Bartolini, *5-HT_{1A} agonists induce central cholinergic antinociception*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1997. **57**(4): p. 835-41.
375. Parks, C.L., et al., *Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(18): p. 10734-9.
376. Blier, P. and N.M. Ward, *Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression?* *Biol Psychiatry*, 2003. **53**(3): p. 193-203.
377. Borg, J., *Molecular imaging of the 5-HT_{1A} receptor in relation to human cognition*. *Behav Brain Res*, 2008. **195**(1): p. 103-11.
378. Sarnyai, Z., et al., *Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin(1A) receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(26): p. 14731-6.
379. Luna-Munguia, H., et al., *5-HT_{1A} receptor expression during memory formation*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2005. **181**(2): p. 309-18.
380. Harder, J.A., et al., *The 5-HT_{1A} antagonist, WAY 100635, ameliorates the cognitive impairment induced by fornix transection in the marmoset*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1996. **127**(3): p. 245-54.
381. Harder, J.A. and R.M. Ridley, *The 5-HT_{1A} antagonist, WAY 100 635, alleviates cognitive impairments induced by dizocilpine (MK-801) in monkeys*. *Neuropharmacology*, 2000. **39**(4): p. 547-52.
382. Hirst, W.D., et al., *Correlating efficacy in rodent cognition models with in vivo 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor occupancy by a novel antagonist, (R)-N-(2-methyl-(4-indolyl-1-piperazinyl)ethyl)-N-(2-pyridinyl)-cyclohexan e carboxamide (WAY-101405)*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008. **325**(1): p. 134-45.

383. Misane, I. and S.O. Ogren, *Selective 5-HT_{1A} antagonists WAY 100635 and NAD-299 attenuate the impairment of passive avoidance caused by scopolamine in the rat*. *Neuropsychopharmacology*, 2003. **28**(2): p. 253-64.
384. King, M.V., C.A. Marsden, and K.C. Fone, *A role for the 5-HT_{1A}, 5-HT₄ and 5-HT₆ receptors in learning and memory*. *Trends Pharmacol Sci*, 2008. **29**(9): p. 482-92.
385. Carli, M. and R. Samanin, *8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin impairs spatial learning in a water maze: role of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors*. *Br J Pharmacol*, 1992. **105**(3): p. 720-6.
386. Misane, I., C. Johansson, and S.O. Ogren, *Analysis of the 5-HT_{1A} receptor involvement in passive avoidance in the rat*. *Br J Pharmacol*, 1998. **125**(3): p. 499-509.
387. Luttgen, M., et al., *Analysis of the role of 5-HT_{1A} receptors in spatial and aversive learning in the rat*. *Neuropharmacology*, 2005. **48**(6): p. 830-52.
388. Rowan, M.J., W.K. Cullen, and B. Moulton, *Bupirone impairment of performance of passive avoidance and spatial learning tasks in the rat*. *Psychopharmacology (Berl)*, 1990. **100**(3): p. 393-8.
389. Kant, G.J., et al., *Effects of the serotonin receptor agonists 8-OH-DPAT and TFMPP on learning as assessed using a novel water maze*. *Pharmacol Biochem Behav*, 1996. **53**(2): p. 385-90.
390. Bubenikova-Valesova, V., et al., *The opposite effect of a low and a high dose of serotonin-1A agonist on behavior induced by MK-801*. *Neuropharmacology*, 2007. **52**(4): p. 1071-8.
391. McLean, S.L., et al., *Role of 5-HT receptor mechanisms in sub-chronic PCP-induced reversal learning deficits in the rat*. *Psychopharmacology (Berl)*, 2009. **206**(3): p. 403-14.
392. Warburton, E.C., et al., *Contrasting effects of systemic and intracerebral infusions of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT on spatial short-term working memory in rats*. *Behav Brain Res*, 1997. **84**(1-2): p. 247-58.
393. Sakai, N. and C. Tanaka, *Inhibitory modulation of long-term potentiation via the 5-HT_{1A} receptor in slices of the rat hippocampal dentate gyrus*. *Brain Res*, 1993. **613**(2): p. 326-30.

394. Sanberg, C.D., et al., *5-HT_{1A} receptor antagonists block perforant path-dentate LTP induced in novel, but not familiar, environments*. Learn Mem, 2006. **13**(1): p. 52-62.
395. Francis, P.T., M.N. Pangalos, and D.M. Bowen, *Animal and drug modelling for Alzheimer synaptic pathology*. Prog Neurobiol, 1992. **39**(5): p. 517-45.
396. Meltzer, C.C., et al., *Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging*. Neuropsychopharmacology, 1998. **18**(6): p. 407-30.
397. Francis, P.T., et al., *Antemortem measurements of neurotransmission: possible implications for pharmacotherapy of Alzheimer's disease and depression*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1993. **56**(1): p. 80-4.
398. Sumiyoshi, T., et al., *The effect of tandospirone, a serotonin(1A) agonist, on memory function in schizophrenia*. Biol Psychiatry, 2001. **49**(10): p. 861-8.
399. Sumiyoshi, T., et al., *Enhancement of cognitive performance in schizophrenia by addition of tandospirone to neuroleptic treatment*. Am J Psychiatry, 2001. **158**(10): p. 1722-5.
400. Sumiyoshi, T., et al., *Effective adjunctive use of tandospirone with perospirone for enhancing verbal memory and quality of life in schizophrenia*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2007. **31**(4): p. 965-7.
401. Yasuno, F., et al., *Inhibitory effect of hippocampal 5-HT_{1A} receptors on human explicit memory*. Am J Psychiatry, 2003. **160**(2): p. 334-40.
402. Davies, G., et al., *A systematic review and meta-analysis of Northern Hemisphere season of birth studies in schizophrenia*. Schizophr Bull, 2003. **29**(3): p. 587-93.
403. Castrogiovanni, P., et al., *Season of birth in psychiatry. A review*. Neuropsychobiology, 1998. **37**(4): p. 175-81.
404. Corcoran, C., et al., *Effect of socioeconomic status and parents' education at birth on risk of schizophrenia in offspring*. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol, 2009. **44**(4): p. 265-71.
405. Coid, J.W., et al., *Raised incidence rates of all psychoses among migrant groups: findings from the East London first episode psychosis study*. Arch Gen Psychiatry, 2008. **65**(11): p. 1250-8.

406. Kelly, B.D., et al., *Schizophrenia and the city: A review of literature and prospective study of psychosis and urbanicity in Ireland*. Schizophr Res, 2010. **116**(1): p. 75-89.
407. Lewis, D.A. and J.A. Lieberman, *Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology*. Neuron, 2000. **28**(2): p. 325-34.
408. Willhite, R.K., et al., *Gender differences in symptoms, functioning and social support in patients at ultra-high risk for developing a psychotic disorder*. Schizophr Res, 2008. **104**(1-3): p. 237-45.
409. Green, M.F., et al., *Neurocognitive deficits and functional outcome in schizophrenia: are we measuring the "right stuff"?* Schizophr Bull, 2000. **26**(1): p. 119-36.
410. Green, M.F., *What are the functional consequences of neurocognitive deficits in schizophrenia?* Am J Psychiatry, 1996. **153**(3): p. 321-30.
411. Palmer, B.W., et al., *Is it possible to be schizophrenic yet neuropsychologically normal?* Neuropsychology, 1997. **11**(3): p. 437-46.
412. Cardno, A.G., et al., *Dimensions of psychosis in affected sibling pairs*. Schizophr Bull, 1999. **25**(4): p. 841-50.
413. Cardno, A.G., et al., *Heritability estimates for psychotic disorders: the Maudsley twin psychosis series*. Arch Gen Psychiatry, 1999. **56**(2): p. 162-8.
414. Tsuang, M.T., W.S. Stone, and S.V. Faraone, *Genes, environment and schizophrenia*. Br J Psychiatry Suppl, 2001. **40**: p. s18-24.
415. O'Rourke, D.H., et al., *Refutation of the general single-locus model for the etiology of schizophrenia*. Am J Hum Genet, 1982. **34**(4): p. 630-49.
416. Stefansson, H., et al., *Neuregulin 1 and susceptibility to schizophrenia*. Am J Hum Genet, 2002. **71**(4): p. 877-92.
417. Weinberger, D.R., *Genetic mechanisms of psychosis: in vivo and postmortem genomics*. Clin Ther, 2005. **27** Suppl A: p. S8-15.
418. Grady, R.M., et al., *Maturation and maintenance of the neuromuscular synapse: genetic evidence for roles of the dystrophin-glycoprotein complex*. Neuron, 2000. **25**(2): p. 279-93.

419. Johnstone, E.C., et al., *Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia*. *Lancet*, 1976. **2**(7992): p. 924-6.
420. Nelson, M.D., et al., *Hippocampal volume reduction in schizophrenia as assessed by magnetic resonance imaging: a meta-analytic study*. *Arch Gen Psychiatry*, 1998. **55**(5): p. 433-40.
421. McCarley, R.W., et al., *MRI anatomy of schizophrenia*. *Biol Psychiatry*, 1999. **45**(9): p. 1099-119.
422. Weinberger, D.R., et al., *The frontal lobes and schizophrenia*. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 1994. **6**(4): p. 419-27.
423. Andreasen, N.C., et al., *Hypofrontality in schizophrenia: distributed dysfunctional circuits in neuroleptic-naive patients*. *Lancet*, 1997. **349**(9067): p. 1730-4.
424. Drevets, W.C., *Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders*. *Curr Opin Neurobiol*, 2001. **11**(2): p. 240-9.
425. Potkin, S.G., et al., *A PET study of the pathophysiology of negative symptoms in schizophrenia. Positron emission tomography*. *Am J Psychiatry*, 2002. **159**(2): p. 227-37.
426. Callicott, J.H., et al., *Complexity of prefrontal cortical dysfunction in schizophrenia: more than up or down*. *Am J Psychiatry*, 2003. **160**(12): p. 2209-15.
427. Waberski, T.D., et al., *Electrophysiological evidence for altered early cerebral somatosensory signal processing in schizophrenia*. *Psychophysiology*, 2004. **41**(3): p. 361-6.
428. Bertolino, A., et al., *The relationship between dorsolateral prefrontal neuronal N-acetylaspartate and evoked release of striatal dopamine in schizophrenia*. *Neuropsychopharmacology*, 2000. **22**(2): p. 125-32.
429. Matsuura, M., et al., *Clinical significance of diffuse delta EEG activity in chronic schizophrenia*. *Clin Electroencephalogr*, 1994. **25**(3): p. 115-21.
430. Winterer, G., et al., *Prefrontal broadband noise, working memory, and genetic risk for schizophrenia*. *Am J Psychiatry*, 2004. **161**(3): p. 490-500.

431. Gallinat, J., et al., *Reduced oscillatory gamma-band responses in unmedicated schizophrenic patients indicate impaired frontal network processing*. Clin Neurophysiol, 2004. **115**(8): p. 1863-74.
432. Broadbelt, K., W. Byne, and L.B. Jones, *Evidence for a decrease in basilar dendrites of pyramidal cells in schizophrenic medial prefrontal cortex*. Schizophr Res, 2002. **58**(1): p. 75-81.
433. Harrison, P.J., *The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation*. Brain, 1999. **122 (Pt 4)**: p. 593-624.
434. Lewis, D.A., T. Hashimoto, and H.M. Morris, *Cell and receptor type-specific alterations in markers of GABA neurotransmission in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia*. Neurotox Res, 2008. **14**(2-3): p. 237-48.
435. Benes, F.M., et al., *Up-regulation of GABAA receptor binding on neurons of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects*. Neuroscience, 1996. **75**(4): p. 1021-31.
436. Beasley, C.L. and G.P. Reynolds, *Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics*. Schizophr Res, 1997. **24**(3): p. 349-55.
437. Guidotti, A., et al., *Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study*. Arch Gen Psychiatry, 2000. **57**(11): p. 1061-9.
438. Tsai, G. and J.T. Coyle, *N-acetylaspartate in neuropsychiatric disorders*. Prog Neurobiol, 1995. **46**(5): p. 531-40.
439. Bertolino, A., et al., *Regionally specific pattern of neurochemical pathology in schizophrenia as assessed by multislice proton magnetic resonance spectroscopic imaging*. Am J Psychiatry, 1996. **153**(12): p. 1554-63.
440. Carlsson, A., *The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia*. Neuropsychopharmacology, 1988. **1**(3): p. 179-86.
441. Carlsson, A., *Does dopamine play a role in schizophrenia?* Psychol Med, 1977. **7**(4): p. 583-97.
442. Davis, K.L., et al., *Dopamine in schizophrenia: a review and reconceptualization*. Am J Psychiatry, 1991. **148**(11): p. 1474-86.

443. Jaskiw, G. and D.R. Weinberger, *The prefrontal cortex-accumbens circuit: Who's in charge?* Behav Brain Sci, 1987. **10**: p. 217-218.
444. Weinberger, D.R., *Implications of normal brain development for the pathogenesis of schizophrenia.* Arch Gen Psychiatry, 1987. **44**(7): p. 660-9.
445. Seeman, P., et al., *Brain receptors for antipsychotic drugs and dopamine: direct binding assays.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(11): p. 4376-80.
446. Seeman, P., *Dopamine receptor sequences. Therapeutic levels of neuroleptics occupy D₂ receptors, clozapine occupies D₄.* Neuropsychopharmacology, 1992. **7**(4): p. 261-84.
447. Kapur, S. and P. Seeman, *Atypical antipsychotics, cortical D(2) receptors and sensitivity to endogenous dopamine.* Br J Psychiatry, 2002. **180**: p. 465-6.
448. Thaker, G.K. and W.T. Carpenter, Jr., *Advances in schizophrenia.* Nat Med, 2001. **7**(6): p. 667-71.
449. Glennon, R.A., M. Titeler, and J.D. McKenney, *Evidence for 5-HT₂ involvement in the mechanism of action of hallucinogenic agents.* Life Sci, 1984. **35**(25): p. 2505-11.
450. Ichikawa, J. and H.Y. Meltzer, *Relationship between dopaminergic and serotonergic neuronal activity in the frontal cortex and the action of typical and atypical antipsychotic drugs.* Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci, 1999. **249** Suppl 4: p. 90-8.
451. Millan, M.J., *Improving the treatment of schizophrenia: focus on serotonin (5-HT)(1A) receptors.* J Pharmacol Exp Ther, 2000. **295**(3): p. 853-61.
452. Ichikawa, J., et al., *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, 2001. **76**(5): p. 1521-31.
453. Roth, B.L., S.M. Hanizavareh, and A.E. Blum, *Serotonin receptors represent highly favorable molecular targets for cognitive enhancement in schizophrenia and other disorders.* Psychopharmacology (Berl), 2004. **174**(1): p. 17-24.
454. Meltzer, H.Y., *Clinical studies on the mechanism of action of clozapine: the dopamine-serotonin hypothesis of schizophrenia.* Psychopharmacology (Berl), 1989. **99** Suppl: p. S18-27.

455. Krystal, J.H., et al., *Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses.* Arch Gen Psychiatry, 1994. **51**(3): p. 199-214.
456. Moghaddam, B., *Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia.* Neuron, 2003. **40**(5): p. 881-4.
457. Javitt, D.C. and S.R. Zukin, *Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia.* Am J Psychiatry, 1991. **148**(10): p. 1301-8.
458. Lahti, A.C., et al., *Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia.* Neuropsychopharmacology, 1995. **13**(1): p. 9-19.
459. Akbarian, S., et al., *Gene expression for glutamic acid decarboxylase is reduced without loss of neurons in prefrontal cortex of schizophrenics.* Arch Gen Psychiatry, 1995. **52**(4): p. 258-66.
460. Volk, D.W., et al., *Decreased glutamic acid decarboxylase67 messenger RNA expression in a subset of prefrontal cortical gamma-aminobutyric acid neurons in subjects with schizophrenia.* Arch Gen Psychiatry, 2000. **57**(3): p. 237-45.
461. Knable, M.B., et al., *Molecular abnormalities in the major psychiatric illnesses: Classification and Regression Tree (CRT) analysis of post-mortem prefrontal markers.* Mol Psychiatry, 2002. **7**(4): p. 392-404.
462. Carlsson, M. and A. Carlsson, *Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia--implications for schizophrenia and Parkinson's disease.* Trends Neurosci, 1990. **13**(7): p. 272-6.
463. Sesack, S.R., et al., *Anatomical substrates for glutamate-dopamine interactions: evidence for specificity of connections and extrasynaptic actions.* Ann N Y Acad Sci, 2003. **1003**: p. 36-52.
464. Gilmore, J.H. and L.F. Jarskog, *Exposure to infection and brain development: cytokines in the pathogenesis of schizophrenia.* Schizophr Res, 1997. **24**(3): p. 365-7.
465. Urakubo, A., et al., *Prenatal exposure to maternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain.* Schizophr Res, 2001. **47**(1): p. 27-36.

466. Marx, C.E., et al., *Cytokine effects on cortical neuron MAP-2 immunoreactivity: implications for schizophrenia*. Biol Psychiatry, 2001. **50**(10): p. 743-9.
467. Fink, M., *Convulsive therapy: a review of the first 55 years*. J Affect Disord, 2001. **63**(1-3): p. 1-15.
468. Coentre, R., et al., [*Electroconvulsive therapy: myths and evidences*]. Acta Med Port, 2009. **22**(3): p. 275-80.
469. Lafon, R., et al., [*Treatment of schizophrenic syndromes with chlorpromazine*]. Montp Med, 1954. **46**(5): p. 284-91.
470. Enoch, M.D. and A.A. Robin, *A controlled trial of haloperidol in chronic schizophrenics*. J Ment Sci, 1960. **106**: p. 1459-67.
471. Brunello, N., et al., *New insights into the biology of schizophrenia through the mechanism of action of clozapine*. Neuropsychopharmacology, 1995. **13**(3): p. 177-213.
472. Kapur, S., et al., *Relationship between dopamine D(2) occupancy, clinical response, and side effects: a double-blind PET study of first-episode schizophrenia*. Am J Psychiatry, 2000. **157**(4): p. 514-20.
473. Knable, M.B. and D.R. Weinberger, *Dopamine, the prefrontal cortex and schizophrenia*. J Psychopharmacol, 1997. **11**(2): p. 123-31.
474. Haddad, P.M. and A. Wieck, *Antipsychotic-induced hyperprolactinaemia: mechanisms, clinical features and management*. Drugs, 2004. **64**(20): p. 2291-314.
475. Burki, H.R., et al., [*Pharmacological and neurochemical effects of clozapine (Leponex): new aspects in the drug therapy of schizophrenia*]. Schweiz Med Wochenschr, 1973. **103**(48): p. 1716-24.
476. Meltzer, H.Y., S. Park, and R. Kessler, *Cognition, schizophrenia, and the atypical antipsychotic drugs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13591-3.
477. Woodward, N.D., et al., *A meta-analysis of neuropsychological change to clozapine, olanzapine, quetiapine, and risperidone in schizophrenia*. Int J Neuropsychopharmacol, 2005. **8**(3): p. 457-72.

478. Sumiyoshi, C., et al., *Atypical antipsychotic drugs and organization of long-term semantic memory: multidimensional scaling and cluster analyses of category fluency performance in schizophrenia*. Int J Neuropsychopharmacol, 2006. **9**(6): p. 677-83.
479. Owens, D.G., *Adverse effects of antipsychotic agents. Do newer agents offer advantages?* Drugs, 1996. **51**(6): p. 895-930.
480. Ossowska, K., et al., *The role of glutamate receptors in antipsychotic drug action*. Amino Acids, 2000. **19**(1): p. 87-94.
481. Chaki, S., *Group II metabotropic glutamate receptor agonists as a potential drug for schizophrenia*. Eur J Pharmacol, 2010.
482. Newman-Tancredi, A., et al., *Novel antipsychotics activate recombinant human and native rat serotonin 5-HT_{1A} receptors: affinity, efficacy and potential implications for treatment of schizophrenia*. Int J Neuropsychopharmacol, 2005. **8**(3): p. 341-56.
483. Bishara, D. and D. Taylor, *Upcoming agents for the treatment of schizophrenia: mechanism of action, efficacy and tolerability*. Drugs, 2008. **68**(16): p. 2269-92.
484. Andine, P., et al., *Characterization of MK-801-induced behavior as a putative rat model of psychosis*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **290**(3): p. 1393-408.
485. Sumiyoshi, T., et al., *Serotonin_{1A} receptors in the pathophysiology of schizophrenia: development of novel cognition-enhancing therapeutics*. Adv Ther, 2008. **25**(10): p. 1037-56.
486. Wadenberg, M.L., *Serotonergic mechanisms in neuroleptic-induced catalepsy in the rat*. Neurosci Biobehav Rev, 1996. **20**(2): p. 325-39.
487. Casey, D.E., *Serotonergic and dopaminergic aspects of neuroleptic-induced extrapyramidal syndromes in nonhuman primates*. Psychopharmacology (Berl), 1993. **112**(1 Suppl): p. S55-9.
488. Burnet, P.W., S.L. Eastwood, and P.J. Harrison, *5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNAs and binding site densities are differentially altered in schizophrenia*. Neuropsychopharmacology, 1996. **15**(5): p. 442-55.
489. Burnet, P.W., S.L. Eastwood, and P.J. Harrison, *[³H]WAY-100635 for 5-HT_{1A} receptor autoradiography in human brain: a comparison with [³H]8-OH-DPAT and*

- demonstration of increased binding in the frontal cortex in schizophrenia.* *Neurochem Int*, 1997. **30**(6): p. 565-74.
490. Gurevich, E.V. and J.N. Joyce, *Alterations in the cortical serotonergic system in schizophrenia: a postmortem study.* *Biol Psychiatry*, 1997. **42**(7): p. 529-45.
491. Hashimoto, T., et al., *Increase in serotonin 5-HT_{1A} receptors in prefrontal and temporal cortices of brains from patients with chronic schizophrenia.* *Life Sci*, 1991. **48**(4): p. 355-63.
492. Joyce, J.N., et al., *Serotonin uptake sites and serotonin receptors are altered in the limbic system of schizophrenics.* *Neuropsychopharmacology*, 1993. **8**(4): p. 315-36.
493. Simpson, M.D., et al., *Autoradiography with [³H]8-OH-DPAT reveals increases in 5-HT_{1A} receptors in ventral prefrontal cortex in schizophrenia.* *Biol Psychiatry*, 1996. **39**(11): p. 919-28.
494. Sumiyoshi, T., et al., *Serotonin_{1A} receptors are increased in postmortem prefrontal cortex in schizophrenia.* *Brain Res*, 1996. **708**(1-2): p. 209-14.
495. Kasper, S., et al., *Receptor and transporter imaging studies in schizophrenia, depression, bulimia and Tourette's disorder--implications for psychopharmacology.* *World J Biol Psychiatry*, 2002. **3**(3): p. 133-46.
496. Tauscher, J., et al., *Brain serotonin 5-HT_{1A} receptor binding in schizophrenia measured by positron emission tomography and [¹¹C]WAY-100635.* *Arch Gen Psychiatry*, 2002. **59**(6): p. 514-20.
497. Newman-Tancredi, A., et al., *Agonist and antagonist actions of antipsychotic agents at 5-HT_{1A} receptors: a [³⁵S]GTPgammaS binding study.* *Eur J Pharmacol*, 1998. **355**(2-3): p. 245-56.
498. Chou, Y.H., C. Halldin, and L. Farde, *Occupancy of 5-HT_{1A} receptors by clozapine in the primate brain: a PET study.* *Psychopharmacology (Berl)*, 2003. **166**(3): p. 234-40.
499. Grayson, B., N.F. Idris, and J.C. Neill, *Atypical antipsychotics attenuate a sub-chronic PCP-induced cognitive deficit in the novel object recognition task in the rat.* *Behav Brain Res*, 2007. **184**(1): p. 31-8.

500. Rollema, H., et al., *Clozapine increases dopamine release in prefrontal cortex by 5-HT_{1A} receptor activation*. Eur J Pharmacol, 1997. **338**(2): p. R3-5.
501. Diaz-Mataix, L., et al., *Involvement of 5-HT_{1A} receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action*. J Neurosci, 2005. **25**(47): p. 10831-43.
502. Sato, M., et al., *Role of postsynaptic serotonin_{1A} receptors in risperidone-induced increase in acetylcholine release in rat prefrontal cortex*. Eur J Pharmacol, 2007. **559**(2-3): p. 155-60.
503. Nestler, E.J., et al., *Neurobiology of depression*. Neuron, 2002. **34**(1): p. 13-25.
504. Kaplan, S. and D. Lester, *Depression, mania, and suicidal preoccupation*. Psychol Rep, 1994. **74**(3 Pt 1): p. 974.
505. Ustun, T.B., *Cross-national epidemiology of depression and gender*. J Gend Specif Med, 2000. **3**(2): p. 54-8.
506. Tomlinson, M., et al., *The epidemiology of major depression in South Africa: results from the South African stress and health study*. S Afr Med J, 2009. **99**(5 Pt 2): p. 367-73.
507. Fava, M. and K.S. Kendler, *Major depressive disorder*. Neuron, 2000. **28**(2): p. 335-41.
508. Austin, M.P., P. Mitchell, and G.M. Goodwin, *Cognitive deficits in depression: possible implications for functional neuropathology*. Br J Psychiatry, 2001. **178**: p. 200-6.
509. Goodwin, G.M., *Neuropsychological and neuroimaging evidence for the involvement of the frontal lobes in depression*. J Psychopharmacol, 1997. **11**(2): p. 115-22.
510. McDermott, L.M. and K.P. Ebmeier, *A meta-analysis of depression severity and cognitive function*. J Affect Disord, 2009. **119**(1-3): p. 1-8.
511. Baudic, S., et al., *Executive deficits in elderly patients with major unipolar depression*. J Geriatr Psychiatry Neurol, 2004. **17**(4): p. 195-201.

512. Beate, B.C., B.J. Sahakian, and R. Levy, *Cognitive performance in tests sensitive to frontal lobe dysfunction in the elderly depressed*. *Psychol Med*, 1996. **26**(3): p. 591-603.
513. Merriam, E.P., et al., *Prefrontal cortical dysfunction in depression determined by Wisconsin Card Sorting Test performance*. *Am J Psychiatry*, 1999. **156**(5): p. 780-2.
514. Nebes, R.D., et al., *Persistence of cognitive impairment in geriatric patients following antidepressant treatment: a randomized, double-blind clinical trial with nortriptyline and paroxetine*. *J Psychiatr Res*, 2003. **37**(2): p. 99-108.
515. Purcell, R., et al., *Neuropsychological function in young patients with unipolar major depression*. *Psychol Med*, 1997. **27**(6): p. 1277-85.
516. Reppermund, S., et al., *Persistent cognitive impairment in depression: the role of psychopathology and altered hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) system regulation*. *Biol Psychiatry*, 2007. **62**(5): p. 400-6.
517. Sheline, Y.I., et al., *Cognitive function in late life depression: relationships to depression severity, cerebrovascular risk factors and processing speed*. *Biol Psychiatry*, 2006. **60**(1): p. 58-65.
518. Butters, M.A., et al., *The nature and determinants of neuropsychological functioning in late-life depression*. *Arch Gen Psychiatry*, 2004. **61**(6): p. 587-95.
519. Austin, M.P., et al., *Cognitive function in major depression*. *J Affect Disord*, 1992. **25**(1): p. 21-9.
520. Brebion, G., M.J. Smith, and D. Widlocher, *Discrimination and response bias in memory: effects of depression severity and psychomotor retardation*. *Psychiatry Res*, 1997. **70**(2): p. 95-103.
521. Porter, R.J., C. Bourke, and P. Gallagher, *Neuropsychological impairment in major depression: its nature, origin and clinical significance*. *Aust N Z J Psychiatry*, 2007. **41**(2): p. 115-28.
522. Smith, M.J., et al., *Experimental evidence for two dimensions of cognitive disorders in depressives*. *J Psychiatr Res*, 1994. **28**(4): p. 401-11.
523. Bhalla, R.K., et al., *Does education moderate neuropsychological impairment in late-life depression?* *Int J Geriatr Psychiatry*, 2005. **20**(5): p. 413-7.

524. Cataldo, M.G., et al., *Impulsivity in depressed children and adolescents: a comparison between behavioral and neuropsychological data*. Psychiatry Res, 2005. **136**(2-3): p. 123-33.
525. Naismith, S.L., et al., *Neuropsychological performance in patients with depression is associated with clinical, etiological and genetic risk factors*. J Clin Exp Neuropsychol, 2003. **25**(6): p. 866-77.
526. Elliott, R., et al., *Neuropsychological impairments in unipolar depression: the influence of perceived failure on subsequent performance*. Psychol Med, 1996. **26**(5): p. 975-89.
527. Austin, M.P., et al., *Cognitive function in depression: a distinct pattern of frontal impairment in melancholia?* Psychol Med, 1999. **29**(1): p. 73-85.
528. Liotti, M. and H.S. Mayberg, *The role of functional neuroimaging in the neuropsychology of depression*. J Clin Exp Neuropsychol, 2001. **23**(1): p. 121-36.
529. Zhu, M.Y., et al., *Elevated levels of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus in major depression*. Biol Psychiatry, 1999. **46**(9): p. 1275-86.
530. Manji, H.K., W.C. Drevets, and D.S. Charney, *The cellular neurobiology of depression*. Nat Med, 2001. **7**(5): p. 541-7.
531. Rajkowska, G., *Histopathology of the prefrontal cortex in major depression: what does it tell us about dysfunctional monoaminergic circuits?* Prog Brain Res, 2000. **126**: p. 397-412.
532. de Montigny, C., *[Neurophysiology and current trends in research on depression. Remarks on the monoaminergic hypothesis of depression]*. Union Med Can, 1977. **106**(6): p. 805-10.
533. La Pia, S., *[Monoamine's role in depression and possible consequences for the clinical management of the core symptoms of major depression]*. Riv Psichiatr, 2009. **44**(1): p. 1-14.
534. Bunney, W.E., Jr., B. Garland-Bunney, and S.B. Patel, *Biological markers in depression*. Psychopathology, 1986. **19** Suppl 2: p. 72-8.
535. Young, S.N., et al., *Tryptophan depletion causes a rapid lowering of mood in normal males*. Psychopharmacology (Berl), 1985. **87**(2): p. 173-7.

536. Asberg, M., et al., *Therapeutic effects of serotonin uptake inhibitors in depression*. J Clin Psychiatry, 1986. **47 Suppl**: p. 23-35.
537. Jans, L.A., et al., *Serotonergic vulnerability and depression: assumptions, experimental evidence and implications*. Mol Psychiatry, 2007. **12**(6): p. 522-43.
538. Last, J.H., *Adaptation to stress; pituitary-adrenal mechanisms*. Mod Hosp, 1949. **73**(3): p. 106-10.
539. Joels, M., et al., *Effects of chronic stress on structure and cell function in rat hippocampus and hypothalamus*. Stress, 2004. **7**(4): p. 221-31.
540. McEwen, B.S., *Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology*. Neuropsychopharmacology, 2000. **22**(2): p. 108-24.
541. Sapolsky, R.M., *Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders*. Arch Gen Psychiatry, 2000. **57**(10): p. 925-35.
542. Fuchs, E. and E. Gould, *Mini-review: in vivo neurogenesis in the adult brain: regulation and functional implications*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(7): p. 2211-4.
543. Yu, S., et al., *Depletion of the neural precursor cell pool by glucocorticoids*. Ann Neurol, 2010. **67**(1): p. 21-30.
544. Sachar, E.J. and M. Baron, *The biology of affective disorders*. Annu Rev Neurosci, 1979. **2**: p. 505-17.
545. De Kloet, E.R., et al., *Stress, glucocorticoids and development*. Prog Brain Res, 1988. **73**: p. 101-20.
546. Arborelius, L., et al., *The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders*. J Endocrinol, 1999. **160**(1): p. 1-12.
547. Holsboer, F., *Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy*. J Affect Disord, 2001. **62**(1-2): p. 77-91.
548. Kasckow, J.W., D. Baker, and T.D. Geraciotti, Jr., *Corticotropin-releasing hormone in depression and post-traumatic stress disorder*. Peptides, 2001. **22**(5): p. 845-51.
549. Duman, R.S., G.R. Heninger, and E.J. Nestler, *A molecular and cellular theory of depression*. Arch Gen Psychiatry, 1997. **54**(7): p. 597-606.

550. Smith, M.A., et al., *Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus*. J Neurosci, 1995. **15**(3 Pt 1): p. 1768-77.
551. Nibuya, M., S. Morinobu, and R.S. Duman, *Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments*. J Neurosci, 1995. **15**(11): p. 7539-47.
552. Filippini, V., *[The iminodibenzyl derivative G 22355 (Tofranil) in the cure of endogenous depressive states.]*. Boll Soc Med Chir Bresciana, 1960. **14**: p. 25-43.
553. Sinning, S., et al., *Binding and orientation of tricyclic antidepressants within the central substrate site of the human serotonin transporter*. J Biol Chem, 2010. **285**(11): p. 8363-74.
554. Roubert, C., et al., *Determination of residues in the norepinephrine transporter that are critical for tricyclic antidepressant affinity*. J Biol Chem, 2001. **276**(11): p. 8254-60.
555. Gillman, P.K., *Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated*. Br J Pharmacol, 2007. **151**(6): p. 737-48.
556. Dick, P., *[Therapeutic action of a monoamine oxidase inhibitor, mianserin (iproniazid), on depressive states.]*. Schweiz Med Wochenschr, 1959. **89**: p. 1288-91.
557. Sommi, R.W., M.L. Crismon, and C.L. Bowden, *Fluoxetine: a serotonin-specific, second-generation antidepressant*. Pharmacotherapy, 1987. **7**(1): p. 1-15.
558. Hyttel, J., *Neurochemical characterization of a new potent and selective serotonin uptake inhibitor: Lu 10-171*. Psychopharmacology (Berl), 1977. **51**(3): p. 225-33.
559. Chouinard, G., L. Annable, and J. Bradwejn, *An early phase II clinical trial of tomoxetine (LY139603) in the treatment of newly admitted depressed patients*. Psychopharmacology (Berl), 1984. **83**(1): p. 126-8.
560. Saletu, B., et al., *Tandamine--a new norepinephrine reuptake inhibitor. Clinical, psychometric and quantitative EEG studies in depressed patients*. Int Pharmacopsychiatry, 1977. **12**(3): p. 137-52.
561. Montgomery, S.A., *Rapid onset of action of venlafaxine*. Int Clin Psychopharmacol, 1995. **10 Suppl 2**: p. 21-7.

562. Artigas, F., V. Perez, and E. Alvarez, *Pindolol induces a rapid improvement of depressed patients treated with serotonin reuptake inhibitors*. Arch Gen Psychiatry, 1994. **51**(3): p. 248-51.
563. Artigas, F., et al., *Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists*. Trends Neurosci, 1996. **19**(9): p. 378-83.
564. Portella, M.J., et al., *Pindolol augmentation enhances response outcomes in first depressive episodes*. Eur Neuropsychopharmacol, 2009. **19**(7): p. 516-9.
565. Berton, O. and E.J. Nestler, *New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(2): p. 137-51.
566. Li, Y.W., et al., *The pharmacology of DMP696 and DMP904, non-peptidergic CRF₁ receptor antagonists*. CNS Drug Rev, 2005. **11**(1): p. 21-52.
567. Kramer, M.S., et al., *Distinct mechanism for antidepressant activity by blockade of central substance P receptors*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1640-5.
568. Blier, P., et al., *Impact of substance P receptor antagonism on the serotonin and norepinephrine systems: relevance to the antidepressant/anxiolytic response*. J Psychiatry Neurosci, 2004. **29**(3): p. 208-18.
569. DeBattista, C. and J. Hawkins, *Utility of atypical antipsychotics in the treatment of resistant unipolar depression*. CNS Drugs, 2009. **23**(5): p. 369-77.
570. Nestler, E.J., *Antidepressant treatments in the 21st century*. Biol Psychiatry, 1998. **44**(7): p. 526-33.
571. Savitz, J., I. Lucki, and W.C. Drevets, *5-HT_{1A} receptor function in major depressive disorder*. Prog Neurobiol, 2009. **88**(1): p. 17-31.
572. Wu, S. and D.E. Comings, *A common C-1018G polymorphism in the human 5-HT_{1A} receptor gene*. Psychiatr Genet, 1999. **9**(2): p. 105-6.
573. Lemonde, S., et al., *Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide*. J Neurosci, 2003. **23**(25): p. 8788-99.
574. Le Francois, B., et al., *Transcriptional regulation at a HTR_{1A} polymorphism associated with mental illness*. Neuropharmacology, 2008. **55**(6): p. 977-85.

575. David, S.P., et al., *A functional genetic variation of the serotonin (5-HT) transporter affects 5-HT_{1A} receptor binding in humans*. J Neurosci, 2005. **25**(10): p. 2586-90.
576. Parsey, R.V., et al., *Altered serotonin 1A binding in major depression: a [carbonyl-C-11]WAY100635 positron emission tomography study*. Biol Psychiatry, 2006. **59**(2): p. 106-13.
577. Czesak, M., et al., *Cell-specific repressor or enhancer activities of Deaf-1 at a serotonin 1A receptor gene polymorphism*. J Neurosci, 2006. **26**(6): p. 1864-71.
578. Szewczyk, B., et al., *Gender-specific decrease in NUDR and 5-HT_{1A} receptor proteins in the prefrontal cortex of subjects with major depressive disorder*. Int J Neuropsychopharmacol, 2009. **12**(2): p. 155-68.
579. Baune, B.T., et al., *Serotonin receptor 1A-1019C/G variant: impact on antidepressant pharmacoresponse in melancholic depression?* Neurosci Lett, 2008. **436**(2): p. 111-5.
580. Boldrini, M., et al., *Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides*. J Psychiatr Res, 2008. **42**(6): p. 433-42.
581. Stockmeier, C.A., et al., *Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity*. J Neurosci, 1998. **18**(18): p. 7394-401.
582. Anisman, H., et al., *Serotonin receptor subtype and p11 mRNA expression in stress-relevant brain regions of suicide and control subjects*. J Psychiatry Neurosci, 2008. **33**(2): p. 131-41.
583. Gray, L., E. Scarr, and B. Dean, *Serotonin 1a receptor and associated G-protein activation in schizophrenia and bipolar disorder*. Psychiatry Res, 2006. **143**(2-3): p. 111-20.
584. Lowther, S., et al., *5-HT_{1A} receptor binding sites in post-mortem brain samples from depressed suicides and controls*. J Affect Disord, 1997. **42**(2-3): p. 199-207.
585. Drevets, W.C., et al., *PET imaging of serotonin 1A receptor binding in depression*. Biol Psychiatry, 1999. **46**(10): p. 1375-87.
586. Drevets, W.C., et al., *Serotonin type-1A receptor imaging in depression*. Nucl Med Biol, 2000. **27**(5): p. 499-507.

587. Sargent, P.A., et al., *Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment.* Arch Gen Psychiatry, 2000. **57**(2): p. 174-80.
588. Hirvonen, J., et al., *Decreased brain serotonin 5-HT_{1A} receptor availability in medication-naïve patients with major depressive disorder: an in-vivo imaging study using PET and [¹¹C]WAY-100635.* Int J Neuropsychopharmacol, 2008. **11**(4): p. 465-76.
589. Young, A.H., et al., *The effects of corticosterone on 5-HT receptor function in rodents.* Neuropharmacology, 1992. **31**(5): p. 433-8.
590. Laaris, N., et al., *Differential effects of stress on presynaptic and postsynaptic 5-hydroxytryptamine-1A receptors in the rat brain: an in vitro electrophysiological study.* Neuroscience, 1999. **91**(3): p. 947-58.
591. Lanfumey, L., et al., *5-HT_{1A} autoreceptor desensitization by chronic ultramild stress in mice.* Neuroreport, 1999. **10**(16): p. 3369-74.
592. McAllister-Williams, R.H., A.J. Anderson, and A.H. Young, *Corticosterone selectively attenuates 8-OH-DPAT-mediated hypothermia in mice.* Int J Neuropsychopharmacol, 2001. **4**(1): p. 1-8.
593. Fairchild, G., M.M. Leitch, and C.D. Ingram, *Acute and chronic effects of corticosterone on 5-HT_{1A} receptor-mediated autoinhibition in the rat dorsal raphe nucleus.* Neuropharmacology, 2003. **45**(7): p. 925-34.
594. Leitch, M.M., et al., *Flattening the corticosterone rhythm attenuates 5-HT_{1A} autoreceptor function in the rat: relevance for depression.* Neuropsychopharmacology, 2003. **28**(1): p. 119-25.
595. Hensler, J.G., T. Advani, and L.M. Monteggia, *Regulation of serotonin-1A receptor function in inducible brain-derived neurotrophic factor knockout mice after administration of corticosterone.* Biol Psychiatry, 2007. **62**(5): p. 521-9.
596. Chalmers, D.T., et al., *Regulation of hippocampal 5-HT_{1A} receptor gene expression by dexamethasone.* Neuropsychopharmacology, 1994. **10**(3): p. 215-22.

597. Karten, Y.J., et al., *Long-term exposure to high corticosterone levels attenuates serotonin responses in rat hippocampal CA1 neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(23): p. 13456-61.
598. van Riel, E., et al., *Effect of early life stress on serotonin responses in the hippocampus of young adult rats*. Synapse, 2004. **53**(1): p. 11-9.
599. Flugge, G., *Dynamics of central nervous 5-HT_{1A}-receptors under psychosocial stress*. J Neurosci, 1995. **15**(11): p. 7132-40.
600. Flugge, G., et al., *5HT_{1A}-receptors and behaviour under chronic stress: selective counteraction by testosterone*. Eur J Neurosci, 1998. **10**(8): p. 2685-93.
601. Young, A.H., et al., *Effects of hydrocortisone on brain 5-HT function and sleep*. J Affect Disord, 1994. **32**(2): p. 139-46.
602. McAllister-Williams, R.H., A.E. Massey, and G. Fairchild, *Repeated cortisol administration attenuates the EEG response to buspirone in healthy volunteers: evidence for desensitization of the 5-HT_{1A} autoreceptor*. J Psychopharmacol, 2007. **21**(8): p. 826-32.
603. Zhou, R., et al., *The anti-apoptotic, glucocorticoid receptor cochaperone protein BAG-1 is a long-term target for the actions of mood stabilizers*. J Neurosci, 2005. **25**(18): p. 4493-502.
604. Moore, G.J., et al., *Lithium-induced increase in human brain grey matter*. Lancet, 2000. **356**(9237): p. 1241-2.
605. Manji, H.K., G.J. Moore, and G. Chen, *Clinical and preclinical evidence for the neurotrophic effects of mood stabilizers: implications for the pathophysiology and treatment of manic-depressive illness*. Biol Psychiatry, 2000. **48**(8): p. 740-54.
606. McEwen, B.S. and J.P. Olie, *Neurobiology of mood, anxiety, and emotions as revealed by studies of a unique antidepressant: tianeptine*. Mol Psychiatry, 2005. **10**(6): p. 525-37.
607. Duman, R.S. and L.M. Monteggia, *A neurotrophic model for stress-related mood disorders*. Biol Psychiatry, 2006. **59**(12): p. 1116-27.

608. Malberg, J.E. and R.S. Duman, *Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment*. Neuropsychopharmacology, 2003. **28**(9): p. 1562-71.
609. Malberg, J.E., et al., *Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus*. J Neurosci, 2000. **20**(24): p. 9104-10.
610. Fricker, A.D., et al., *Serotonin receptor activation leads to neurite outgrowth and neuronal survival*. Brain Res Mol Brain Res, 2005. **138**(2): p. 228-35.
611. Santarelli, L., et al., *Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants*. Science, 2003. **301**(5634): p. 805-9.
612. Huang, G.J. and J. Herbert, *The role of 5-HT_{1A} receptors in the proliferation and survival of progenitor cells in the dentate gyrus of the adult hippocampus and their regulation by corticoids*. Neuroscience, 2005. **135**(3): p. 803-13.
613. Radley, J.J. and B.L. Jacobs, *5-HT_{1A} receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus*. Brain Res, 2002. **955**(1-2): p. 264-7.
614. Nakata, N., et al., *Role of hippocampal serotonergic neurons in ischemic neuronal death*. Behav Brain Res, 1997. **83**(1-2): p. 217-20.
615. Harkany, T., et al., *Oral post-lesion administration of 5-HT_{1A} receptor agonist repinotan hydrochloride (BAY x 3702) attenuates NMDA-induced delayed neuronal death in rat magnocellular nucleus basalis*. Neuroscience, 2001. **108**(4): p. 629-42.
616. Gandolfi, O., et al., *The activation of serotonin receptors prevents glutamate-induced neurotoxicity and NMDA-stimulated cGMP accumulation in primary cortical cell cultures*. Pharmacol Res, 2002. **46**(5): p. 409-14.
617. Madhavan, L., et al., *5-hydroxytryptamine 1A receptor activation protects against N-methyl-D-aspartate-induced apoptotic cell death in striatal and mesencephalic cultures*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **304**(3): p. 913-23.
618. Stahl, S., *5HT_{1A} receptors and pharmacotherapy. Is serotonin receptor down-regulation linked to the mechanism of action of antidepressant drugs?* Psychopharmacol Bull, 1994. **30**(1): p. 39-43.

619. Riad, M., et al., *Acute treatment with the antidepressant fluoxetine internalizes 5-HT_{1A} autoreceptors and reduces the in vivo binding of the PET radioligand [^{18F}]MPPF in the nucleus raphe dorsalis of rat.* J Neurosci, 2004. **24**(23): p. 5420-6.
620. Rausch, J.L., et al., *Temperature regulation in depression: functional 5HT_{1A} receptor adaptation differentiates antidepressant response.* Neuropsychopharmacology, 2006. **31**(10): p. 2274-80.
621. Pineyro, G. and P. Blier, *Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action.* Pharmacol Rev, 1999. **51**(3): p. 533-91.
622. Lerer, B., et al., *5-HT_{1A} receptor function in normal subjects on clinical doses of fluoxetine: blunted temperature and hormone responses to ipsapirone challenge.* Neuropsychopharmacology, 1999. **20**(6): p. 628-39.
623. Kreiss, D.S. and I. Lucki, *Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured in vivo.* J Pharmacol Exp Ther, 1995. **274**(2): p. 866-76.
624. Invernizzi, R., M. Bramante, and R. Samanin, *Chronic treatment with citalopram facilitates the effect of a challenge dose on cortical serotonin output: role of presynaptic 5-HT_{1A} receptors.* Eur J Pharmacol, 1994. **260**(2-3): p. 243-6.
625. Giovacchini, G., et al., *Differential effects of paroxetine on raphe and cortical 5-HT_{1A} binding: a PET study in monkeys.* Neuroimage, 2005. **28**(1): p. 238-48.
626. Sussman, N., *Anxiolytic antidepressant augmentation.* J Clin Psychiatry, 1998. **59 Suppl 5**: p. 42-8; discussion 49-50.
627. Lucki, I., *Behavioral studies of serotonin receptor agonists as antidepressant drugs.* J Clin Psychiatry, 1991. **52 Suppl**: p. 24-31.
628. Detke, M.J., S. Wieland, and I. Lucki, *Blockade of the antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT, buspirone and desipramine in the rat forced swim test by 5HT_{1A} receptor antagonists.* Psychopharmacology (Berl), 1995. **119**(1): p. 47-54.
629. Assie, M.B., et al., *F15599, a highly selective post-synaptic 5-HT_{1A} receptor agonist: in vivo profile in behavioural models of antidepressant and serotonergic activity.* Int J Neuropsychopharmacol, 2010: p. 1-14.

630. Rabiner, E.A., et al., *beta-blocker binding to human 5-HT_{1A} receptors in vivo and in vitro: implications for antidepressant therapy*. *Neuropsychopharmacology*, 2000. **23**(3): p. 285-93.
631. Martinez, D., et al., *Differential occupancy of somatodendritic and postsynaptic 5HT_{1A} receptors by pindolol: a dose-occupancy study with [¹¹C]WAY 100635 and positron emission tomography in humans*. *Neuropsychopharmacology*, 2001. **24**(3): p. 209-29.
632. Artigas, F., et al., *How does pindolol improve antidepressant action?* *Trends Pharmacol Sci*, 2001. **22**(5): p. 224-8.
633. Berney, A., et al., *An index of 5-HT synthesis changes during early antidepressant treatment: alpha-[¹¹C]methyl-L-tryptophan PET study*. *Neurochem Int*, 2008. **52**(4-5): p. 701-8.
634. Hjorth, S., et al., *Serotonin autoreceptor function and antidepressant drug action*. *J Psychopharmacol*, 2000. **14**(2): p. 177-85.
635. Zanardi, R., et al., *How long should pindolol be associated with paroxetine to improve the antidepressant response?* *J Clin Psychopharmacol*, 1997. **17**(6): p. 446-50.
636. Zanardi, R., et al., *Faster onset of action of fluvoxamine in combination with pindolol in the treatment of delusional depression: a controlled study*. *J Clin Psychopharmacol*, 1998. **18**(6): p. 441-6.
637. Zanardi, R., et al., *Factors affecting fluvoxamine antidepressant activity: influence of pindolol and 5-HTTLPR in delusional and nondelusional depression*. *Biol Psychiatry*, 2001. **50**(5): p. 323-30.
638. Blier, P., R. Bergeron, and C. de Montigny, *Selective activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors induces rapid antidepressant response*. *Neuropsychopharmacology*, 1997. **16**(5): p. 333-8.
639. Rossi, D.V., et al., *Chronic administration of venlafaxine fails to attenuate 5-HT_{1A} receptor function at the level of receptor-G protein interaction*. *Int J Neuropsychopharmacol*, 2006. **9**(4): p. 393-406.

640. Gravel, P. and C. de Montigny, *Noradrenergic denervation prevents sensitization of rat forebrain neurons to serotonin by tricyclic antidepressant treatment*. Synapse, 1987. **1**(3): p. 233-9.
641. Hayakawa, H., et al., *Increase in serotonin 1A receptors in the dentate gyrus as revealed by autoradiographic analysis following repeated electroconvulsive shock but not imipramine treatment*. Neuropsychobiology, 1994. **30**(2-3): p. 53-6.
642. Ishihara, K., et al., *Enhancement of serotonin(1A) receptor function following repeated electroconvulsive shock in young rat hippocampal neurons in vitro*. Int J Neuropsychopharmacol, 1999. **2**(2): p. 101-104.
643. Szabo, S.T. and P. Blier, *Effects of the selective norepinephrine reuptake inhibitor reboxetine on norepinephrine and serotonin transmission in the rat hippocampus*. Neuropsychopharmacology, 2001. **25**(6): p. 845-57.
644. Melzack, R. and P.D. Wall, *Pain mechanisms: a new theory*. Science, 1965. **150**(699): p. 971-9.
645. Millan, M.J., *Descending control of pain*. Prog Neurobiol, 2002. **66**(6): p. 355-474.
646. Casey, K.L., *Forebrain mechanisms of nociception and pain: analysis through imaging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(14): p. 7668-74.
647. Mackey, S.C. and F. Maeda, *Functional imaging and the neural systems of chronic pain*. Neurosurg Clin N Am, 2004. **15**(3): p. 269-88.
648. Apkarian, A.V., et al., *Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease*. Eur J Pain, 2005. **9**(4): p. 463-84.
649. Tracey, I. and P.W. Mantyh, *The cerebral signature for pain perception and its modulation*. Neuron, 2007. **55**(3): p. 377-91.
650. Neugebauer, V., et al., *The amygdala and persistent pain*. Neuroscientist, 2004. **10**(3): p. 221-34.
651. Price, D.D., *Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain*. Science, 2000. **288**(5472): p. 1769-72.
652. Gundel, H., et al., *Altered cerebral response to noxious heat stimulation in patients with somatoform pain disorder*. Pain, 2008. **137**(2): p. 413-21.

653. Jones, A.K. and S.W. Derbyshire, *Reduced cortical responses to noxious heat in patients with rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 1997. **56**(10): p. 601-7.
654. Derbyshire, S.W., et al., *Pain processing during three levels of noxious stimulation produces differential patterns of central activity*. Pain, 1997. **73**(3): p. 431-45.
655. Lorenz, J. and K.L. Casey, *Imaging of acute versus pathological pain in humans*. Eur J Pain, 2005. **9**(2): p. 163-5.
656. Zhang, R., et al., *Response durations encode nociceptive stimulus intensity in the rat medial prefrontal cortex*. Neuroscience, 2004. **125**(3): p. 777-85.
657. Apkarian, A.V., et al., *Chronic back pain is associated with decreased prefrontal and thalamic gray matter density*. J Neurosci, 2004. **24**(46): p. 10410-5.
658. Rhudy, J.L. and M.W. Meagher, *Noise stress and human pain thresholds: divergent effects in men and women*. J Pain, 2001. **2**(1): p. 57-64.
659. Seminowicz, D.A. and K.D. Davis, *A re-examination of pain-cognition interactions: implications for neuroimaging*. Pain, 2007. **130**(1-2): p. 8-13.
660. Baliki, M.N., et al., *Beyond feeling: chronic pain hurts the brain, disrupting the default-mode network dynamics*. J Neurosci, 2008. **28**(6): p. 1398-403.
661. Neugebauer, V., et al., *Forebrain pain mechanisms*. Brain Res Rev, 2009. **60**(1): p. 226-42.
662. Apkarian, A.V., et al., *Chronic pain patients are impaired on an emotional decision-making task*. Pain, 2004. **108**(1-2): p. 129-36.
663. deCharms, R.C., et al., *Control over brain activation and pain learned by using real-time functional MRI*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(51): p. 18626-31.
664. Seminowicz, D.A. and K.D. Davis, *Interactions of pain intensity and cognitive load: the brain stays on task*. Cereb Cortex, 2007. **17**(6): p. 1412-22.
665. Rhudy, J.L., et al., *Emotional control of nociceptive reactions (ECON): do affective valence and arousal play a role?* Pain, 2008. **136**(3): p. 250-61.

666. Hotopf, M., et al., *Temporal relationships between physical symptoms and psychiatric disorder. Results from a national birth cohort.* Br J Psychiatry, 1998. **173**: p. 255-61.
667. Lepine, J.P. and M. Briley, *The epidemiology of pain in depression.* Hum Psychopharmacol, 2004. **19 Suppl 1**: p. S3-7.
668. Gureje, O., et al., *The relation between multiple pains and mental disorders: results from the World Mental Health Surveys.* Pain, 2008. **135**(1-2): p. 82-91.
669. Moldin, S.O., et al., *Association between major depressive disorder and physical illness.* Psychol Med, 1993. **23**(3): p. 755-61.
670. Ohayon, M.M. and A.F. Schatzberg, *Using chronic pain to predict depressive morbidity in the general population.* Arch Gen Psychiatry, 2003. **60**(1): p. 39-47.
671. Beitz, A.J., *The nuclei of origin of brainstem serotonergic projections to the rodent spinal trigeminal nucleus.* Neurosci Lett, 1982. **32**(3): p. 223-8.
672. Kazakov, V.N., et al., *Sources of cortical, hypothalamic and spinal serotonergic projections: topical organization within the nucleus raphe dorsalis.* Neuroscience, 1993. **56**(1): p. 157-64.
673. Wang, Q.P. and Y. Nakai, *The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation.* Brain Res Bull, 1994. **34**(6): p. 575-85.
674. Li, Y.Q., et al., *Identification of periaqueductal gray and dorsal raphe nucleus neurons projecting to both the trigeminal sensory complex and forebrain structures: a fluorescent retrograde double-labeling study in the rat.* Brain Res, 1993. **623**(2): p. 267-77.
675. Bowker, R.M., et al., *Descending serotonergic, peptidergic and cholinergic pathways from the raphe nuclei: a multiple transmitter complex.* Brain Res, 1983. **288**(1-2): p. 33-48.
676. Bullitt, E. and A.R. Light, *Intraspinal course of descending serotonergic pathways innervating the rodent dorsal horn and lamina X.* J Comp Neurol, 1989. **286**(2): p. 231-42.

677. Jones, S.L. and A.R. Light, *Serotonergic medullary raphespinal projection to the lumbar spinal cord in the rat: a retrograde immunohistochemical study*. J Comp Neurol, 1992. **322**(4): p. 599-610.
678. Ruda, M.A., G.J. Bennett, and R. Dubner, *Neurochemistry and neural circuitry in the dorsal horn*. Prog Brain Res, 1986. **66**: p. 219-68.
679. Ruda, M.A., *Spinal dorsal horn circuitry involved in the brain stem control of nociception*. Prog Brain Res, 1988. **77**: p. 129-40.
680. Yaksh, T.L., R.L. Plant, and T.A. Rudy, *Studies on the antagonism by raphe lesions of the antinociceptive action of systemic morphine*. Eur J Pharmacol, 1977. **41**(4): p. 399-408.
681. Puig, S., J.P. Rivot, and J.M. Besson, *Effect of subcutaneous administration of the chemical algogen formalin, on 5-HT metabolism in the nucleus raphe magnus and the medullary dorsal horn: a voltammetric study in freely moving rats*. Brain Res, 1992. **590**(1-2): p. 250-4.
682. Taguchi, K. and Y. Suzuki, *The response of the 5-hydroxyindole oxidation current to noxious stimuli in the spinal cord of anesthetized rats: modification by morphine*. Brain Res, 1992. **583**(1-2): p. 150-4.
683. Men, D.S. and Y. Matsui, *Peripheral nerve stimulation increases serotonin and dopamine metabolites in rat spinal cord*. Brain Res Bull, 1994. **33**(6): p. 625-32.
684. Gao, K. and P. Mason, *Serotonergic Raphe magnus cells that respond to noxious tail heat are not ON or OFF cells*. J Neurophysiol, 2000. **84**(4): p. 1719-25.
685. Garraway, S.M. and S. Hochman, *Modulatory actions of serotonin, norepinephrine, dopamine, and acetylcholine in spinal cord deep dorsal horn neurons*. J Neurophysiol, 2001. **86**(5): p. 2183-94.
686. Garraway, S.M. and S. Hochman, *Serotonin increases the incidence of primary afferent-evoked long-term depression in rat deep dorsal horn neurons*. J Neurophysiol, 2001. **85**(5): p. 1864-72.
687. Garraway, S.M. and S. Hochman, *Pharmacological characterization of serotonin receptor subtypes modulating primary afferent input to deep dorsal horn neurons in the neonatal rat*. Br J Pharmacol, 2001. **132**(8): p. 1789-98.

688. Jordan, L.M., et al., *Two populations of spinothalamic tract neurons with opposite responses to 5-hydroxytryptamine*. Brain Res, 1979. **164**: p. 342-6.
689. Giordano, J. and L. Rogers, *Putative mechanisms of buspirone-induced antinociception in the rat*. Pain, 1992. **50**(3): p. 365-72.
690. Robles, L.I., et al., *Effects of K⁺ channel blockers and openers on antinociception induced by agonists of 5-HT_{1A} receptors*. Eur J Pharmacol, 1996. **295**(2-3): p. 181-8.
691. Bardin, L., et al., *In the formalin model of tonic nociceptive pain, 8-OH-DPAT produces 5-HT_{1A} receptor-mediated, behaviorally specific analgesia*. Eur J Pharmacol, 2001. **421**(2): p. 109-14.
692. Colpaert, F.C., *5-HT_{1A} receptor activation: new molecular and neuroadaptive mechanisms of pain relief*. Curr Opin Investig Drugs, 2006. **7**(1): p. 40-7.
693. Cervo, L., et al., *Role of 5-HT_{1A} receptors in the antinociceptive action of 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin in the rat*. Eur J Pharmacol, 1994. **263**(1-2): p. 187-91.
694. Newman-Tancredi, A., et al., *Agonist activity of antimigraine drugs at recombinant human 5-HT_{1A} receptors: potential implications for prophylactic and acute therapy*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1997. **355**(6): p. 682-8.
695. Bardin, L., et al., *Effect of intrathecal administration of serotonin in chronic pain models in rats*. Eur J Pharmacol, 2000. **409**(1): p. 37-43.
696. Martikainen, I.K., et al., *Correlation of human cold pressor pain responses with 5-HT_{1A} receptor binding in the brain*. Brain Res, 2007. **1172**: p. 21-31.
697. Jann, M.W. and J.H. Slade, *Antidepressant agents for the treatment of chronic pain and depression*. Pharmacotherapy, 2007. **27**(11): p. 1571-87.
698. Berrocoso, E. and J.A. Mico, *Role of serotonin 5-HT_{1A} receptors in the antidepressant-like effect and the antinociceptive effect of venlafaxine in mice*. Int J Neuropsychopharmacol, 2009. **12**(1): p. 61-71.
699. Stahl, S. and M. Briley, *Understanding pain in depression*. Hum Psychopharmacol, 2004. **19** Suppl 1: p. S9-S13.
700. Colpaert, F.C., *System theory of pain and of opiate analgesia: no tolerance to opiates*. Pharmacol Rev, 1996. **48**(3): p. 355-402.

701. Colpaert, F.C. and Y. Fregnac, *Paradoxical signal transduction in neurobiological systems*. Mol Neurobiol, 2001. **24**(1-3): p. 145-68.
702. Dray, A. and H. Rang, *The how and why of chronic pain states and the what of new analgesia therapies*. Trends Neurosci, 1998. **21**(8): p. 315-7.
703. Lanfumey, L. and M. Hamon, *5-HT₁ receptors*. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2004. **3**(1): p. 1-10.
704. Hensler, J.G., *Regulation of 5-HT_{1A} receptor function in brain following agonist or antidepressant administration*. Life Sci, 2003. **72**(15): p. 1665-82.
705. Aghajanian, G.K., *Feedback regulation of central monoaminergic neurons: evidence from single cell recording studies*. Essays Neurochem Neuropharmacol, 1978. **3**: p. 1-32.
706. Fuller, J.H. and J.D. Schlag, *Determination of antidromic excitation by the collision test: problems of interpretation*. Brain Res, 1976. **112**(2): p. 283-98.
707. Hajos, M., et al., *Neurochemical identification of stereotypic burst-firing neurons in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods*. Eur J Neurosci, 2007. **25**(1): p. 119-26.
708. Tierney, P.L., et al., *Influence of the hippocampus on interneurons of the rat prefrontal cortex*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(2): p. 514-24.
709. Tepper, J.M., L.P. Martin, and D.R. Anderson, *GABAA receptor-mediated inhibition of rat substantia nigra dopaminergic neurons by pars reticulata projection neurons*. J Neurosci, 1995. **15**(4): p. 3092-103.
710. Steward, O., R. Tomasulo, and W.B. Levy, *Blockade of inhibition in a pathway with dual excitatory and inhibitory action unmasks a capability for LTP that is otherwise not expressed*. Brain Res, 1990. **516**(2): p. 292-300.
711. Cortes, R., et al., *p-chlorophenylalanine increases tryptophan-5-hydroxylase mRNA levels in the rat dorsal raphe: a time course study using in situ hybridization*. J Neurochem, 1993. **60**(2): p. 761-4.
712. Reader, T.A., *Catecholamines and serotonin in rat frontal cortex after PCPA and 6-OHDA: absolute amounts and ratios*. Brain Res Bull, 1982. **8**(5): p. 527-34.

713. Adell, A. and F. Artigas, *A microdialysis study of the in vivo release of 5-HT in the median raphe nucleus of the rat*. Br J Pharmacol, 1998. **125**(6): p. 1361-7.
714. Kalen, P., et al., *Endogenous release of neuronal serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid in the caudate-putamen of the rat as revealed by intracerebral dialysis coupled to high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection*. J Neurochem, 1988. **51**(5): p. 1422-35.
715. Jackson, D. and E.D. Abercrombie, *In vivo neurochemical evaluation of striatal serotonergic hyperinnervation in rats depleted of dopamine at infancy*. J Neurochem, 1992. **58**(3): p. 890-7.
716. Romero, L., et al., *Basal and stimulated extracellular serotonin concentration in the brain of rats with altered serotonin uptake*. Synapse, 1998. **28**(4): p. 313-21.
717. Cox, R.F., E. Meller, and B.L. Waszczak, *Electrophysiological evidence for a large receptor reserve for inhibition of dorsal raphe neuronal firing by 5-HT_{1A} agonists*. Synapse, 1993. **14**(4): p. 297-304.
718. Meller, E., M. Goldstein, and K. Bohmaker, *Receptor reserve for 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated inhibition of serotonin synthesis: possible relationship to anxiolytic properties of 5-hydroxytryptamine_{1A} agonists*. Mol Pharmacol, 1990. **37**(2): p. 231-7.
719. Ghanbari, R., et al., *Electrophysiological characterization of the effects of asenapine at 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, alpha(2)-adrenergic and D(2) receptors in the rat brain*. Eur Neuropsychopharmacol, 2009. **19**(3): p. 177-87.
720. Dong, J., C. de Montigny, and P. Blier, *Full agonistic properties of BAY x 3702 on presynaptic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors electrophysiological studies in the rat hippocampus and dorsal raphe*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **286**(3): p. 1239-47.
721. Lauckner, J.E., B. Hille, and K. Mackie, *The cannabinoid agonist WIN_{55,212-2} increases intracellular calcium via CB₁ receptor coupling to Gq/11 G proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(52): p. 19144-9.
722. Berg, K.A., et al., *Effector pathway-dependent relative efficacy at serotonin type 2A and 2C receptors: evidence for agonist-directed trafficking of receptor stimulus*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(1): p. 94-104.

723. Sato, M., et al., *Ligand-directed signaling at the beta₃-adrenoceptor produced by 3-(2-Ethylphenoxy)-1-[(1*S*)-1,2,3,4-tetrahydronaph-1-ylamino]-2*S*-2-propanol oxalate (SR59230A) relative to receptor agonists*. *Mol Pharmacol*, 2007. **72**(5): p. 1359-68.
724. Gilchrist, A., *Modulating G-protein-coupled receptors: from traditional pharmacology to allosterics*. *Trends Pharmacol Sci*, 2007. **28**(8): p. 431-7.
725. Urban, J.D., et al., *Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. **320**(1): p. 1-13.
726. Kenakin, T., *Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals*. *Trends Pharmacol Sci*, 1995. **16**(7): p. 232-8.
727. Granier, S., et al., *Structure and conformational changes in the C-terminal domain of the beta₂-adrenoceptor: insights from fluorescence resonance energy transfer studies*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(18): p. 13895-905.
728. Kobilka, B.K. and X. Deupi, *Conformational complexity of G-protein-coupled receptors*. *Trends Pharmacol Sci*, 2007. **28**(8): p. 397-406.
729. Blin, N., et al., *Structural and conformational features determining selective signal transduction in the beta₃-adrenergic receptor*. *Mol Pharmacol*, 1993. **44**(6): p. 1094-104.
730. Rochais, F., et al., *Real-time optical recording of beta₁-adrenergic receptor activation reveals supersensitivity of the Arg389 variant to carvedilol*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 229-35.
731. Gonzalez-Maeso, J. and S.C. Sealfon, *Agonist-trafficking and hallucinogens*. *Curr Med Chem*, 2009. **16**(8): p. 1017-27.
732. Newman-Tancredi, A., et al., *Signal transduction and functional selectivity of F15599, a preferential post-synaptic 5-HT_{1A} receptor agonist*. *Br J Pharmacol*, 2009. **156**(2): p. 338-53.
733. Buritova, J., et al., *Region-specific changes in 5-HT_{1A} agonist-induced Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2 phosphorylation in rat brain: a quantitative ELISA study*. *Neuropharmacology*, 2009. **56**(2): p. 350-61.

734. Hajos, M., et al., *In vivo inhibition of neuronal activity in the rat ventromedial prefrontal cortex by midbrain-raphé nuclei: role of 5-HT_{1A} receptors*. *Neuropharmacology*, 2003. **45**(1): p. 72-81.
735. Puig, M.V., F. Artigas, and P. Celada, *Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA*. *Cereb Cortex*, 2005. **15**(1): p. 1-14.
736. Heusler, P., et al., *Differential ion current activation by human 5-HT_{1A} receptors in *Xenopus* oocytes: evidence for agonist-directed trafficking of receptor signalling*. *Neuropharmacology*, 2005. **49**(7): p. 963-76.
737. Rueter, L.E. and P. Blier, *Electrophysiological examination of the effects of sustained flibanserin administration on serotonin receptors in rat brain*. *Br J Pharmacol*, 1999. **126**(3): p. 627-38.
738. Wedzony, K., et al., *Glutamatergic neurons of rat medial prefrontal cortex innervating the ventral tegmental area are positive for serotonin 5-HT_{1A} receptor protein*. *J Physiol Pharmacol*, 2007. **58**(4): p. 611-24.
739. Diaz-Mataix, L., F. Artigas, and P. Celada, *Activation of pyramidal cells in rat medial prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area by a 5-HT_{1A} receptor agonist*. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2006. **16**(4): p. 288-96.
740. Borsini, F., et al., *BIMT 17, a 5-HT_{1A} receptor agonist/5-HT_{2A} receptor antagonist, directly activates postsynaptic 5-HT inhibitory responses in the rat cerebral cortex*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1995. **352**(3): p. 283-90.
741. Hajos, M., E. Hajos-Korcsok, and T. Sharp, *Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT_{1A} receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat*. *Br J Pharmacol*, 1999. **126**(8): p. 1741-50.
742. Tada, K., et al., *Anxiolytic 5-hydroxytryptamine_{1A} agonists suppress firing activity of dorsal hippocampus CA₁ pyramidal neurons through a postsynaptic mechanism: single-unit study in unanesthetized, unrestrained rats*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. **288**(2): p. 843-8.
743. Hestrin, S. and M. Galarreta, *Electrical synapses define networks of neocortical GABAergic neurons*. *Trends Neurosci*, 2005. **28**(6): p. 304-9.

744. Cobb, S.R., et al., *Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons*. Nature, 1995. **378**(6552): p. 75-8.
745. Kruglikov, I. and B. Rudy, *Perisomatic GABA release and thalamocortical integration onto neocortical excitatory cells are regulated by neuromodulators*. Neuron, 2008. **58**(6): p. 911-24.
746. Hoyer, D. and H.W. Boddeke, *Partial agonists, full agonists, antagonists: dilemmas of definition*. Trends Pharmacol Sci, 1993. **14**(7): p. 270-5.
747. Homayoun, H. and B. Moghaddam, *NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons*. J Neurosci, 2007. **27**(43): p. 11496-500.
748. Chergui, K., M.F. Suaud-Chagny, and F. Gonon, *Nonlinear relationship between impulse flow, dopamine release and dopamine elimination in the rat brain in vivo*. Neuroscience, 1994. **62**(3): p. 641-5.
749. Sakaue, M., et al., *Postsynaptic 5-hydroxytryptamine(1A) receptor activation increases in vivo dopamine release in rat prefrontal cortex*. Br J Pharmacol, 2000. **129**(5): p. 1028-34.
750. Gessa, G.L., et al., *Dissociation of haloperidol, clozapine, and olanzapine effects on electrical activity of mesocortical dopamine neurons and dopamine release in the prefrontal cortex*. Neuropsychopharmacology, 2000. **22**(6): p. 642-9.
751. Kuroki, T., H.Y. Meltzer, and J. Ichikawa, *Effects of antipsychotic drugs on extracellular dopamine levels in rat medial prefrontal cortex and nucleus accumbens*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **288**(2): p. 774-81.
752. Rollema, H., et al., *5-HT(1A) receptor activation contributes to ziprasidone-induced dopamine release in the rat prefrontal cortex*. Biol Psychiatry, 2000. **48**(3): p. 229-37.
753. Bortolozzi, A., et al., *Dopamine release induced by atypical antipsychotics in prefrontal cortex requires 5-HT1A receptors but not 5-HT2A receptors*. Int J Neuropsychopharmacol, 2010: p. 1-16.
754. Meltzer, H.Y. and M. Huang, *In vivo actions of atypical antipsychotic drug on serotonergic and dopaminergic systems*. Prog Brain Res, 2008. **172**: p. 177-97.

755. Akil, M., et al., *Lamina-specific alterations in the dopamine innervation of the prefrontal cortex in schizophrenic subjects*. Am J Psychiatry, 1999. **156**(10): p. 1580-9.
756. Castner, S.A. and G.V. Williams, *Tuning the engine of cognition: a focus on NMDA/D₁ receptor interactions in prefrontal cortex*. Brain Cogn, 2007. **63**(2): p. 94-122.
757. Abi-Dargham, A., *Probing cortical dopamine function in schizophrenia: what can D₁ receptors tell us?* World Psychiatry, 2003. **2**(3): p. 166-71.
758. Elsworth, J.D., et al., *Clozapine normalizes prefrontal cortex dopamine transmission in monkeys subchronically exposed to phencyclidine*. Neuropsychopharmacology, 2008. **33**(3): p. 491-6.
759. Auclair, A.B., L.; Depoortère, R.; Newman-Tancredi, A., *F15599, a 5-HT_{1A} agonist that preferentially targets post-synaptic receptors in the frontal cortex. III) activity in rodent models of cognition*, in *Society for Neuroscience*. 2007: San Diego, CA.
760. Lewis, D.A. and R.A. Sweet, *Schizophrenia from a neural circuitry perspective: advancing toward rational pharmacological therapies*. J Clin Invest, 2009. **119**(4): p. 706-16.
761. Bitanirwe, B.K., et al., *Glutamatergic deficits and parvalbumin-containing inhibitory neurons in the prefrontal cortex in schizophrenia*. BMC Psychiatry, 2009. **9**: p. 71.
762. Jones, E.G., *Cortical development and thalamic pathology in schizophrenia*. Schizophr Bull, 1997. **23**(3): p. 483-501.
763. Hashimoto, T., et al., *Alterations in GABA-related transcriptome in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia*. Mol Psychiatry, 2008. **13**(2): p. 147-61.
764. Gonzalez-Burgos, G. and D.A. Lewis, *GABA neurons and the mechanisms of network oscillations: implications for understanding cortical dysfunction in schizophrenia*. Schizophr Bull, 2008. **34**(5): p. 944-61.
765. Woo, T.U., et al., *A subclass of prefrontal gamma-aminobutyric acid axon terminals are selectively altered in schizophrenia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(9): p. 5341-6.

766. Hashimoto, T., et al., *Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia*. *J Neurosci*, 2003. **23**(15): p. 6315-26.
767. Vreugdenhil, M., et al., *Parvalbumin-deficiency facilitates repetitive IPSCs and gamma oscillations in the hippocampus*. *J Neurophysiol*, 2003. **89**(3): p. 1414-22.
768. Richardson-Jones, J.W., et al., *5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants*. *Neuron*, 2010. **65**(1): p. 40-52.
769. Lopez-Gil, X., et al., *Selective in vivo knockdown of mouse presynaptic 5-HT_{1A} receptors using RNA interference*, in *Society for Neuroscience, online*. 2009; Chicago.
770. Perez, V., et al., *Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of pindolol in combination with fluoxetine antidepressant treatment*. *Lancet*, 1997. **349**(9065): p. 1594-7.
771. Rabiner, E.A., et al., *5-Hydroxytryptamine_{1A} receptor occupancy by novel full antagonist 2-[4-[4-(7-chloro-2,3-dihydro-1,4-benzodioxyn-5-yl)-1-piperazinyl]butyl]-1,2-benzisothiazol-3-(2H)-one-1,1-dioxide: a [¹¹C][O-methyl-3H]-N-(2-(4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl)-N-(2-pyridinyl)cyclohexanecarboxamide trihydrochloride (WAY-100635) positron emission tomography study in humans*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002. **301**(3): p. 1144-1150.
772. Lemoine, L., et al., *[¹⁸F]F15599, a novel 5-HT_{1A} receptor agonist, as a radioligand for PET neuroimaging*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2010. **37**(3): p. 594-605.
773. Casey, K.L., et al., *Comparison of human cerebral activation pattern during cutaneous warmth, heat pain, and deep cold pain*. *J Neurophysiol*, 1996. **76**(1): p. 571-81.
774. Nielsen, K.J., N.K. Logothetis, and G. Rainer, *Dissociation between local field potentials and spiking activity in macaque inferior temporal cortex reveals diagnosticity-based encoding of complex objects*. *J Neurosci*, 2006. **26**(38): p. 9639-45.
775. Monosov, I.E., J.C. Trageser, and K.G. Thompson, *Measurements of simultaneously recorded spiking activity and local field potentials suggest that spatial selection emerges in the frontal eye field*. *Neuron*, 2008. **57**(4): p. 614-25.

776. Celada, P., et al., *The hallucinogen DOI reduces low-frequency oscillations in rat prefrontal cortex: reversal by antipsychotic drugs*. Biol Psychiatry, 2008. **64**(5): p. 392-400.
777. Friston, K.J., *Schizophrenia and the disconnection hypothesis*. Acta Psychiatr Scand Suppl, 1999. **395**: p. 68-79.
778. Middlemiss, D.N. and P.H. Hutson, *The 5-HT_{1B} receptors*. Ann N Y Acad Sci, 1990. **600**: p. 132-47; discussion 347-48.
779. Voigt, M.M., et al., *Molecular cloning and characterization of a rat brain cDNA encoding a 5-hydroxytryptamine_{1B} receptor*. EMBO J, 1991. **10**(13): p. 4017-23.
780. Bruinvels, A.T., et al., *Localization of 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D} alpha, 5-HT_{1E} and 5-HT_{1F} receptor messenger RNA in rodent and primate brain*. Neuropharmacology, 1994. **33**(3-4): p. 367-86.
781. Bruinvels, A.T., J.M. Palacios, and D. Hoyer, *Autoradiographic characterisation and localisation of 5-HT_{1D} compared to 5-HT_{1B} binding sites in rat brain*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1993. **347**(6): p. 569-82.
782. Amlaiky, N., et al., *Isolation of a mouse "5-HT_{1E}-like" serotonin receptor expressed predominantly in hippocampus*. J Biol Chem, 1992. **267**(28): p. 19761-4.
783. Adham, N., et al., *Cloning of another human serotonin receptor (5-HT_{1F}): a fifth 5-HT₁ receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(2): p. 408-12.
784. Johnson, K.W., et al., *5-HT_{1F} receptor agonists inhibit neurogenic dural inflammation in guinea pigs*. Neuroreport, 1997. **8**(9-10): p. 2237-40.
785. Phebus, L.A., et al., *Characterization of LY344864 as a pharmacological tool to study 5-HT_{1F} receptors: binding affinities, brain penetration and activity in the neurogenic dural inflammation model of migraine*. Life Sci, 1997. **61**(21): p. 2117-26.
786. Pazos, A., R. Cortes, and J.M. Palacios, *Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors*. Brain Res, 1985. **346**(2): p. 231-49.

787. Lopez-Gimenez, J.F., et al., *Selective visualization of rat brain 5-HT_{2A} receptors by autoradiography with [³H]MDL 100,907*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 1997. **356**(4): p. 446-54.
788. Mengod, G., et al., *Localization of the mRNA for the 5-HT₂ receptor by in situ hybridization histochemistry. Correlation with the distribution of receptor sites*. Brain Res, 1990. **524**(1): p. 139-43.
789. Kehne, J.H., et al., *Preclinical characterization of the potential of the putative atypical antipsychotic MDL 100,907 as a potent 5-HT_{2A} antagonist with a favorable CNS safety profile*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **277**(2): p. 968-81.
790. Glennon, R.A., *Do classical hallucinogens act as 5-HT₂ agonists or antagonists?* Neuropsychopharmacology, 1990. **3**(5-6): p. 509-17.
791. Leysen, J.E., et al., *Interaction of antipsychotic drugs with neurotransmitter receptor sites in vitro and in vivo in relation to pharmacological and clinical effects: role of 5HT₂ receptors*. Psychopharmacology (Berl), 1993. **112**(1 Suppl): p. S40-54.
792. Gudelsky, G.A., J.I. Koenig, and H.Y. Meltzer, *Thermoregulatory responses to serotonin (5-HT) receptor stimulation in the rat. Evidence for opposing roles of 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors*. Neuropharmacology, 1986. **25**(12): p. 1307-13.
793. Fuller, R.W., *Serotonin receptors involved in regulation of pituitary-adrenocortical function in rats*. Behav Brain Res, 1996. **73**(1-2): p. 215-9.
794. Duxon, M.S., et al., *Evidence for expression of the 5-hydroxytryptamine-2B receptor protein in the rat central nervous system*. Neuroscience, 1997. **76**(2): p. 323-9.
795. Choi, D.S., et al., *5-HT_{2B} receptor-mediated serotonin morphogenetic functions in mouse cranial neural crest and myocardial cells*. Development, 1997. **124**(9): p. 1745-55.
796. Kursar, J.D., et al., *Molecular cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the human 5-hydroxytryptamine_{2B} receptor*. Mol Pharmacol, 1994. **46**(2): p. 227-34.
797. Sanden, N., et al., *5-Hydroxytryptamine_{2B} receptors stimulate Ca²⁺ increases in cultured astrocytes from three different brain regions*. Neurochem Int, 2000. **36**(4-5): p. 427-34.

798. Kennett, G.A., et al., *Effects of the 5-HT_{2B} receptor agonist, BW 723C86, on three rat models of anxiety*. Br J Pharmacol, 1996. **117**(7): p. 1443-8.
799. Kennett, G.A., et al., *In vitro and in vivo profile of SB 206553, a potent 5-HT_{2C}/5-HT_{2B} receptor antagonist with anxiolytic-like properties*. Br J Pharmacol, 1996. **117**(3): p. 427-434.
800. Lopez-Gimenez, J.F., et al., *Regional distribution and cellular localization of 5-HT_{2C} receptor mRNA in monkey brain: comparison with [³H]mesulergine binding sites and choline acetyltransferase mRNA*. Synapse, 2001. **42**(1): p. 12-26.
801. Serrats, J., G. Mengod, and R. Cortes, *Expression of serotonin 5-HT_{2C} receptors in GABAergic cells of the anterior raphe nuclei*. J Chem Neuroanat, 2005. **29**(2): p. 83-91.
802. Roth, B.L., R.D. Ciaranello, and H.Y. Meltzer, *Binding of typical and atypical antipsychotic agents to transiently expressed 5-HT_{1C} receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 1992. **260**(3): p. 1361-5.
803. Canton, H., L. Verrielle, and F.C. Colpaert, *Binding of typical and atypical antipsychotics to 5-HT_{1C} and 5-HT₂ sites: clozapine potently interacts with 5-HT_{1C} sites*. Eur J Pharmacol, 1990. **191**(1): p. 93-6.
804. Wolf, W.A. and L.J. Schutz, *The serotonin 5-HT_{2C} receptor is a prominent serotonin receptor in basal ganglia: evidence from functional studies on serotonin-mediated phosphoinositide hydrolysis*. J Neurochem, 1997. **69**(4): p. 1449-58.
805. Tecott, L.H., et al., *Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors*. Nature, 1995. **374**(6522): p. 542-6.
806. Koek, W., A. Jackson, and F.C. Colpaert, *Behavioral pharmacology of antagonists at 5-HT₂/5-HT_{1C} receptors*. Neurosci Biobehav Rev, 1992. **16**(1): p. 95-105.
807. Thompson, A.J. and S.C. Lummis, *5-HT₃ receptors*. Curr Pharm Des, 2006. **12**(28): p. 3615-30.
808. Derkach, V., A. Surprenant, and R.A. North, *5-HT₃ receptors are membrane ion channels*. Nature, 1989. **339**(6227): p. 706-9.

809. Pratt, G.D., et al., *Consensus meeting agrees distribution of 5-HT₃ receptors in mammalian hindbrain*. Trends Pharmacol Sci, 1990. **11**(4): p. 135-7.
810. Steward, L.J., et al., *Labelling of 5-HT₃ receptor recognition sites in the rat brain using the agonist radioligand [³H]meta-chlorophenylbiguanide*. Eur J Pharmacol, 1993. **243**(1): p. 13-8.
811. Costall, B., et al., *Neuroanatomical sites of action of 5-HT₃ receptor agonist and antagonists for alteration of aversive behaviour in the mouse*. Br J Pharmacol, 1989. **96**(2): p. 325-32.
812. Aapro, M.S., et al., *A phase III, double-blind, randomized trial of palonosetron compared with ondansetron in preventing chemotherapy-induced nausea and vomiting following highly emetogenic chemotherapy*. Ann Oncol, 2006. **17**(9): p. 1441-9.
813. Barnes, J.M., N.M. Barnes, and S.J. Cooper, *Behavioural pharmacology of 5-HT₃ receptor ligands*. Neurosci Biobehav Rev, 1992. **16**(1): p. 107-13.
814. Johnson, B.A., et al., *Ondansetron reduces the craving of biologically predisposed alcoholics*. Psychopharmacology (Berl), 2002. **160**(4): p. 408-13.
815. Barnes, J.M., et al., *The effects of ondansetron, a 5-HT₃ receptor antagonist, on cognition in rodents and primates*. Pharmacol Biochem Behav, 1990. **35**(4): p. 955-62.
816. Corradetti, R., et al., *Serotonin blocks the long-term potentiation induced by primed burst stimulation in the CA₁ region of rat hippocampal slices*. Neuroscience, 1992. **46**(3): p. 511-8.
817. Nelson, D.L., *5-HT₅ receptors*. Curr Drug Targets CNS Neurol Disord, 2004. **3**(1): p. 53-8.
818. Waeber, C., et al., *Putative 5-HT₅ receptors: localization in the mouse CNS and lack of effect in the inhibition of dural protein extravasation*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **861**: p. 85-90.
819. Francken, B.J., et al., *Human 5-hydroxytryptamine(5A) receptors activate coexpressed G(i) and G(o) proteins in Spodoptera frugiperda 9 cells*. Mol Pharmacol, 2000. **57**(5): p. 1034-44.

820. Ruat, M., et al., *Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT₇) activating cAMP formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8547-51.
821. Neumaier, J.F., et al., *Localization of 5-HT₇ receptors in rat brain by immunocytochemistry, in situ hybridization, and agonist stimulated cFos expression*. J Chem Neuroanat, 2001. **21**(1): p. 63-73.
822. Shen, Y., et al., *Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine₇ serotonin receptor subtype*. J Biol Chem, 1993. **268**(24): p. 18200-4.
823. Stowe, R.L. and N.M. Barnes, *Selective labelling of 5-HT₇ receptor recognition sites in rat brain using [³H]5-carboxamidotryptamine*. Neuropharmacology, 1998. **37**(12): p. 1611-9.
824. Bacon, W.L. and S.G. Beck, *5-Hydroxytryptamine₇ receptor activation decreases slow afterhyperpolarization amplitude in CA₃ hippocampal pyramidal cells*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **294**(2): p. 672-9.
825. Kawahara, F., H. Saito, and H. Katsuki, *Inhibition by 5-HT₇ receptor stimulation of GABA_A receptor-activated current in cultured rat suprachiasmatic neurones*. J Physiol, 1994. **478** (Pt 1): p. 67-73.
826. Gustafson, E.L., et al., *A receptor autoradiographic and in situ hybridization analysis of the distribution of the 5-HT₇ receptor in rat brain*. Br J Pharmacol, 1996. **117**(4): p. 657-66.
827. Thomas, D.R., et al., *SB-656104-A, a novel selective 5-HT₇ receptor antagonist, modulates REM sleep in rats*. Br J Pharmacol, 2003. **139**(4): p. 705-14.
828. Roberts, C., et al., *The effect of SB-269970, a 5-HT₇ receptor antagonist, on 5-HT release from serotonergic terminals and cell bodies*. Br J Pharmacol, 2001. **132**(7): p. 1574-80.
829. East, S.Z., et al., *An RT-PCR study of 5-HT₆ and 5-HT₇ receptor mRNAs in the hippocampal formation and prefrontal cortex in schizophrenia*. Schizophr Res, 2002. **57**(1): p. 15-26.
830. Monsma, F.J., Jr., et al., *Cloning and expression of a novel serotonin receptor with high affinity for tricyclic psychotropic drugs*. Mol Pharmacol, 1993. **43**(3): p. 320-7.

831. Gerard, C., et al., *Immuno-localization of serotonin 5-HT₆ receptor-like material in the rat central nervous system*. Brain Res, 1997. **746**(1-2): p. 207-19.
832. Sleight, A.J., et al., *Characterization of Ro 04-6790 and Ro 63-0563: potent and selective antagonists at human and rat 5-HT₆ receptors*. Br J Pharmacol, 1998. **124**(3): p. 556-62.
833. Branchek, T.A. and T.P. Blackburn, *5-HT₆ receptors as emerging targets for drug discovery*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 319-34.
834. Waeber, C., et al., *[³H]-GR13808 labels 5-HT₄ receptors in the human and guinea-pig brain*. Neuroreport, 1993. **4**(11): p. 1239-42.
835. Vilaro, M.T., R. Cortes, and G. Mengod, *Serotonin 5-HT₄ receptors and their mRNAs in rat and guinea pig brain: distribution and effects of neurotoxic lesions*. J Comp Neurol, 2005. **484**(4): p. 418-39.
836. Vilaro, M.T., et al., *Cloning and characterization of a novel human 5-HT₄ receptor variant that lacks the alternatively spliced carboxy terminal exon. RT-PCR distribution in human brain and periphery of multiple 5-HT₄ receptor variants*. Neuropharmacology, 2002. **42**(1): p. 60-73.
837. Marchetti-Gauthier, E., et al., *BIMU₁ increases associative memory in rats by activating 5-HT₄ receptors*. Neuropharmacology, 1997. **36**(4-5): p. 697-706.
838. Takahashi, H., et al., *5-HT₄ receptors in the hippocampus modulate rat locomotor activity*. Hippocampus, 2002. **12**(3): p. 304-10.
839. Silvestre, J.S., A.G. Fernandez, and J.M. Palacios, *Effects of 5-HT₄ receptor antagonists on rat behaviour in the elevated plus-maze test*. Eur J Pharmacol, 1996. **309**(3): p. 219-22.
840. Espejo, E.F. and E. Gil, *Antagonism of peripheral 5-HT₄ receptors reduces visceral and cutaneous pain in mice, and induces visceral analgesia after simultaneous inactivation of 5-HT₃ receptors*. Brain Res, 1998. **788**(1-2): p. 20-4.
841. Truchot, L., et al., *Up-regulation of hippocampal serotonin metabolism in mild cognitive impairment*. Neurology, 2007. **69**(10): p. 1012-7.

842. Kepe, V., et al., *Serotonin 1A receptors in the living brain of Alzheimer's disease patients*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(3): p. 702-7.
843. Bowen, D.M., et al., *Circumscribed changes of the cerebral cortex in neuropsychiatric disorders of later life*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(23): p. 9504-8.
844. Lopez-Figueroa, A.L., et al., *Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia*. Biol Psychiatry, 2004. **55**(3): p. 225-33.
845. Lopez, J.F., et al., *A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin_{1A}, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression*. Biol Psychiatry, 1998. **43**(8): p. 547-73.
846. Albert, P., *Increased DNA methylation of the 5-HT_{1A} receptor promoter in suicide brain*. Int J Neuropsychopharmacol, 2008. **11** (Suppl 1)(105): p. 01.34.
847. Arango, V., et al., *Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims*. Neuropsychopharmacology, 2001. **25**(6): p. 892-903.
848. Cheetham, S.C., et al., *Brain 5-HT₁ binding sites in depressed suicides*. Psychopharmacology (Berl), 1990. **102**(4): p. 544-8.
849. Borg, J., et al., *Search for correlations between serotonin 5-HT_{1A} receptor expression and cognitive functions--a strategy in translational psychopharmacology*. Psychopharmacology (Berl), 2006. **185**(3): p. 389-94.
850. Golidis, C. and H. Rohrer, *Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons*. Nat Rev Neurosci, 2002. **3**(7): p. 531-41.
851. Paxinos, G. and C. Watson, *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2005, London, UK: Elsevier.
852. Pandya, D.N. and E.H. Yeterian, *Comparison of prefrontal architecture and connections*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1996. **351**(1346): p. 1423-32.
853. Kolb, B. and J. Cioe, *Organization and plasticity of the prefrontal cortex of the rat*, in *PREFRONTALCORTEX: From Synaptic Plasticity to Cognition* S. Otani, Editor. 2004, Kluwer Academic Publishers: Boston.

854. Breese, G., *Handbook of Psychopharmacology*, ed. L.L. Iversen, S.D. Iversen, and S.H. Snyder. Vol. I. 1975, New York: Plenum Press.
855. Colpaert, F.C., et al., *Large-amplitude 5-HT_{1A} receptor activation: a new mechanism of profound, central analgesia*. *Neuropharmacology*, 2002. **43**(6): p. 945-58.
856. Stephenson, R.P., *A modification of receptor theory*. *Br J Pharmacol Chemother*, 1956. **11**(4): p. 379-93.