

# **UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**Expresión de ARN mensajero de receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> en pacientes con depresión mayor, trastorno bipolar y esquizofrenia**

**Autor: López Figueroa, Antonio Luis**

**Directores: Tomas González Hernández,  
Stanley Jr. Watson  
y Manuel Óscar López Figueroa**

**Departamento de Anatomía, Anatomía Patológica e Histología**

**Memoria presentada por el Licenciado en Medicina y Cirugía Antonio Luis López Figuroa para aspirar al grado de Doctor.**

**DIRECTORES:**

**Dr. Tomás González Hernández**

Profesor Titular del Departamento de Anatomía,  
Anatomía Patológica e Histología,  
Universidad de La Laguna, Tenerife

**Dr. Stanley Jr. Watson**

Co-Director e Investigador Científico Principal del  
“Mental Health Research Institute”  
Director Asociado para Investigación y  
Profesor de Neurociencias  
Departamento de Psiquiatría,  
Universidad de Michigan, Ann Arbor, Estados Unidos.

**Dr. Manuel Oscar López Figuroa**

Coordinador Científico del Consorcio de Investigación  
“Pritzker Neuropsychiatric Disorders”  
Consejero Científico de “Bay City Capital”  
San Francisco, California, Estados Unidos

La Laguna, Noviembre de 2002



**Departamento de Anatomía, Anatomía Patológica e Histología,  
Universidad de La Laguna**

**Mental Health Research Institute  
University of Michigan**

Los abajo firmantes, Tomás González Hernández, Profesor Titular del Departamento de Anatomía, Anatomía Patológica e Histología de la Universidad de La Laguna, Stanley J Watson, Co-Director del Mental Health Research Institute, y Manuel Oscar López Figueroa, Coordinador Científico del Consorcio de Investigación “Pritzker Neuropsychiatric Disorders”.

**DAN FE:**

De que el trabajo de Tesis Doctoral titulado “Expresión del ARN mensajero de los receptores de serotonina 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> en pacientes con depresión mayor, trastorno bipolar y esquizofrenia”, presentado por Don Antonio Luis López Figueroa, ha sido realizada bajo su dirección conjunta y desarrollado a lo largo de los 4 últimos años al amparo de un proyecto subvencionado por “The Nancy Pritzker Depression Research Network” y la Fundación Canaria Dr. Manuel Morales.

La memoria presentada constituye una aportación completamente original al campo de la expresión cerebral de los receptores serotoninérgicos en enfermedades psiquiátricas, tales como la depresión mayor, el trastorno bipolar y la esquizofrenia. El presente trabajo es el primero en la literatura en realizar un análisis exhaustivo de los receptores serotoninérgicos en estructuras cerebrales de pacientes con trastorno bipolar, comparándolos con otras enfermedades psiquiátricas en un mismo estudio. En concreto, se eligieron dos centros cerebrales, el hipocampo y la corteza prefrontal, relacionados con funciones de conducta, por ser representativos de los distintos niveles de procesamiento de la información dentro del sistema límbico.

La metodología utilizada ha comprendido el uso de la técnica de hibridación *in situ* radioactiva. A lo largo de la ejecución del trabajo se han presentado resultados

preliminares en diversos congresos científicos internacionales, y los resultados definitivos de algunas partes del estudio han sido remitidos para su publicación en revistas internacionales especializadas.

La Laguna, Noviembre de 2002

Dr. Tomás González Hernández

Dr. Stanley J. Watson

Dr. Manuel Oscar López Figueroa

**PREÁMBULO Y**  
**AGRADECIMIENTOS**

La presente Memoria es el fruto de 4 años de trabajo dirigido por los Dres. Stanley J. Watson y Manuel Oscar López Figueroa del Mental Health Research Institute de la Universidad de Míchigan, y por el Dr. Tomás González Hernández del Departamento de Anatomía, Anatomía Patológica e Histología de la Universidad de La Laguna.

El proceso se inició en el verano de 1997, cuando comencé a familiarizarme con las técnicas de hibridación *in situ* aplicadas al campo de la Neurociencia, concretamente en el estudio de diferentes receptores en cerebros humanos y modelos experimentales. A partir del año 2000, como estudiante de tercer ciclo, he orientado mis conocimientos previos al estudio de los receptores serotoninérgicos y su implicación en importantes patologías psiquiátricas. Estos estudios se presentan aquí como tesis doctoral.

A lo largo de todo el texto de la Memoria se han utilizado exclusivamente términos en castellano, excepto en aquellos poquísimos casos en que la costumbre ha consagrado los nombres en latín (*in situ*, *per se*, *et al.*). Del mismo modo, se ha reducido la utilización de abreviaturas a los términos más usuales.

El trabajo que aquí se presenta, obviamente, no es el resultado del esfuerzo de un solo individuo. La colaboración necesaria de diversas personas e instituciones a lo largo de estos cuatro años, han hecho posible esta Memoria. Aquí quiero dejar constancia sincera del reconocimiento que debo a quienes han confiado en mí. En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los Doctores **Stanley J Watson y Huda Akil** por el esfuerzo realizado en mi formación científica como mis mentores y por el incalculable apoyo afectivo que he recibido de ellos como personas. Su tesón por lograr mejorar el conocimiento científico es uno de sus grandes legados. Segundo, y no menos, a mi hermano, Dr. **Manuel Oscar López Figueroa**, por las ilusiones y el esfuerzo compartidos en la realización de un trabajo tan ambicioso como el que aquí se presenta. A él debo mi vocación científica y mi espíritu crítico, así como la calidad de los trabajos realizados bajo su supervisión. Su ejemplo me ha enseñado a superar los momentos difíciles que toda investigación conlleva, aprendiendo de los logros tanto como de los fracasos. Del mismo modo quiero agradecer la inestimable ayuda y apoyo ofrecidos por el Profesor **Tomás González Hernández**, sin cuya colaboración y experiencia, este proyecto no habría podido ser realizado. Agradezco a todos ellos su confianza y afecto.

Añado a estos agradecimientos a la Dra. Camille Norton, por su dedicación, perseverancia y por su excelencia como persona. Quería también agradecer de todo corazón la ayuda de los Dres: Charles R Neal Jr., Mónica Beneyto Santonja, Jim Meador-Woodruff, Juan Francisco López, Inés Morano, Claudio Caamaño, Mohamed Kabbaj, Marco Cecchi, Sandra Villafuerte, Denise Armellini-Dodel, también a Ruth Freedman, Sharon Burke, y todos los demás amigos y compañeros del Mental Health Research Institute, así como a los Dres. Lucio Díaz-Flores Feo y Álvaro Torres Lana de la Universidad de La Laguna, y en especial, a aquellos que han seguido apostando por mí a lo largo de estos años.

Les doy las gracias no sólo a aquellos que han celebrado conmigo mis éxitos, sino a los que me han acompañado en los momentos más difíciles del camino. Gracias a Arius Akasheh y a su maravillosa familia, a Lars, al Dr. Jesús, a las Dras. Ruth, Fani y Eva, a Francisco y familia, David, José Luis, Fermín y demás amigos de las Islas Canarias y de Michigan. A la Dra. Elena Vigo Moreno por darme su amor y por apoyarme de forma desinteresada, igual que toda su familia. Gracias a mi familia, mi hermana María Luisa, a mis tíos Juan José, Armando y Carmen Nieves, demás tíos y primos, por su cariño y comprensión. Este trabajo se lo dedico sobre todo a mi madre Alicia Figueroa Abreu y a mis abuelas Ursula Abreu Olivero y Luisa Hernández cuya luz me ilumina la vida y el corazón.

Finalmente, quiero agradecer a las siguientes Instituciones por las subvenciones otorgadas, sin las cuales este proyecto no habría podido realizarse: “Nancy Pritzker Depression Research Network”, “National Institute of Mental Health Program Project” (MH42251), y Fundación Canaria Dr. Manuel Morales. Habiendo completado el ciclo de mi formación predoctoral, en estos momentos mi único deseo es haber aprendido de esta experiencia y haber aportado, en mi medida personal y con la ayuda de mis mentores y compañeros, una pincelada más en la investigación de la compleja trama de la función cerebral en los seres humanos.

A mi madre



**INDICE**

<b><u>PREÁMBULO Y AGRADECIMIENTOS.....</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>RESUMEN.....</u></b>	<b><u>8</u></b>
<b><u>INTRODUCCIÓN.....</u></b>	<b><u>10</u></b>
Historia y caracterización general de la serotonina.....	13
Subtipos de receptores de serotonina.....	14
Trastornos psiquiátricos.....	19
Trastornos del estado del ánimo afectivo.....	19
Depresión Mayor.....	19
Trastorno Bipolar.....	22
Esquizofrenia.....	24
Antecedentes del estudio del sistema serotoninérgico en las enfermedades psiquiátricas.....	28
Áreas anatómicas de interés.....	30
Hipocampo.....	30
Corteza prefrontal.....	32
Estudios previos en tejido cerebral postmortem sobre receptores serotoninérgicos en enfermedades psiquiátricas.....	35
Hibridación <i>in situ</i> .....	36
<b><u>PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....</u></b>	<b><u>39</u></b>
<b><u>MATERIAL Y METODOS.....</u></b>	<b><u>42</u></b>
Sujetos.....	42
Hibridación <i>in situ</i> .....	45
Análisis de imágenes.....	47
Análisis estadísticos.....	50
<b><u>RESULTADOS.....</u></b>	<b><u>51</u></b>
Distribución anatómica de los receptores serotoninérgicos en cerebros normales.....	52
ARNm de 5-HT <sub>1A</sub> .....	52
ARNm de 5-HT <sub>1B</sub> .....	52

ARNm de 5-HT <sub>2A</sub> .....	53
Expresión de los receptores en los diferentes grupos de pacientes.....	53
Corteza prefrontal dorsolateral.....	53
Hipocampo.....	54
<b><u>DISCUSION.....</u></b>	<b><u>60</u></b>
Consideraciones metodológicas.....	61
Comparación entre la hibridación <i>in situ</i> y los estudios de unión a ligandos..	61
Distribución anatómica de los receptores serotoninérgicos.....	62
Esquizofrenia.....	65
Depresión Mayor.....	69
Trastorno Bipolar.....	70
<b><u>CONCLUSIONES.....</u></b>	<b><u>73</u></b>
<b><u>ABREVIATURAS.....</u></b>	<b><u>76</u></b>
<b><u>FIGURAS Y TABLAS.....</u></b>	<b><u>79</u></b>
<b><u>BIBLIOGRAFÍA.....</u></b>	<b><u>84</u></b>
<b><u>NOTAS.....</u></b>	<b><u>102</u></b>

**RESUMEN**

Las alteraciones en la neurotransmisión de serotonina (5-HT) están implicadas tanto en los trastornos del estado de ánimo afectivo como en la esquizofrenia (EQZ). La alteración del sistema serotoninérgico es un fenómeno bien documentado en los trastornos del estado de ánimo aunque las anomalías específicas en receptores serotoninérgicos en estas enfermedades psiquiátricas están relativamente mal definidas. El sistema serotoninérgico inerva múltiples regiones cerebrales, entre ellas, áreas límbicas como el hipocampo (HC) y la corteza prefrontal (CPF). Ambas regiones han sido implicadas en la fisiopatología de los trastornos del estado de ánimo afectivo y la esquizofrenia.

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar las alteraciones de los receptores serotoninérgicos en la CPF y en el HC de pacientes con dichas patologías psiquiátricas. El estudio de la regulación de los receptores de serotonina en el cerebro humano puede aportar nuevos datos al conocimiento de la fisiopatología de las enfermedades del ánimo afectivo y la esquizofrenia. La mayoría de los trabajos previos se han basado en estudios de unión a proteínas. Nosotros hemos optado por el análisis del ARN mensajero (ARNm) de ciertos receptores serotoninérgicos que han sido relacionados con estas enfermedades psiquiátricas.

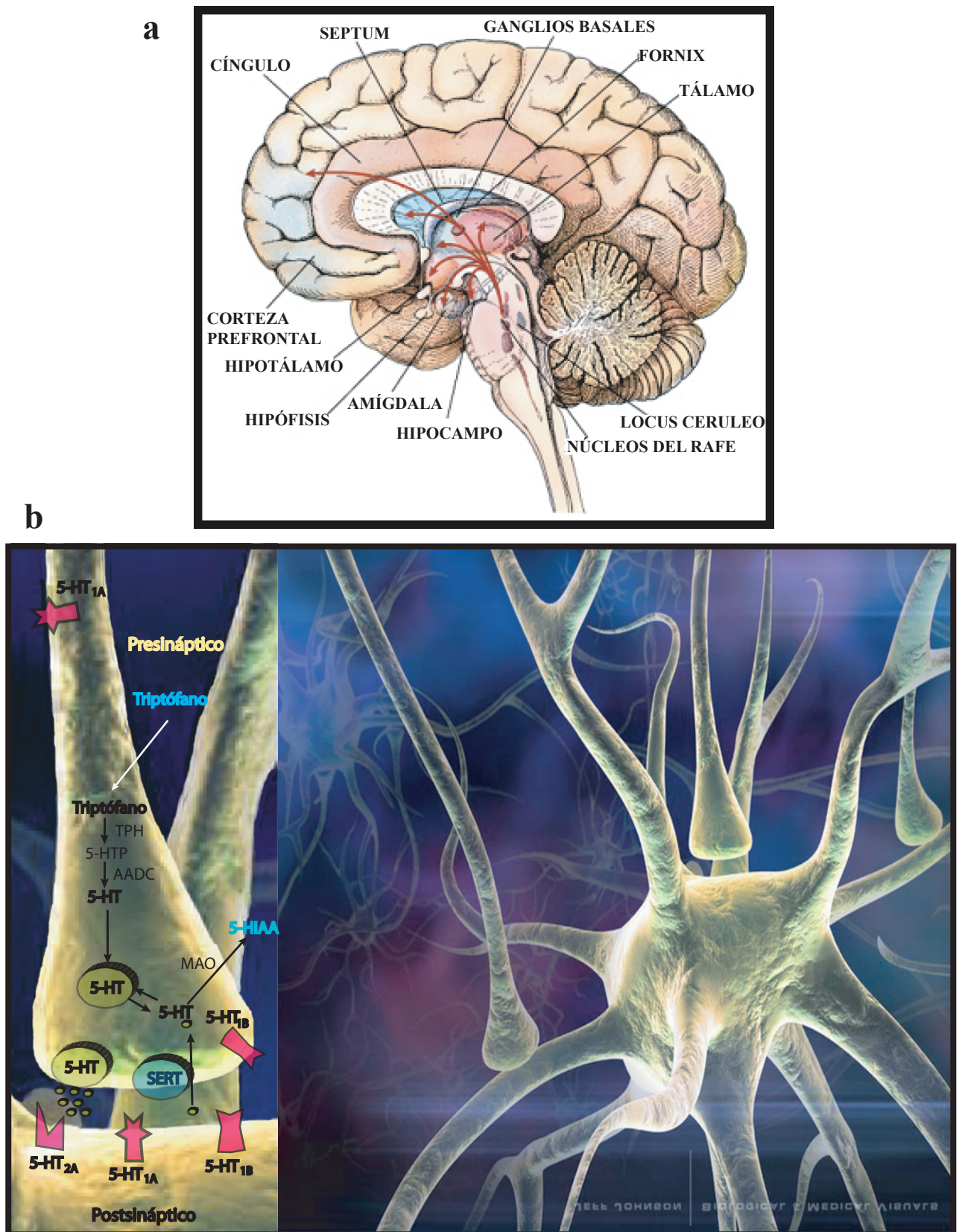
Usando la técnica de hibridación *in situ*, se cuantificaron los niveles de ARNm de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> en el hipocampo, y los niveles del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> en la corteza prefrontal dorsolateral (CPFDL) en pacientes con historia de depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TBP), esquizofrenia y un grupo control (CON; 15 sujetos por grupo). En la CPFDL se observó un descenso significativo del ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en pacientes con DM y del ARNm del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en pacientes con TBP. Los sujetos con DM mostraron un descenso significativo del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub> en el HC, mientras que los pacientes con TBP y EQZ tenían un incremento significativo en los niveles del ARNm de 5-HT<sub>1B</sub>, y un descenso significativo del ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> en la formación hipocampal.

El hallazgo de alteraciones en los niveles del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> en cerebros de sujetos con trastornos del ánimo y con esquizofrenia constituye un nuevo dato en la neuroanatomía química de estas enfermedades y un apoyo adicional a la hipótesis de la desregulación del sistema serotoninérgico en estas patologías.

# **INTRODUCCIÓN**

Numerosos neurotransmisores (*Risch y Nemeroff, 1992; Arango et al., 1996; Bowden et al., 1997; Klimek et al., 1997; Callado et al., 1998*) y neurohormonas (*Gold et al., 1988; Nemeroff et al., 1988; Akil et al., 1993; Arborelius et al., 1999*) han sido implicados en la fisiopatología de los trastornos del estado de ánimo; entre ellos, la serotonina ha adquirido un papel esencial en base a trabajos realizados tanto a nivel experimental (*Blier y de Montigny, 1994; López et al., 1998*) como en estudios postmortem (*Prange et al., 1974; Stanley et al., 1982; Meltzer, 1989; Stanley y Stanley, 1990; Yates et al., 1990a; Arango et al., 1992*). Además, el sistema serotoninérgico también ha sido implicado en otros trastornos psiquiátricos, particularmente en la esquizofrenia (*Woolley y Shaw, 1954; Andreasen, 1996; Harrison, 1999a; Aghajanian y Marek, 2000; Sawa y Snyder, 2002*). El hecho de que el sistema serotoninérgico esté implicado en este tipo de enfermedades no es sorprendente, ya que aunque los centros de origen se encuentran bien localizados a nivel trocoencefálico, sus proyecciones son muy amplias, extendiéndose por todo el neuroeje desde las zonas más rostrales a las más caudales (*Dahlstrom y Fuxe, 1964; Steinbusch, 1981; Hornung et al., 1990*), teniendo por lo tanto, impacto en diferentes circuitos cerebrales.

El sistema serotoninérgico se origina en los núcleos del rafe, una zona cerebral que puede ser dividida en dos partes: una craneal y otra caudal (*Dahlstrom y Fuxe, 1964*). La porción craneal contiene los núcleos del rafe dorsal y del rafe mediano y proyectan primariamente a la corteza cerebral y los ganglios basales, mientras que los núcleos caudales contienen los núcleos del rafe pallidus, del rafe magnus y del rafe obscurus y proyectan principalmente al tronco encefálico y la médula espinal (*Dahlstrom y Fuxe, 1964; Steinbusch, 1981; Hornung et al., 1990*). Los núcleos del rafe dorsal y del mediano son una de las mayores regiones del rafe e inervan áreas límbicas tales como la corteza prefrontal y el hipocampo, dos regiones que han sido implicadas en la fisiopatología de los trastornos del estado de ánimo afectivo y la esquizofrenia (*Weinberger et al., 1988; Weinberger, 1991; Shenton et al., 1992; Joyce, 1993; Andreasen et al., 1994a, 1994b; Goldman-Rakic, 1994; Selemon et al., 1995; Joyce et al., 1997; Benes, 2000; Grace, 2000; Harrison y Eastwood, 2001*). **(Figura 1.a.)**



**Figura 1. (a).** Conexiones del sistema serotoninérgico. Principales eferencias de los núcleos del rafe a regiones corticales y subcorticales. **(b).** Metabolismo neuronal de la serotonina (5-HT) y localización de los receptores serotoninérgicos. A partir del aminoácido triptófano se sintetiza 5-HT, mediante las enzimas TPH y AADC. La serotonina es transportada en vesículas hasta las terminales axonales de las neuronas serotoninérgicas. Tras su liberación, la 5-HT es recaptada a nivel presináptico por el transportador de serotonina (SERT), pudiendo volver a las vesículas o ser degradado a 5-HIAA mediante la enzima monoamino oxidasa (MAO). Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> se encuentran tanto en neuronas serotoninérgicas como en no-serotoninérgicas, mientras que el receptor 5-HT<sub>2A</sub> solo esta en neuronas no-serotoninérgicas. Abreviaturas: TPH = triptófano hidroxilasa; AADC = aminoácido descarboxilasa; 5-HIAA = ácido 5-hidroxi-indolacético.



## HISTORIA Y CARACTERIZACIÓN GENERAL DE LA SEROTONINA

Al estudiar los componentes de la sangre, los investigadores encontraron una sustancia desconocida, propia de las plaquetas, que fue llamada serotonina debido a sus características vasotónicas en la sangre (*Rapport et al., 1948*). Por la misma época se descubrió la enteramina, un componente incluido en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal que producía la contracción del músculo liso (*Erspamer y Asero, 1952*). Subsecuentemente, ambas sustancias fueron purificadas, cristalizadas y químicamente identificadas como 5-hidroxitriptamina (5-HT) o serotonina.

Después del descubrimiento de la síntesis de 5-HT a partir del aminoácido triptófano en 1951 por Hamlin y Fisher, se desarrollaron ensayos más sensibles para localizar 5-HT por todo el cuerpo, observando que el 1 % - 2% se encuentra en el cerebro (*Twarog and Page, 1953*). El descubrimiento por Amin y colaboradores (*1954*) de una distribución heterogénea en la concentración de serotonina cerebral, condujo a los científicos a sospechar que 5-HT sería un neurotransmisor. La técnica histofluorescente de Falck-Hillarp (*Falk et al., 1962*) facilitó el mapeo neuroanatómico de las fibras serotoninérgicas, indicando una alta densidad de 5-HT en neuronas de los núcleos del rafe del troncoencéfalo. En estos núcleos, las poblaciones neuronales fueron denominadas como B1-B9, siendo B1 el grupo celular más caudal (*Dahlstrom y Fuxe, 1964, 1965*). El desarrollo subsiguiente de las técnicas autoradiográficas con el uso de [<sup>3</sup>H] 5-HT (*Aghajanian y Bloom, 1967; Calas, 1974; Descarries, 1975*), y de técnicas inmunoquímicas con el uso de anticuerpos contra serotonina (*Steinbusch et al., 1978; Steinbusch, 1981*), permitió un mapeo extenso de las fibras serotoninérgicas, revelando una inervación difusa que incluye amplias regiones de la corteza cerebral, hipocampo, amígdala, ganglios basales y médula espinal. Posteriormente, los estudios autoradiográficos, y adicionalmente, la clonación molecular llevaron al descubrimiento de una colección substancial de subtipos de receptores serotoninérgicos en diferentes regiones cerebrales. **(Figura 1.b.)**

Esta distribución difusa en el sistema nervioso explica la variedad de funciones en las cuales la serotonina ha sido implicada, incluyendo el control del ánimo, el ciclo vigilia-descanso, las conductas alimentarias y sexuales, la termorregulación, el control del dolor, etc. (*Feldberg y Myers, 1966; Jouvet, 1967; Tenen, 1967; Fernstrom y Wurtman, 1971; Gorzalka et al., 1990; Meneses, 1998, 1999; Williams et al., 2002*). Asimismo, se han descrito alteraciones del sistema serotoninérgico en numerosos procesos neuropatológicos como la depresión, la

ansiedad, la esquizofrenia, trastornos del sueño, anorexia, e incluso en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer (*Yates et al., 1990b; Golden et al., 1991; Meltzer et al., 1998; Moret y Briley, 2000*).

### Subtipos de receptores de serotonina

En la actualidad se conocen hasta catorce subtipos de receptores 5-HT (*Barnes y Sharp, 1999*), esta diversidad de subtipos, frente a los de otras monoaminas y algunos receptores proteicos ha sido atribuida a su antigüedad filogenética (*Peroutka, 1994*).

En 1957, Gaddum y Picarelli descubrieron que la contracción del estómago inducida por 5-HT era completamente bloqueada por la coadministración de morfina y dibenzilina. Cada uno de estos compuestos por separado producía un bloqueo parcial de la respuesta de contracción mediada por 5-HT. Estudios detallados revelaron que la morfina, pero no la dibenzilina, bloqueaba la liberación de acetilcolina (ACh) desde terminales nerviosos postganglionares. Por el contrario, la dibenzilina, pero no la morfina, bloqueaba la acción directa de la 5-HT en el músculo liso. Los autores concluyeron que dos tipos diferentes de receptores estaban involucrados en el efecto de la 5-HT, y, los receptores fueron nombrados como D y M, por las propiedades antagonistas de la dibenzilina y la morfina, respectivamente.

Mediante el uso de [<sup>3</sup>H] 5-HT, [<sup>3</sup>H] espiperona y [<sup>3</sup>H] ácido lisérgico dietilamida (LSD) en estudios de unión de receptores en membranas en la corteza frontal de la rata, Peroutka y Snyder (*1979*) sugirieron la existencia de dos subtipos de receptores de 5-HT, los cuales fueron designados como 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub>. La clase 5-HT<sub>1</sub> exhibía una afinidad nanomolar por 5-HT, mientras que los receptores 5-HT<sub>2</sub> presentaban una afinidad micromolar por 5-HT y una alta afinidad por la espiperona. Posteriormente, la clase 5-HT<sub>1</sub> fue subdividida en 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> basándose en la unión diferencial a la espiperona (*Pedigo et al., 1981*). Pronto, los análisis autoradiográficos de la corteza revelaron otro receptor del tipo 5-HT<sub>1</sub> que presentaba una alta afinidad por 5-HT pero que difería en la afinidad por otros compuestos, por lo que se le denominó 5-HT<sub>1C</sub> (*Pazos y Palacios, 1985*).

Dada la lista creciente de receptores de 5-HT descubiertos, se vio la necesidad de crear una clasificación sistemática y racional que inicialmente constó de tres categorías principales (para una revisión más extensa de la primera clasificación ver *Bradley et al., 1986*) que fueron 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> (que incluía los receptores “D” previamente descritos) y 5-HT<sub>3</sub> (que incluía los receptores “M”). Con el paso de los

años, el descubrimiento de nuevos subtipos de receptores de 5-HT se expandió rápidamente debido a la introducción de nuevas técnicas de biología molecular. Para minimizar la confusión en la literatura, el Comité de Nomenclatura de Receptores del Club de la Serotonina en conjunción con la Unión Internacional de Clasificación Farmacológica (1994) clasificaron a estos receptores basándose en tres características fundamentales: la capacidad para unirse a ligandos (agonistas o antagonistas), la similitud de sus secuencias genéticas y por último, el mecanismo de segundos mensajeros utilizado. Bajo estas condiciones se llegó a establecer la actual clasificación de siete familias denominadas de 5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub>, incluyendo un total de 14 diferentes subtipos de receptores (*Barnes y Sharp, 1999*). Muchos esfuerzos y recursos se han dirigido a mejorar nuestro entendimiento de la función atribuible a cada uno de los subtipos de receptores en el cerebro. Con este fin, la síntesis de una serie de compuestos que interaccionan selectivamente con cada subtipo de receptor ha sido fundamental, pero todavía existen ciertos subtipos de receptores como 5-HT<sub>1E</sub>, 5-HT<sub>5A</sub> y 5-HT<sub>5B</sub> que carecen de ligandos específicos.

A nivel molecular, se ha establecido que la familia de receptores serotoninérgicos son receptores transmembrana de tipo metabotrópico que se asocian a segundos mensajeros a través de proteínas G, aunque un miembro de la familia, el receptor 5-HT<sub>3</sub>, se une a canales iónicos. **(Figura 1.b.)**

El grupo de receptores 5-HT<sub>1</sub> está formado por cinco subtipos, denominados de A a F, exceptuando el 5-HT<sub>1C</sub> que en la actualidad se denomina 5-HT<sub>2C</sub> (*Humphrey et al., 1993; Hoyer et al., 1994*). Esta familia de receptores presenta una secuencia de aminoácidos con alta homología y todos ellos se unen negativamente a la adenilato ciclasa a través de proteínas G.

La identificación del sitio de unión de 5-HT<sub>1A</sub> permitió el avance rápido del conocimiento de la farmacología y la función del receptor (*Pedigo et al., 1981*). Esto se debió principalmente a la identificación del agonista 8-hidroxi-2(di-n-propilamino) tretalina (8-OH-DPAT; *Arvidsson et al., 1981*). Tanto el ARNm (*Burnet et al., 1995; Pasqualetti et al., 1996*) como los sitios de unión de 5-HT<sub>1A</sub> (*Pazos et al., 1987a; Pompeiano et al., 1992; Joyce et al., 1993*) se encontraron fundamentalmente en estructuras límbicas como el hipocampo, la corteza, la amígdala y en las regiones del rafe. Además de los estudios autoradiográficos, estudios neuroquímicos (*Hjorth y Magnusson, 1988; Hjorth y Sharp, 1991; Kreiss y Lucki, 1994; Hjorth et al., 1995*), electrofisiológicos (*Sprouse y Aghajanian, 1986*) y de lesiones quirúrgicas (*Verge et al., 1986*) indicaron que los receptores somatodendríticos 5-HT<sub>1A</sub> ejercían una

poderosa influencia autorreguladora sobre las neuronas serotoninérgicas, reduciendo la transmisión de neuronas serotoninérgicas y por lo tanto, la liberación de 5-HT desde los terminales nerviosos.

En 1992, Weinshank y colaboradores demostraron en el hombre la existencia de dos subtipos de receptores 5-HT<sub>1D</sub> codificados por genes diferentes, denominados 5-HT<sub>1D $\alpha$</sub>  y 5-HT<sub>1D $\beta$</sub> . En sus investigaciones, el receptor 5-HT<sub>1B</sub> encontrado en la rata presentaba una distribución regional similar y una secuencia homóloga en un 97% con el receptor 5-HT<sub>1D $\beta$</sub>  humano; no obstante, estos dos receptores diferían en sus perfiles farmacológicos (*Adham et al., 1992; Hamblin et al., 1992*). Un aminoácido diferente en la séptima región transmembrana, una asparragina, es responsable de los diferentes perfiles farmacológicos entre el receptor 5-HT<sub>1D $\beta$</sub>  humano y el homólogo en roedores, el receptor 5-HT<sub>1B</sub> (*Adham et al., 1992; Metcalf et al., 1992*). La revisión más reciente de la clasificación sugiere que ambos receptores sean denominados 5-HT<sub>1B</sub>, aceptando que las características funcionales del receptor 5-HT<sub>1D $\beta$</sub>  humano predominarían y definirían al receptor, mientras que las características farmacológicas del receptor 5-HT<sub>1B</sub> de roedores serían consideradas como una diferencia entre las especies (*Hoyer y Martín, 1997*). Las copias de ARNm de 5-HT<sub>1B</sub> se encuentran en alta densidad en el núcleo estriado y núcleo del rafe dorsal, y con una densidad intermedia en el hipocampo y en la corteza frontal, mientras que su detección es débil en la hipófisis y el cerebelo (*Jin et al., 1992*). Los sitios de unión de 5-HT<sub>1B</sub> están localizados con una densidad alta en el globus pallidus y la sustancia negra reticulata, y con una densidad baja en caudado-putamen y la corteza cerebral (*humano: Varnas et al., 2001; roedor: Hoyer et al., 1985; Bruinvels et al., 1993; Boschert et al., 1994*). La localización anatómica diferente del ARNm y de la proteína del receptor en neuronas serotoninérgicas, en combinación con estudios de lesiones (*Waeber et al., 1990*) sugiere que los receptores 5-HT<sub>1B</sub> están localizados en los terminales axonales de neuronas serotoninérgicas (*Boschert et al., 1994*), mientras que el solapamiento de las señales (ARNm y proteína) en otros tipos de neuronas sugiere que su localización es somatodendrítica (*Maura et al., 1986a*). Por otra parte, la localización anatómica del receptor 5-HT<sub>1B</sub> es consistente con la observación de que los autorreceptores regulan tanto la síntesis como la liberación de 5-HT en las áreas de inervación (*Engel et al., 1986; Maura et al., 1986b; Hjorth y Tao, 1991; Hjorth et al., 1995*), mientras que los heterorreceptores modulan la liberación de otros neurotransmisores (*Maura y Raiteri, 1986b; Johnson et al., 1992*).

La clase de receptor 5-HT<sub>2</sub> consta de 3 subtipos designados de A a C, todos ellos positivamente unidos a la hidrólisis de fosfatidil inositol (*Julius et al., 1988, 1990*). El receptor 5-HT<sub>2C</sub> fue originariamente definido como 5-HT<sub>1C</sub>, pero como se une a fosfatidil inositol y posee una secuencia de aminoácidos similar a la familia de receptores 5-HT<sub>2</sub>, fue denominado 5-HT<sub>2C</sub> (*Julius et al., 1988; Mengod et al., 1990a*). La principal característica que distingue los receptores 5-HT<sub>2</sub> es su afinidad por antagonistas selectivos. Ketaserin, espiperona y MDL 100,907 muestran diferentes grados de selectividad por 5-HT<sub>2A</sub>, mientras que SB 242084 es el antagonista preferido para 5-HT<sub>2C</sub> (*Julius et al., 1988; Kursar et al., 1992; Hoyer et al., 1994*). El ARNm del receptor 5-HT<sub>2A</sub> ha sido localizado en la corteza cerebral (particularmente en la corteza parahipocámpal), el hipocampo y el claustrum (*humano: Pazos et al., 1987b, Pompeiano et al., 1994; Burnet et al., 1995; Pasqualetti et al., 1996; roedor: Pazos et al., 1985; Julius et al., 1988; Mengod et al., 1990b*) y el ARNm de 5-HT<sub>2C</sub> en los plexos coroideos, corteza piriforme, corteza cingular, amígdala, núcleo subtalámico y sustancia negra (*Julius et al., 1988; Hoffman y Mezey, 1989; Molineaux et al., 1989; Mengod et al., 1990a; Roca et al., 1993*). Además, los sitios de unión de 5-HT<sub>2A-C</sub> (*Pazos et al., 1987b*) se co-localizan con el ARNm de 5-HT<sub>2</sub>, sugiriendo que estos receptores pueden ser expresados en el cuerpo neuronal.

Los receptores serotoninérgicos han sido localizados principalmente a nivel postsináptico, donde modulan el flujo iónico para producir la despolarización neuronal (5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub>), o la hiperpolarización neuronal (5-HT<sub>1A</sub>). Ciertos subtipos de receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> y posiblemente 5-HT<sub>1D</sub>) están localizados en las neuronas serotoninérgicas propiamente dichas, donde funcionan como autorreceptores a nivel somatodendrítico o de los terminales axonales. Por el otro lado, otros receptores (5-HT<sub>1A, B, D</sub>, 5-HT<sub>2A, C</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub>) están ubicados en las dendritas de neuronas no serotoninérgicas, funcionando como heterorreceptores, probablemente regulando la liberación de otros neurotransmisores (*Barnes y Sharp, 1999; Verge y Calas, 2000*).

Más recientemente, se ha propuesto que ciertos subtipos de receptores serotoninérgicos (5-HT<sub>2A</sub>, y posiblemente 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>4</sub> y 5-HT<sub>6</sub>) pueden mediar efectos postsinápticos que se extienden más allá de la simple influencia en la neurotransmisión. Esto es, que a través de la activación de cascadas de mecanismos intracelulares pueden alterar la expresión génica de determinados factores que han

sido relacionados con la modulación de mecanismos tróficos y la conectividad neuronal (*López et al., 1997; Vaidya et al., 1997; Barnes y Sharp, 1999; Manji et al., 2001*).

## TRASTORNOS PSIQUIATRICOS

### TRASTORNOS DEL ESTADO DEL ÁNIMO AFECTIVO

Los trastornos del estado de ánimo son las alteraciones psiquiátricas de mayor prevalencia, representando el 25% de los pacientes ingresados en instituciones públicas, el 50% de los pacientes ambulatorios de salud mental y el 10% de todos los pacientes vistos en la práctica médica en una consulta de medicina general (*Weissman et al., 1996; Vazquez-Barquero et al., 1997*).

#### **Depresión Mayor**

La depresión se define como un estado emocional en el cual existen sentimientos extremos de tristeza, abatimiento, desaliento y vacío. La depresión está asociada con un comportamiento físico-social inadecuado, un deterioro grave de las actividades diarias y consecuentemente, un aumento en la cantidad días de baja laboral. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS; *Greenberg et al., 1993; Thornicroft y Sartorius, 1993; Sartorius et al., 1996; Weissman et al., 1996*), el 3-5% de la población mundial presenta depresión, lo que equivale a 120-200 millones de personas. El inicio de la depresión se produce en término medio entre los 20 y los 40 años. La depresión mayor afecta a 1 de cada 10 españoles en un determinado momento de la vida (*Vazquez-Barquero et al., 1997*).

La depresión constituye uno de los trastornos típicos en los que sobre una personalidad predispuesta pueden incidir, en proporciones variables, múltiples factores: neurobiológicos, psíquicos, socioculturales y otros. La herencia es el factor predisponente más importante, aunque no se sabe a ciencia cierta la forma en que se hereda. La acumulación familiar en muchos casos, junto a la ausencia de un marcador genético evidente, han sugerido la hipótesis de una herencia poligénica (*National Institute of Mental Health's Genetics Workgroup, 1999*). Además, en muchas personas, una pérdida afectiva o un estrés severo pueden interaccionar con una predisposición hereditaria y precipitar el cuadro (*Kendler et al., 1999*). Además, ciertas enfermedades pueden inducir una depresión secundaria, como es el caso en las patologías tiroideas o en el SIDA. (*Clay, 2000; Goulet et al., 2000; Bing et al., 2001; Cheer y Goa, 2001; Ferrando y Wapenyi, 2002; Hermann et al., 2002; Sher, 2002; Tsigos y Chrousos, 2002*).

Los cambios neuroquímicos que caracterizan la depresión han sido identificados como alteraciones en la modulación de los sistemas serotoninérgico (Coppen, 1967; Blier y de Montigny, 1994; Mongeau et al., 1997; López et al., 1998), colinérgico (Janowsky y Overstreet, 1995), y catecolaminérgicos [noradrenalina (NA; Schatzberg y Schildkraut, 1995; Mongeau et al., 1997; Manji et al., 2001) y dopamina (DA; Coppen, 1967; Willner, 1995)]. Se cree que la vía final común a todos los trastornos afectivos es una alteración de la función limbico-diencefálica que implica estructuras extrapiramidales subcorticales y sus conexiones prefrontales (Manji et al., 2000, 2001).

Las manifestaciones de los trastornos depresivos se agrupan en cuatro conjuntos principales (DSM-IV, 1994). Por un lado existe la alteración del estado de ánimo y el afecto, donde la tristeza es el principal síntoma, frecuentemente asociado con ansiedad, también se advierte apatía, sensación de vacío, irritabilidad o enojo, desinterés general y una disminución de reactividad frente a actividades agradables o ingratas. En otro grupo están las alteraciones del pensamiento o del proceso cognitivo, caracterizado por una conducta pesimista, sentimientos de culpa, indecisión, pérdida de autoestima y autoreproches, así como la aparición de ideas suicidas en dos tercios de los pacientes, de los cuales el 10 al 15% presentan intentos de suicidio. En un tercer grupo están las alteraciones de la actividad psicomotriz, las cuales a su vez se dividen en manifestaciones de retardo (lentitud de movimientos corporales, disminución de la expresión facial y falta de comunicación y de contacto social) y manifestaciones de agitación (inquietud, impaciencia o hiperactividad inútil incontrolada). Finalmente, el cuarto grupo son las manifestaciones somáticas o de los instintos que incluyen cambios en las funciones básicas como el sueño (insomnio), el apetito (más frecuente la anorexia) o disminución de la libido; cambios en la vitalidad (cansancio) y sensaciones corporales de dolor, frío, pesadez de las extremidades, o síntomas viscerales.

La **depresión mayor** es un estado de ánimo depresivo severo y persistente (al menos dos semanas), con pérdida de interés o de placer en las actividades normales, descenso de energía vital, pereza o agitación, cambios en el sueño y/o el apetito, y sentimientos de culpa, desesperación o soledad que son lo suficientemente graves como para interferir con la actividad cotidiana (DSM-IV, 1994). Si la depresión es muy grave, puede ir acompañada de síntomas psicóticos o de pensamientos o conductas suicidas. Los periodos de mayor riesgo de suicidio son las fases de



recuperación inmediatamente consecutivas a la depresión, cuando la actividad psicomotriz está volviendo a la normalidad, pero el estado de ánimo todavía está abatido (*Bulik et al., 1990; Mann y Arango, 1992; Malone et al., 1995; Mann et al., 1999*).

La terapia farmacológica (*Nemeroff y Owens, 2002*) incluye antidepresivos tricíclicos (clomipramina, imipramina, trazodona), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS; paroxetina, fluoxetina, sertralina), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina (IRSN; venlafaxina); inhibidores de monoamino oxidasa (IMAO; moclobemida, fenelcina, tranilcipromina) y algunos nuevos fármacos antidepresivos que bloquean fundamentalmente los receptores 5-HT<sub>2</sub> e inhiben la recaptación de 5-HT y de NA (nefazodona; *Kent, 2000; Rosenberg et al., 2000*). Con el tratamiento la recuperación suele ser evidente en el curso de la tercera semana y alcanza su grado más efectivo entre la cuarta y la quinta semanas. Otros tratamientos empleados son: la terapéutica profiláctica con sales de litio, mayormente en las depresiones graves y recurrentes o en los trastornos bipolares, y las curas de privación de sueño (*Burgess et al., 2001*); la fototerapia comúnmente utilizada en las depresiones de tipo estacional. La terapéutica electroconvulsiva está todavía indicada en ciertas depresiones psicóticas o con graves ideas de suicidio (*McCall, 2001; Nemeroff et al., 2001, 2002*). La terapia farmacológica combinada con la psicoterapia tiene mejores resultados que cada una de las terapias por separado (*Glick et al., 2001*). Ante el riesgo de suicidio se recomienda la administración conjunta de medicación antidepresiva y ansiolíticos (*Nemeroff et al., 2002*).

## **Trastorno Bipolar**

El trastorno bipolar es una enfermedad que se caracteriza por cambios bruscos alternantes del estado de ánimo, de excitación y/o irritabilidad a tristeza y desesperación, acompañados de trastornos de conducta, entre los que pueden existir periodos intercríticos de ánimo normal (*DSM-IV, 1994*).

El trastorno bipolar, también conocido como la enfermedad maniaco depresiva (*Kraepelin, 1921; DSM-IV, 1994*), afecta a aproximadamente el 4 % de la población general (*Weissman et al., 1996*), lo que supone más de medio millón de españoles adultos. La enfermedad aparece típicamente en la adolescencia o en la etapa temprana de la edad adulta. Los ciclos, o episodios, de depresión o manía típicamente se repiten y pueden llegar a ser más frecuentes, a menudo perturbando el rendimiento laboral y escolar, y la vida familiar y social. El trastorno bipolar está a menudo complicado por la co-existencia de abuso de sustancias tóxicas y alcohol (*Dilsaver et al., 1994; Chen y Dilsaver, 1996*).

Al igual que la depresión, en cuanto a su etiología se piensa que la herencia es el factor predisponente más importante (*Mendlewicz y Rainer, 1974; Bertelsen et al., 1977; Wender et al., 1986; Hyman, 1999; National Institute of Mental Health's Genetics Workgroup, 1999*). No se sabe a ciencia cierta la forma en que se hereda, pero puede que algunas formas de trastorno bipolar se deban a genes dominantes (autosómicos o ligados al cromosoma X; *Berrettini et al., 1994, 1997*). Se desconoce el sustrato genético heredado, pero se cree que la vía final común a todos los trastornos afectivos es una alteración de la función limbo-diencefálica, aunque estudios recientes abogan también por la implicación de estructuras extrapiramidales subcorticales y sus conexiones prefrontales (*Goodwin, 1997; Rajkowska, 1997; Soares y Mann, 1997; Benes et al., 1998; Ongur et al., 1998; Vawter et al., 2000*). Además, parece que existe un desequilibrio químico entre neurotransmisores serotoninérgicos, catecolaminérgicos (noradrenalina y dopamina) y colinérgicos (Teoría permisiva; *Bunney y Davis, 1965; Prange et al., 1974; Shiah y Yatham, 2000; Vawter et al., 2000*).

La clínica del trastorno bipolar se describe conforme a sus fases (*DSM-IV, 1994*). Los síntomas de la fase depresiva son similares a los de la depresión monopolar, salvo que son más característicos la lentitud psicomotriz, la hipersomnía y, en casos extremos, el estupor. La fase maníaca se caracteriza por una elevación del ánimo persistente y anormal (euforia) o irritabilidad acompañada por al menos tres de

los siguientes síntomas: exagerada autoestima, actividad mental acelerada, fuga de ideas, incapacidad de prestar atención, agitación física, insomnio, desinhibición de los impulsos como el despilfarro o el acoso sexual, conductas peligrosas, y a veces, síntomas psicóticos como delirios de grandeza o paranoides.

El riesgo de suicidio es mayor en el periodo de recuperación inmediatamente consecutivo a la depresión, y aumenta con el consumo de alcohol u otras drogas (*Dilsaver et al., 1994; DSM-IV, 1994; Chen y Dilsaver, 1996; Jamison, 2000; Oquendo et al., 2000*). Uno de los factores bioquímicos del suicidio parece ser la disfunción de la serotonina (*Mann et al., 1986, 1989, 1992, 1999, 2001; Arango et al., 1990, 2001; Oquendo et al., 2000; Gurevich et al., 2002*), siendo eficaz para prevenirlo la profilaxis con litio (estabilizador del sistema de la serotonina; *Manji et al., 1995; Manji y Lenox, 1998; Shiah y Yatham, 2000*).

En el tratamiento hay que diferenciar la fase depresiva de la fase maníaca (*DSM-IV, 1994; Nemeroff y Owens, 2002*). En la depresiva se trata como una depresión (comentado más arriba). En la fase maníaca el fármaco de elección es el haloperidol, aunque también pueden utilizarse otros neurolépticos (levomepromazina, triperidol, tioproperazina, clotiapina, clorpromazina, tioridazina). Las sales de litio son efectivas como *terapéutica profiláctica* o estabilizadora del ánimo, pero se suele iniciar su administración durante el episodio maniaco (*DSM-IV, 1994; Manji y Lenox, 1998; Shiah y Yatham, 2000*). También se sugiere como medicación profiláctica alternativa, la administración de fármacos anticonvulsionantes como ácido valproico, la carbamazepina y la gabapentina (*DSM-IV, 1994; Shiah y Yatham, 2000; Mahmood y Silverstone, 2001; Nemeroff y Owens, 2002*). El tratamiento de un episodio maniaco aislado debe continuarse por lo menos durante seis meses. A pesar del arsenal terapéutico disponible, muchos pacientes presentan síntomas residuales (*DSM-IV, 1994; Winokur et al., 1994*).

## ESQUIZOFRENIA

La esquizofrenia es una enfermedad mental grave de tipo psicótico caracterizada por deformación de la personalidad, distorsión del pensamiento, pérdida de contacto con la realidad, sensación de ser dominado por fuerzas extrañas, delirios, percepción perturbada, sentimientos afectivos anormales, autismo y conducta social desorganizada que se mantienen por un periodo de más de seis meses. Sin embargo, la conciencia y la capacidad intelectual se mantienen por lo general intactas (*DSM-IV, 1994*).

Aproximadamente un 1 % de la población general desarrolla esquizofrenia durante su vida, siendo típica su aparición al final de la adolescencia o al comienzo de la edad adulta, manteniéndose a lo largo de toda la vida, y afectando a todos los grupos étnicos y niveles sociales (*Jablensky y Sartorius, 1988*). Por estos motivos, además de por la gravedad clínica, su problemática terapéutica y de rehabilitación y sus posibilidades evolutivas y de pronóstico, la esquizofrenia supone una de las enfermedades con mayor repercusión social.

Aun hoy se desconoce la etiología de esta enfermedad, aunque si se puede establecer que la esquizofrenia es una enfermedad del cerebro. Existen varias hipótesis etiopatogénicas, unas biológicas y otras psicosociales. Entre las concepciones biológicas está la de la predisposición genética sobre la base de una mayor incidencia de la enfermedad en gemelos monocigotos, aunque todavía no se ha llegado a establecer la posible ubicación cromosómica de factores determinantes o de susceptibilidad a la esquizofrenia (*McGuffin et al., 1995; National Institute of Mental Health's Genetics Workgroup, 1999*). Otras hipótesis biológicas abarcan los trastornos de transmetilación (*Osmond y Smythies, 1952*); la hipótesis dopaminérgica, basada en la hiperactividad dopaminérgica mesolímbica debida a una alteración de los receptores DA<sub>1</sub> y DA<sub>2</sub> (*Creese et al., 1976; Seeman et al., 1976; Mackay et al., 1982; Carlsson, 1988; Joyce y Meador-Woodruff, 1997*); la hipótesis noradrenérgica, basándose en la alteración de las neuronas noradrenérgicas que se ha observado en estudios postmortem de algunos pacientes (*Osmond y Smythies, 1952; Stein y Wise, 1971; Wise y Stein, 1973; Hornykiewicz, 1982; Joyce, 1993*); la hipótesis serotoninérgica, reactivada recientemente por la acción antipsicótica atípica de la clozapina, bloqueadora de los receptores 5-HT<sub>2</sub> (*Gaddum, 1953; Gaddum y Hammeed, 1954; Woolley y Shaw, 1954; Bleich et al., 1988; Meltzer, 1995; Kapur y*

*Remington, 1996; Arranz et al., 1998*); la hipótesis de aminoácidos neurotransmisores: glutamato, GABA (ácido gammaaminobutírico; *Carlsson y Carlsson, 1990; Lieberman y Koreen, 1993; Benes, 1995; Olney y Farber, 1995; Meador-Woodruff y Healy, 2000*) la hipótesis de los neuropéptidos:  $\beta$ -endorfina (*Gulya, 1990*), colecistoquininas (*Kerwin et al., 1992; Lieberman y Koreen, 1993; Weinberger, 1997*), neurotensina (*Lieberman y Koreen, 1993; Weinberger, 1997*); la hipótesis viriásica (*Pearce, 2001; Torrey y Yolken, 2001*); y finalmente existen otras hipótesis de carácter inmunológico (*Smith, 1992*) y ontogenético (*Harrison, 1999a*). Entre las hipótesis etiopatogénicas de naturaleza psicosocial nos encontramos la psicogénica, según la cual se debe a dificultades interpersonales en los procesos tempranos del aprendizaje, y las hipótesis sociogénicas que valoran los factores de relación familiares, psicosociales y culturales, entre otros (*Kelly y Murray, 2000*).

Existen seis formas clínicas en la clasificación clásica de la esquizofrenia: paranoide, desorganizada (hebefrenia), catatónica, indiferenciada, simple y residual (*DSM-IV, 1994*). La esquizofrenia paranoide, de aparición tardía y propia de los adultos, se caracteriza por la presencia de ideas delirantes y/o alucinaciones auditivas, con conservación relativa de la capacidad cognoscitiva, la afectividad y el lenguaje. La esquizofrenia desorganizada se suele iniciar en la adolescencia y en adultos jóvenes, caracterizándose por lenguaje y comportamiento desorganizados y afectividad aplanada o inapropiada con curso frecuente hacia un deterioro final. En la esquizofrenia catatónica predominan los síntomas físicos con actitudes de negativismo, que pueden incluir inmovilidad, actividad motora excesiva y adopción de posturas extrañas. En la esquizofrenia indiferenciada se observa una mezcla de síntomas. La esquizofrenia simple suele ser de iniciación temprana, puberal, en principio con gran pobreza de síntomas, pero gradualmente aparecen síntomas negativos. La esquizofrenia residual se caracteriza por manifestaciones continuas de la enfermedad, sin cumplir los criterios de la fase activa. En una misma persona puede haber cambios de un tipo a otro con el paso del tiempo, generalmente de la forma paranoide a la desorganizada o indiferenciada.

Los síntomas de la esquizofrenia están divididos en dos grupos: síntomas positivos (productivos) y síntomas negativos (por déficit; *Andreasen y Flaum, 1991; DSM-IV, 1994*). Los síntomas positivos se dividen a su vez en 1) delirios y alucinaciones y 2) pensamiento desorganizado y, comportamiento extraño. El delirio consiste en una creencia errónea por una mala interpretación de la realidad. Puede haber alucinaciones de cualquier modalidad sensorial (auditivas, olfatorias,

gustatorias o táctiles), aunque las auditivas son con mucho las más frecuentes y características de la esquizofrenia. Los síntomas negativos consisten en aplanamiento afectivo, alogia (pobreza del habla), anhedonia (disminución de la capacidad para experimentar placer) e insociabilidad.

En algunos pacientes con esquizofrenia se presenta una reducción de la capacidad cognitiva, con alteración de la atención, del pensamiento abstracto y de la capacidad para resolver problemas (*Meneses, 1999; Williams et al., 2002*). La gravedad de la afectación cognitiva es uno de los principales factores causantes de la incapacidad global de estos enfermos. Los síntomas de la esquizofrenia típicamente acaban por producir un deterioro funcional en todas las actividades del individuo, interfiriendo notablemente en el trabajo, las relaciones sociales y el cuidado de uno mismo (*DSM-IV, 1994*).

Los criterios establecidos por el DSM-IV (*1994*) para diagnosticar la esquizofrenia son los siguientes: que existan al menos 2 síntomas característicos (Criterio A) durante más de un mes (ideas delirantes, alucinaciones, lenguaje desorganizado, comportamiento catatónico o síntomas negativos; y persistencia de los signos prodrómicos o residuales y alteración de la actividad laboral o social durante un período de 6 meses. Además se deben excluir los trastornos esquizoafectivos o del estado de ánimo, el consumo de sustancias u otras enfermedades intercurrentes, y la presencia de un trastorno generalizado del desarrollo.

Los fármacos antipsicóticos, la rehabilitación, las actividades comunitarias de ayuda y la psicoterapia representan los tres componentes principales del tratamiento. Los antipsicóticos o medicaciones neurolépticas son utilizadas para controlar los síntomas de la enfermedad (*DSM-IV, 1994*). Estos fármacos se dividen en dos grupos principales, clásicos y atípicos. Los neurolépticos clásicos tiene como principales representantes al haloperidol y la clorpromacina, los cuales ejercen su acción a través del bloqueo de los receptores dopaminérgicos postsinápticos, principalmente el tipo DA<sub>2</sub> (*Creese et al., 1976; Seeman et al., 1976; Owen et al., 1978; Mackay et al., 1982; Carlsson y Carlsson, 1990; Deutch et al., 1991; Joyce, 1993; Joyce et al., 1997; Sawa y Snyder, 2002*). Están indicados para controlar los síntomas positivos, pero suelen provocar efectos secundarios extrapiramidales, discinesia tardía o alteraciones de la prolactina (*Harrison, 1999b, 1999c*). Entre los neurolépticos atípicos están la clozapina, la olanzapina, la risperidona y el sertindol, los cuales bloquean tanto los receptores de dopamina como los 5-HT<sub>2</sub> (*Fink et al., 1984; Kane et*

*al., 1988; Lindstrom, 1988; Honigfeld y Patin, 1989; Deutch et al., 1991; Meltzer, 1995; Sawa y Snyder, 2002*). Estos fármacos son eficaces para controlar los síntomas negativos secundarios y producen menos efectos adversos, aunque no todos tienen el mismo perfil de efectos secundarios, así, algunos pueden causar alteraciones metabólicas (olanzapina, diabetes mellitus), hematológicas (clozapina, agranulocitosis) o cardíacas (sertindol, elongación del intervalo QT).

## ANTECEDENTES DEL ESTUDIO DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO EN LAS ENFERMEDADES PSIQUIÁTRICAS.

La neuroquímica cerebral en los trastornos del estado de ánimo afectivo ha sido extensamente explorada. Dos de los principales sistemas de neurotransmisores implicados son el serotoninérgico (*Coppen, 1967; Blier y de Montigny, 1994; Mongeau et al., 1997; López et al., 1998*) y el noradrenérgico (*Schatzberg y Schildkraut, 1995; Mongeau et al., 1997; Manji et al., 2001*). Gran parte de la evidencia de la función de estos neurotransmisores en estas enfermedades deriva de la psicofarmacología (*Nemeroff y Owens, 2002*). La mayoría de los medicamentos que han sido eficaces en el tratamiento de la depresión producen un aumento de la cantidad de 5-HT y NA funcionalmente disponible en las terminales nerviosas (*Nemeroff y Owens, 2002*). El principal mecanismo de acción de la mayoría de ellos es la inhibición de la recaptación presináptica. El bloqueo presináptico de la recaptación de 5-HT da lugar a más 5-HT para estimular los receptores postsinápticos, conduciendo en última instancia a una función más eficaz de la 5-HT a nivel central, aunque de manera no-selectiva respecto a los diversos tipos de receptores 5-HT (*Mongeau et al., 1997*). Otros fármacos antidepresivos del tipo de la nefazodona son más específicos y bloquean fundamentalmente los receptores 5-HT<sub>2</sub>, inhibiendo también la recaptación de 5-HT y de NA (*Mongeau et al., 1997; Kent, 2000; Rosenberg et al., 2000; Nemeroff y Owens, 2002*).

Con respecto a la manía, sus bases biológicas son actualmente mal conocidas (*Vawter et al., 2000; Baumann y Bogerts, 2001; Mahmood y Silverstone, 2001*). Los principales medicamentos utilizados para disminuir los síntomas maníacos son las sales de litio y los neurolépticos (*Manji et al., 1995; Manji y Lenox, 1998; Shiah y Yatham, 2000*). Aunque el mecanismo de acción del litio es incierto, sabemos que los antipsicóticos tienden a antagonizar las acciones de la dopamina y la serotonina (*Shiah y Yatham, 2000; Mahmood y Silverstone, 2001*).

La identificación del substrato neurobiológico de la esquizofrenia es una de las áreas más arduamente investigada actualmente en neurociencias (*Andreasen, 1996; Harrison, 1999a; Sawa y Snyder, 2002*). La diversidad de los síntomas sugiere la posible implicación de diferentes regiones cerebrales corticales y subcorticales (*Weinberger et al., 1988; Weinberger, 1991; Shenton et al., 1992; Joyce, 1993; Andreasen et al., 1994a, 1994b; Selemon et al., 1995*). Los síntomas negativos se han relacionado con la corteza prefrontal (*Andreasen et al., 1994a, 1994b; Goldman-*



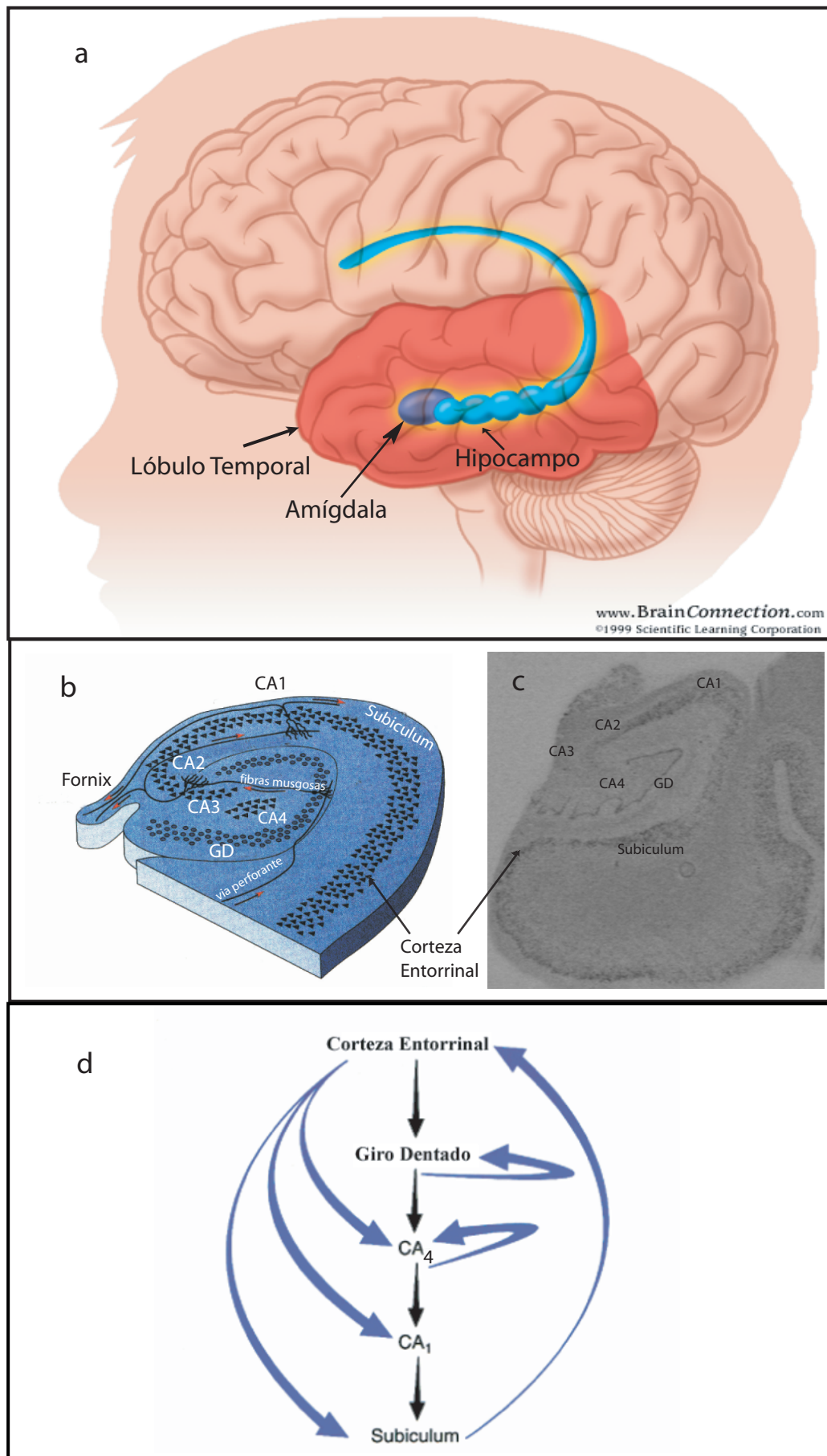
*Rakic, 1994*), mientras que los síntomas positivos se han relacionado con el hipocampo (*Barta et al., 1990; Shenton et al., 1992; Silbersweig et al., 1995; Andreasen, 1996*). Trabajos realizados en los últimos años han contribuido a clarificar su neuroquímica, pero la hipótesis dopaminérgica continúa siendo la teoría más apoyada (*Creese et al., 1976; Seeman et al., 1976; Carlsson, 1988*), aunque es sin duda una simplificación del problema real. La teoría dopaminérgica sugiere que los síntomas de la esquizofrenia son debidos a un exceso funcional de dopamina en determinadas regiones cerebrales (regiones límbicas, regiones del lenguaje; *Seeman et al., 1984, Crawley et al., 1986; Joyce et al., 1997*). La evidencia que apoya la hipótesis dopaminérgica deriva principalmente de estudios sobre la acción de los neurolépticos, cuya eficacia terapéutica se debe a la habilidad para bloquear el receptor dopaminérgico tipo 2 (*Creese et al., 1976; Seeman et al., 1976; Owen et al., 1978; Mackay et al., 1982; Carlsson y Carlsson, 1990; Deutch et al., 1991; Joyce, 1993; Joyce et al., 1997*). Aunque estudios recientes con nuevos neurolépticos del tipo de la clozapina o la risperidona, llamados “atípicos”, han advertido su capacidad de bloquear los receptores DA<sub>2</sub> y sobre todo los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2A</sub>, logrando mejorar los síntomas negativos de los pacientes esquizofrénicos (*Fink et al., 1984; Kane et al., 1988; Lindstrom, 1988; Honigfeld y Patin, 1989; Deutch et al., 1991; Sawa y Snyder, 2002*). La implicación del sistema serotoninérgico en la fisiopatología de la esquizofrenia se sugirió inicialmente en los años cincuenta dado que algunas drogas alucinógenas, como el LSD y la dimetiltriptamina (DMT), se parecían estructuralmente a la serotonina e interaccionaban con los receptores 5-HT (*Gaddum, 1953; Wolley y Shaw, 1954; Gaddum y Hammeed, 1954*).

## ÁREAS ANATÓMICAS DE INTERES

### HIPOCAMPO

El hipocampo es un centro incluido en el sistema límbico con citoarquitectura de arquicórtex situado en la superficie medial del lóbulo temporal, formando un arco en el suelo y pared medial del asta inferior del ventrículo lateral. (**Figura 2.a.**) Tiene una longitud de unos cinco centímetros desde su extremo anterior en la amígdala hasta su extremo posterior afilado cerca del rodete del cuerpo calloso. El término formación hipocampal es a veces usado como sinónimo de hipocampo o asta de Ammon (cornu ammonis, CA; *Carpenter y Sutin, 1983*), sin embargo la tendencia general es a usar el término formación hipocampal en un sentido más amplio, en relación con sus constituyentes en etapas embrionarias, que incluye al la circunvolución dentada (giro dentado, GD) y subiculum, o incluso a la corteza entorrinal (*Amaral e Insausti, 1990*). Por otro lado, desde un punto de vista topográfico, citoarquitectónico, hodológico y funcional, el giro dentado está estrechamente relacionado con el asta de Ammon, por lo que nosotros, de acuerdo con otros autores (*Carpenter y Sutin, 1983; Amaral e Insausti, 1990; Bear et al., 1996*) consideraremos en nuestro estudio ambas estructuras. En cortes transversales la circunvolución dentada y el asta de Ammon están entrelazadas. El subiculum es una zona de transición desde el asta de Ammon a la corteza entorrinal de la circunvolución parahipocámpica. (**Figura 2.b-c.**)

El asta de Ammon y la circunvolución dentada tienen tres capas, una molecular superficial, una polimórfica profunda y entre ellas, la capa de células granulosas en la circunvolución dentada y la capa de células piramidales en el asta de Ammon. El asta de Ammon se divide en cuatro áreas CA1, CA2, CA3 y CA4 (*Lorente de Nó, 1934*), cada una con diferencias morfológicas en sus células piramidales. En el subiculum se observa la transición citoarquitectónica progresiva entre el área CA1 del asta de Ammon (con tres capas) y la circunvolución parahipocámpica (con seis capas). El alveus es el equivalente a la sustancia blanca subcortical del isocórtex, está inmediatamente por debajo del revestimiento ependimario del ventrículo lateral y contiene fibras aferentes y eferentes del hipocampo que se unen en el borde de la cisura coroidea formando un haz llamado fimbria del hipocampo, que a su vez se continúa con el fornix.



**Figura 2.** El hipocampo. **(a)** El hipocampo está situado en la superficie medial del lóbulo temporal y junto con la amígdala, en su extremo anterior, está incluido en el sistema límbico. **(b)** Microcircuitos de la formación hipocampal, modificación de Bear et al., 1996. **(c)** Imagen digitalizada de hibridación *in situ* del hipocampo, donde se aprecia las diferentes áreas del asta de Ammon (CA), el giro dentado (GD), el subiculum y la corteza entorrinal. **(d)** Rutas de las conexiones entre las diferentes regiones del hipocampo.

Las interconexiones de la formación hipocampal son numerosas y complejas, tanto corticales como subcorticales (*Amaral e Insausti, 1990; Mongeau et al., 1997*). Las aferencias de distintas áreas cerebrales terminan a diferentes niveles de las dendritas apicales de las células piramidales hipocampales, en las células granulares del giro dentado, en el subiculum y en la corteza entorrinal. Las neuronas de la circunvolución dentada proyectan fundamentalmente a células piramidales de CA4, cuyos axones colaterales proyectan a las células piramidales de CA1. Las células piramidales de CA1, a su vez, proyectan sobre el subiculum. Las eferencias de la formación hipocampal son tanto subcorticales como corticales. Las subcorticales se originan del asta de Ammon y del subiculum y a través del fornix llegan al septum, banda diagonal, hipotálamo posterior, tálamo anterior, etc. Las eferencias corticales se inician en la corteza entorrinal y el subiculum y son mayoritariamente recíprocas, es decir llegan a áreas corticales que proyectan a la formación hipocampal: circunvolución parahipocampal, corteza cingular, polo temporal, corteza fronto-orbitaria, corteza prefrontal, etc. (*Amaral e Insausti, 1990; Zilles, 1990; Joyce, 1993*).

**(Figura 2.d.)**

El hipocampo ha sido relacionado con el control emocional, el aprendizaje y la memoria, además de la regulación de la función hipotalámica (*Herman et al., 1989; Meneses, 1999*). Así, se ha visto que la extirpación de las partes mediales de los lóbulos temporales produce un gran déficit de memoria. Estos pacientes son incapaces de recordar nuevos hechos, pero los recuerdos del pasado quedan intactos. Además, tanto en base a su extensa conectividad como a hallazgos anatómo-patológicos, el hipocampo ha sido implicado en diferentes enfermedades neurológicas y psiquiátricas, incluyendo la epilepsia, Alzheimer, depresión y esquizofrenia (*Weinberger, 1991; Shenton et al., 1992; Andreasen et al., 1994a,1994b; Selemon et al., 1995; Mongeau et al., 1997*).

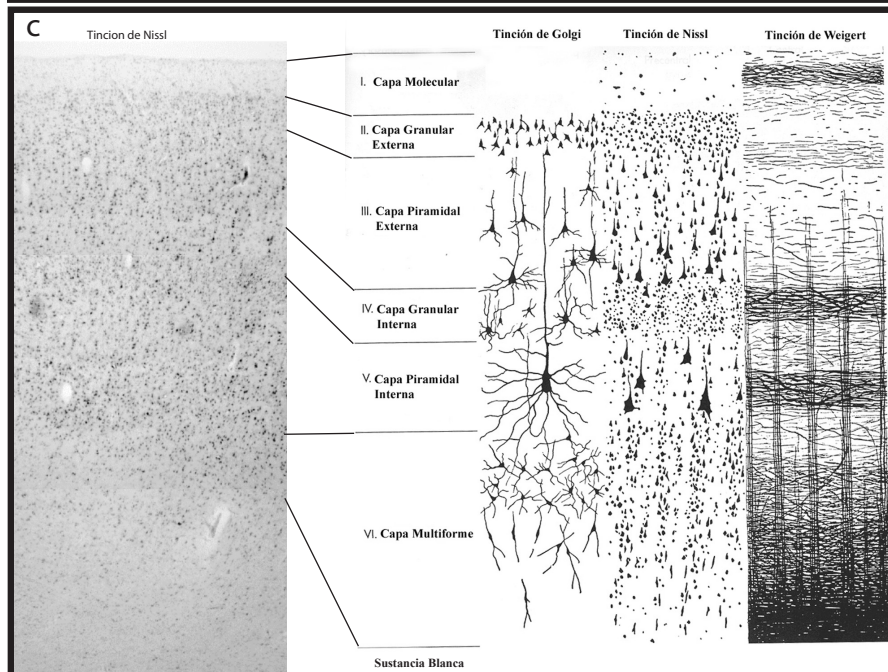
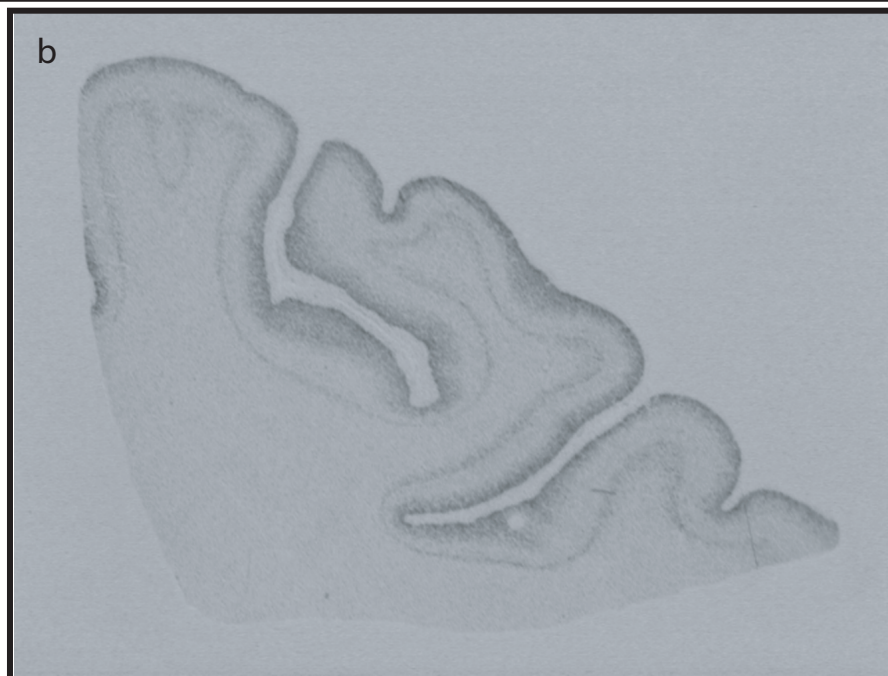
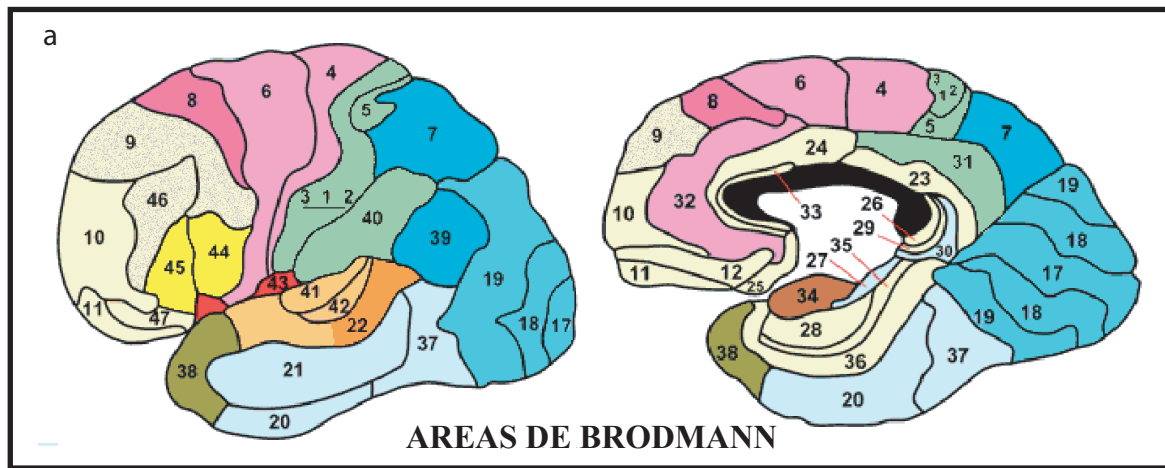
## **CORTEZA PREFRONTAL**

La corteza prefrontal es la región del lóbulo frontal que se localiza por delante de las áreas premotoras y motora suplementaria. La corteza prefrontal dorsolateral es la porción de la convexidad de la corteza prefrontal lateral donde se encuentran las áreas 8, 9, 10 y 46 (*Brodmann, 1909*). **(Figura 3.a.)** Citoarquitectónicamente tiene una estructura isocortical (seis capas) caracterizada por una capa granular interna (capa IV) bien marcada. **(Figura 3.b-c.)** La corteza prefrontal recibe fibras aferentes

desde otras áreas corticales y numerosas estructuras del diencefalo y mesencefalo, incluyendo centros límbicos. Además, muchas de estas conexiones son recíprocas (*Porrino y Goldman-Rakic, 1982; Takeuchi y Sano, 1983; Weinberger et al., 1988; Albin et al., 1989; Zilles, 1990; Joyce, 1993; Smiley y Goldman-Rakic, 1996; Rajkowska, 2000*).

La corteza prefrontal es una de las cortezas de asociación multimodal del cerebro humano. Por lo tanto, es importante en aptitudes intelectuales como la motivación, la resolución de problemas, el juicio, la atención, la memoria, la planificación y la elección apropiada de respuestas en situaciones sociales y de la vida. Es un área envuelta en la inhibición de la conducta y la expresividad de las emociones (*Goldman-Rakic, 1987; Andreasen et al., 1994a, 1994b; McCarthy et al., 1994, 1996; Williams et al., 2002*).

Las lesiones de la corteza prefrontal producidas por enfermedades o por traumatismos han facilitado nuestro entendimiento de las funciones de esta corteza. El estudio de los trastornos de la corteza prefrontal tiene un antecedente histórico reseñable en el caso del obrero Phineas Gage, que sobrevivió a una lesión masiva de la corteza prefrontal a mediados del siglo diecinueve y del cual existe bibliografía relatando los cambios de conducta que desarrolló después del accidente (*Harlow, 1848; Damasio et al., 1994*). A partir de estas observaciones se comenzaron a tratar ciertas enfermedades (depresiones graves) mediante la extirpación de porciones de la corteza prefrontal. Los pacientes con lesiones en estas áreas están incapacitados para iniciar o realizar acciones deliberadas, así como de conseguir el objetivo de esas acciones (deterioro de la capacidad de concentración, distracción fácil, pérdida de la iniciativa, apatía, incapacidad de tomar decisiones). Estas lesiones están comúnmente asociadas con el desarrollo de conductas depresivas o agresivas, con euforia o irritabilidad. La desinhibición de ciertas conductas pueriles o sexuales también puede ser el resultado de una lesión en la CPF, sugiriendo que esta región tiene una función inhibitoria. La disfunción de la CPF puede ser el resultado de lesiones de aferentes subcorticales, incluyendo las fibras serotoninérgicas, resultando en una entrada reducida de serotonina en la corteza (*Weinberger et al., 1988; Shenton et al., 1992; Andreasen et al., 1994a, 1994b; Goldman-Rakic, 1994; Selemon et al., 1995*).



**Figura 3.** Corteza Prefrontal. **(a)** División citoarquitectónica de la corteza cerebral según K. Brodmann (1909). **(b)** Imagen digitalizada de hibridación *in situ* de la corteza prefrontal (CPF) dorsolateral. **(c)** División laminar de la corteza prefrontal humana. Imagen digitalizada de tinción con Nissl en la CPF. Esquema clásico de tres tinciones diferentes de la corteza prefrontal (Golgi, Nissl y Weigert).

## ESTUDIOS PREVIOS EN TEJIDO CEREBRAL POSTMORTEM SOBRE RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS EN ENFERMEDADES PSIQUIÁTRICAS.

La mayoría de los estudios postmortem de los receptores de serotonina en el HC o la CPF de enfermos psiquiátricos y, se han concentrado en los cambios de la unión a receptor proteicos (*Hashimoto et al., 1991; Joyce et al., 1993; Laruelle et al., 1993; Dean y Hayes, 1996; Dean et al., 1998, 1999, 2001; Barnes y Sharp, 1999*), existiendo en la actualidad solo dos trabajos sobre cambios en la expresión genética del ARNm (*Burnet et al., 1996; López et al., 1998*). A partir de estos estudios, nuestro conocimiento sobre el papel de los receptores 5-HT en estos trastornos psiquiátricos sigue siendo ambiguo. Esto puede deberse por un lado, al reciente descubrimiento de nuevos subtipos de receptores de 5-HT (*Barnes y Sharp, 1999*), ya que al realizarse los estudios con ligandos, muchos de estos receptores no habían sido caracterizados, y para muchos de ellos aún no disponemos de ligandos específicos. Además, los resultados obtenidos son a veces incongruentes. Por ejemplo, en la CPF de pacientes esquizofrénicos, unos estudios han encontrado un incremento de sitios de unión a receptores 5-HT<sub>1A</sub> (*Hashimoto et al., 1991; Burnet et al., 1996*), mientras otros no han encontrado ninguna diferencia (*Joyce et al., 1993; Dean et al., 1999*). Es interesante que mientras Burnet y colaboradores (*1996*) encontraron cambios en la unión al receptor 5-HT<sub>1A</sub>, en el mismo estudio no encontraron ninguna alteración en los niveles de expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub>. Con respecto al receptor 5-HT<sub>2A</sub>, los hallazgos son más homogéneos, con la excepción del estudio de Joyce y colaboradores (*1993*), coincidiendo en la existencia de una disminución de los sitios de unión en diferentes zonas de la CPF (*Laruelle et al., 1993; Dean y Hayes, 1996; Dean et al., 1998, 1999*). Por otro lado, en la DM se ha descrito una disminución de los niveles de ARNm de 5-HT<sub>1A</sub> en el HC y en víctimas de suicidio (*Mann et al., 1986; Arango et al., 1990*) un aumento de unión al receptor 5-HT<sub>2A</sub> en la CPF, aunque estos hallazgos difieren de otros estudios que no encuentran cambios (*Arranz et al., 1994; Stockmeier et al., 1997*). Con respecto a la enfermedad bipolar, los estudios son muy escasos (*Dean et al., 2001*), probablemente debido al limitado número de cerebros postmortem disponibles de pacientes con esta enfermedad. Por lo que ha habido una tendencia a extrapolar los hallazgos en depresión mayor al trastorno bipolar (*Mann et al., 1986; Arango et al., 1990*).

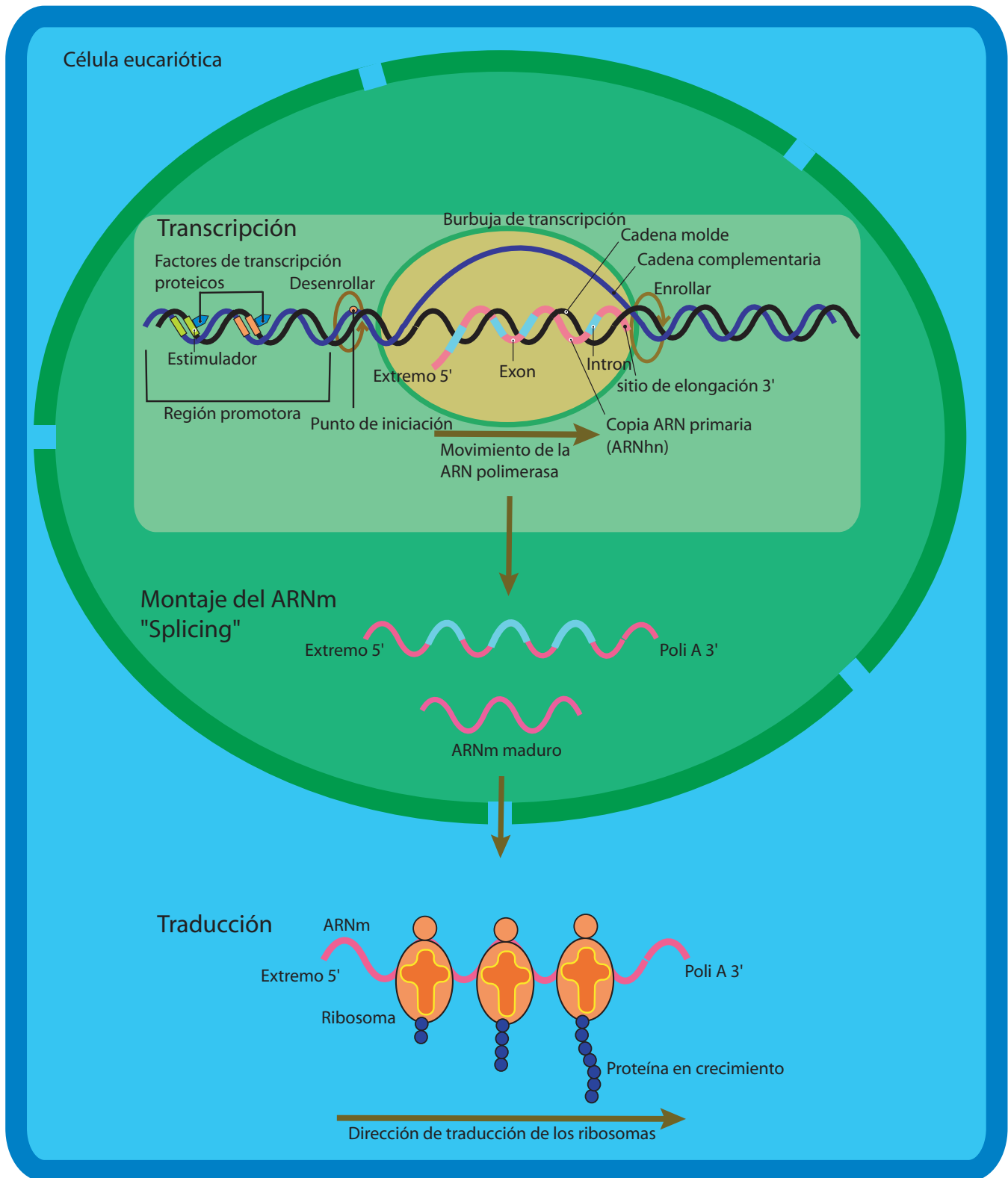
## HIBRIDACIÓN *IN SITU*

A lo largo de las últimas tres décadas, la caracterización molecular del sistema nervioso central ha ido avanzando progresivamente. Una parte de este progreso ha sido resultado del desarrollo de técnicas que han permitido la visualización de sustancias neuroactivas específicas a un nivel celular. Entre los nuevos métodos esenciales para el mapeo cerebral está la técnica de la hibridación *in situ* (HIS) para la localización anatómica y cuantificación de ARNm. Este método aprovecha la formación bidireccional del ADN y del ARN, permitiendo la formación de híbridos entre las moléculas de ARN en el interior del contexto anatómico original y las sondas de secuencia complementaria de nucleótidos marcadas en el laboratorio (*Gall y Pardue, 1969; John et al., 1969; Pochet et al., 1981*). El resultado es una nueva ventana en el cerebro, mostrando una perspectiva de la maquinaria de la síntesis proteica en las células cerebrales, dado que existe una sola molécula de ARNm por cada polipéptido sintetizado por una neurona. **(Figura 4.)**

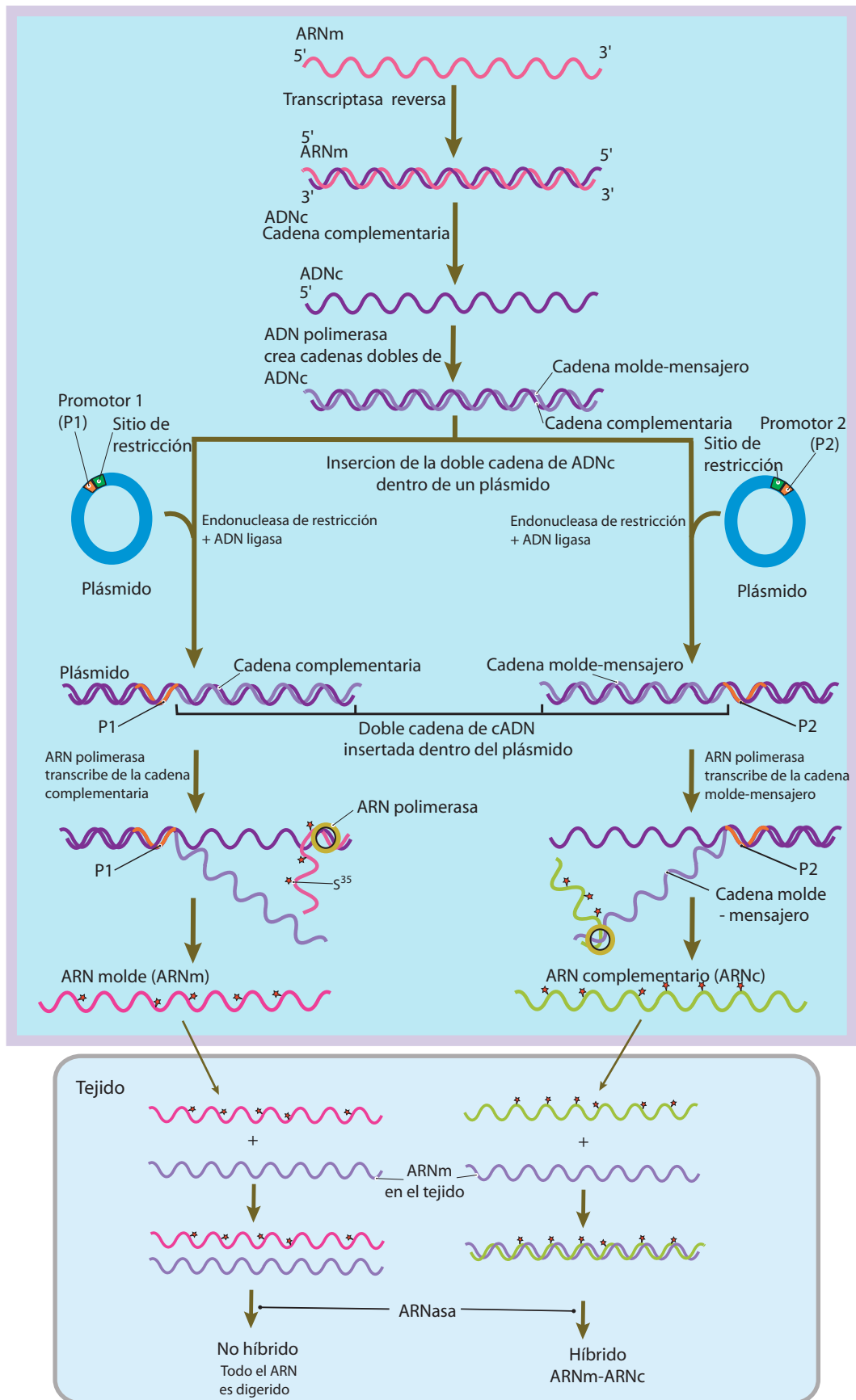
La hibridación *in situ* es, como su nombre sugiere, un método de localización de ARNm dentro del citoplasma de la célula, mediante la hibridación de la secuencia de interés a una cadena complementaria de una sonda de nucleótidos. Estas sondas pueden ser tan pequeñas como 20 a 40 pares de bases o tan grandes como hasta 1000 pares. La sensibilidad de la técnica es tal que el umbral de detección es de 10 a 20 copias de ARNm o ADN por célula.

Existen esencialmente cuatro tipos de sondas: sondas de oligonucleótidos, sondas de ARN o ribosondas, sondas de ADN de cadena simple y de cadena doble. En este estudio hicimos uso de ribosondas, con un tamaño medio de 500 a 900 pares de bases, porque tienen la ventaja de que los híbridos del ARN-ARN son muy termoestables y son resistentes a la digestión por ARNasas. Dichas sondas fueron marcadas con S<sup>35</sup> por su alta actividad y la posibilidad de detectar bajos niveles de expresión. **(Figura 5.)**





**Figura 4.** Síntesis del ARNm y de la proteína. La transcripción del ADN para sintetizar ARN mensajero (ARNm) se inicia cuando la ARN polimerasa se une a un complejo de factores de iniciación, un conjunto especializado de factores de transcripción unidos al ADN dentro de la región promotora. El complejo de la ARN polimerasa forma una burbuja de transcripción la cual se mueve a lo largo la cadena molde de ADN para sintetizar un transcrito primario, también denominado ARN heterogéneo (ARNhn). La unión de factores de transcripción proteicos a secuencias potenciadoras o inhibidoras determina la cantidad de ARN sintetizado. El montaje o "splicing" del ARNhn produce ARNm maduro. Los complejos ARN/proteína extraen los segmentos codificados por intrones y unen los segmentos codificados por exones para producir ARNm. La traducción de ARNm produce proteínas. Los ribosomas leen el código del ARNm y añaden aminoácidos (mediante ARN de transferencia, ARNt) a la cadena proteica en crecimiento.



**Figura 5.** Síntesis e hibridación de una sonda de ARN complementario (ARNc). La cadena doble de ADN complementario (ADNc) es sintetizada a partir de ARNm. La doble cadena de ADNc es insertada dentro de un plásmido unido a un promotor de la ARN polimerasa de un bacteriófago (promotor 1 o 2) para así transcribir la cadena complementaria de ADN en cadena molde de ARN (idéntica a la cadena original de ARNm), o transcribir la cadena molde de ADN en ARN complementario (ARNc, complementario al ARNm original). En la síntesis de cada una de las cadenas se añade nucleótidos marcados con azufre [35] para la detección del ARNm mediante la técnica de hibridación *in situ*. Posteriormente, si se añade las cadenas molde de ARN marcado sobre un tejido a estudio no se producirá hibridación, mientras que si se añade ARNc marcado, sí habrá hibridación con el ARNm y se observará marcaje sobre una película autoradiográfica.

## **PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**

A partir de los antecedentes expuestos, nos hemos propuesto contribuir al mejor conocimiento de la neurobiología de las enfermedades psiquiátricas y concretamente al papel del sistema serotoninérgico en la depresión mayor, trastorno bipolar y esquizofrenia.

Nuestra **HIPOTESIS** de trabajo parte de que el sistema serotoninérgico desempeña un papel relevante en la fisiopatología de los trastornos del estado del ánimo afectivo y la esquizofrenia que se pueden detectar a nivel transcripcional en los distintos subtipos de receptores de serotonina.

El **OBJETIVO** fundamental ha sido realizar un análisis comparativo de la expresión diferencial del ARNm de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> y de 5-HT<sub>2A</sub> en los cerebros de los pacientes afectados con depresión mayor, trastorno bipolar y esquizofrenia entre si y con respecto a un grupo de sujetos controles.

Este Objetivo fundamental lo hemos dividido en dos objetivos parciales:

- I. Investigar la distribución y densidad del ARNm de estos receptores relevantes en el sistema serotoninérgico según la patología que sufran los pacientes en diferentes áreas del hipocampo y en la corteza prefrontal dorsolateral.
- II. Comparar su nivel de expresión entre todos los grupos para hallar las posibles diferencias que existan entre las patologías y el grupo control.

La **METODOLOGÍA** principal que hemos utilizado es la técnica histoquímica de la hibridación *in situ* con sondas marcadas radiactivamente de los tres receptores de serotonina en la corteza prefrontal dorsolateral y el hipocampo. Esta técnica nos permitirá poner de manifiesto la demarcación anatómica de posibles cambios (densidad y distribución) en la expresión genética de estos receptores.

El **INTERES** del estudio.

La comparación de la expresión de genes entre los tejidos normales y los enfermos va a permitir:

- I. Un mejor conocimiento a nivel molecular y anatómico de los genes implicados. Concretamente en el trastorno bipolar donde la escasez de datos referentes a la base fisiopatológica son realmente escasos.

- II. Caracterizar molecularmente factores diferenciadores característicos de cada enfermedad.
- III. Ampliar el conocimiento del receptor serotoninérgico 5-HT<sub>1B</sub> post-sináptico y su posible contribución en la fisiopatología de las enfermedades psiquiátricas en estudio.
- IV. Contribuir a la búsqueda de tratamientos más eficaces en la prevención y control de estas enfermedades.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

## SUJETOS

Hemos utilizado un total de sesenta cerebros procedentes de la Stanley Foundation Neuropathology Consortium. Los cerebros estaban divididos en cuatro grupos de 15 sujetos cada uno con diagnóstico de esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión mayor sin rasgos psicóticos y un grupo de control (sin antecedentes de enfermedad psiquiátrica o neurológica) respectivamente.

Las muestras se emparejaron por edad, género, origen étnico, lado del cerebro, intervalo postmortem (IPM) y pH del cerebro en el momento de la autopsia. **(Tabla 1.)** Todos los sujetos tenían edades por debajo de los 65 años para evitar la comorbilidad de un mayor número de enfermedades neurológicas. Las características demográficas y clínicas para cada sujeto fueron determinadas exhaustivamente a través de los historiales clínicos de los pacientes y mediante entrevistas con los familiares, de donde se obtuvo información sobre la fecha de nacimiento, nivel educacional, historia laboral, historia familiar de enfermedades psiquiátricas graves, hospitalizaciones psiquiátricas, medicación en el momento del fallecimiento, consumo de alcohol o drogas y una estimación del conocimiento que tenía el paciente sobre su propia enfermedad. **(Tabla 2.)** Esta información se recogió en una base de datos a partir de la cual dos psiquiatras experimentados e independientes establecen el diagnóstico de cada sujeto de acuerdo con el DSM-IV (1994).

En cada cerebro, los dos hemisferios fueron separados. Uno de ellos fue fijado en formalina (10%), mientras que el otro se cortó en secciones coronales de 1,5 cm y congelado en una mezcla de isopentano y hielo seco. Ambos hemisferios fueron alternativamente separados al azar para dichos procedimientos. En este momento del procesamiento, los cerebros fueron estudiados histopatológicamente para descartar la presencia de la enfermedad de Alzheimer u otras patologías cerebrales y verificar la calidad del ARNm. Se pudo establecer que el mejor predictor de la calidad del ARNm es el pH, como medida del estado agónico del paciente en el momento de la muerte, y no el IPM, como es costumbre en la literatura. Para una descripción detallada de la selección de sujetos, de los métodos diagnósticos y el manejo del tejido seguido por la Stanley Foundation ver Torrey y colaboradores (2000).

	<b>Control</b>	<b>Depresión Mayor</b>	<b>Trastorno Bipolar</b>	<b>Esquizofrenia</b>
<b>Edad</b>	48.1 (29-68)	46.4 (30-65)	42.3 (25-61)	44.2 (25-62)
<b>Sexo</b>	9H, 6M	9H, 6M	9H, 6M	9H, 6M
<b>Raza</b>	14C, 1AA	15C	14C, 1AA	13C, 2A
<b>IPM (h)</b>	23.7 (8-42)	27.5 (7-47)	32.5 (13-62)	33.7 (12-61)
<b>Calidad ARNm</b>	12A, 2B, 1C	11A, 2B, 2C	13A, 2B	10A, 2B, 3C
<b>pH</b>	6.3 (5.8-6.6)	6.2 (5.6-6.5)	6.2 (5.8-6.5)	6.1 (5.8-6.6)
<b>Lado cerebral</b>	7D, 8I	6D, 9I	8D, 7I	6D, 9I

**Tabla 1.** Características de las muestras de los pacientes del Consorcio Neuropatológico de la Fundación Stanley. Abreviaturas: IPM = intervalo postmortem; H = hombre; M = mujer; C = caucásico; AA = afroamericano; A = excelente; B = bueno; C = aceptable; D = derecho; I = izquierdo.

	<b>Control</b>	<b>Depresión Mayor</b>	<b>Trastorno Bipolar</b>	<b>Esquizofrenia</b>
<b>Causa de la muerte</b>				
<b>Suicida</b>	0	7	8	4
<b>Cardiopulmonar</b>	13	7	4	8
<b>Accidente</b>	2	0	1	2
<b>Historia de psicosis</b>	0	0	11	15
<b>Exposición a antipsicóticos</b>	0	0	12	14
<b>Abuso o dependencia a alcohol/ drogas actual</b>	0	3	4	3
<b>Abuso o dependencia a alcohol/ drogas pasado</b>	2	1	3	3
<b>Exposición a Antidepresivos</b>	0	9	8	4

**Tabla 2.** Características clínicas de los pacientes del Consorcio Neuropatológico de la Fundación Stanley.



Los cerebros congelados en fresco fueron seccionados frontalmente (14µm) con un criostato, montados sobre portaobjetos y almacenados a -80°C hasta el momento de su estudio. Las áreas estudiadas fueron la corteza prefrontal dorsolateral y el lóbulo temporal medial, el cual contiene el hipocampo. Todos los grupos diagnósticos fueron tratados simultáneamente para cada sonda en secciones del mismo área anatómica. Todos los experimentos de hibridación *in situ* y el análisis de imagen fueron realizados sin conocer al diagnóstico de los sujetos.

### HIBRIDACIÓN *IN SITU*

#### Síntesis de las ribosondas marcadas con <sup>35</sup>S

Las hibridaciones con 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> fueron realizadas usando sondas humanas específicas de ARN complementario (ARNc). (**Tabla 3.**) El ADNc 5-HT<sub>1A</sub> (National Center for Biotechnology GenBank número de acceso: M83181, región codificante de nucleótidos: 948-1691) fue generosamente donado por Dr. Robert J. Lefkowitz (Duke University Medical Center, Durham, North Carolina; *Fargin et al., 1988; Burnet et al., 1995*), el de 5-HT<sub>1B</sub> (D10995, 865-1390) por Dr. Brian F O'Dowd (University of Toronto, Ontario, Canada; *Jin et al., 1992*), y el de 5-HT<sub>2A</sub> [XM 007123, 300 pares de bases (PB), región no transcribible (UTR) 5' + 1-575] por Dr. Mark W. Hamblin (University of Washington, WA, USA). Estas sondas no tienen regiones con homología significativa con otros receptores asociados a proteínas G o con ningún gen que aparezca en la genoteca "GenBank".

Plásmido	Especie	Numero de acceso Gen Bank	Tamaño del inserto ARNc	Localización del inserto	Vector	Enzimas para la Linearización/ Transcripción Cadena Complementaria	Enzimas para la Linearización/ Transcripción Cadena Molde
5-HT <sub>1A</sub>	Humano	M83181	743	948-1691	PGEM3Z	HIND3 / T7	BAMH1 / SP6
5-HT <sub>1B</sub>	Humano	D10995	525	865-1390	BSSK	XHO1 / T3	SST1 / T7
5-HT <sub>2A</sub>	Humano	XM_007123	875	300PB 5'UTR + 1-575	BSSK	ECOR1 / T7	HIND3 / T3

**Tabla 3.** Características moleculares de los receptores de serotonina.

Las ribosondas fueron generadas mediante la incubación de plásmidos linearizados durante 2 horas a 37°C en una solución compuesta por: 5x solución tampón de transcripción, [<sup>35</sup>S] UTP y [<sup>35</sup>S] CTP, 150 μM ATP y GTP, 12.5 mM ditioneitol (DTT), 20 unidades (U) de inhibidor de ARNasa, 6 U de la correspondiente polimerasa de ARN (T3 o T7 según la sonda). Al final de la reacción de transcripción se le añadió 1 μl de ADNasa I durante 15 minutos a temperatura ambiental para eliminar el plásmido de ADN. La sonda ARNc marcada fue entonces purificada de los nucleótidos libres usando una columna de gel de Sephadex G50/50 equilibrada en una solución tampón de Tris (100 mM Tris-HCl, 12.5 mM EDTA, pH 8.0, 150mM NaCl, y 0.2% SDS). Finalmente, se añadió DTT a una concentración 0.01 M. El marcaje con <sup>35</sup>S ha sido ampliamente usado en biología molecular, es más sensible que otros tipos de marcaje de adquisición más reciente y permite la visualización relativamente rápida (en comparación con otras sondas radiactivas) y específica de la señal de hibridación.

La técnica de hibridación *in situ* usada en estos experimentos ha sido descrita en detalle previamente (Watson *et al.*, 1988; López-Figueroa *et al.*, 2000; Norton *et al.*, 2002). Las secciones de cerebro se montaron en portaobjetos y se conservaron a –80°C hasta su procesamiento. Se utilizaron tres secciones de cada área por sujeto. Tras fijarlas por inmersión en paraformaldehído 4% durante una hora, se lavaron dos veces en 2x citrato salino estándar (standard saline citrate –SSC; 0.3 mmol/L NaCl, 0.03 mmol/L citrato sódico, pH 7.2), donde los cationes monovalentes interactúan principalmente con los grupos fosfatos de los ácidos nucleicos, disminuyendo las interacciones electrostáticas entre las dos cadenas. Seguidamente fueron incubadas en una solución de anhídrido acético (0.25%) en trietanolamina (0.1 M, pH 8) durante 10 minutos a temperatura ambiental para lograr acetilar los grupos amino en el tejido y así reducir la unión electrostática de las sondas a la sección.

Las secciones fueron aclaradas en agua destilada y deshidratadas a través de gradientes de alcohol de forma creciente. Las secciones fueron secadas al aire, y cubiertas con la sonda ARNc marcada con [<sup>35</sup>S] disuelta en un tampón de hibridación (50% formamida [reduce la estabilidad térmica de los enlaces, permitiendo que la hibridación ocurra a una menor temperatura], 10% sulfato dextrano, 3x SSC, 50 mM tampón fosfato sódico pH 7.4, 1× solución de Denhardt, 0.1 mg/ml ARNt de levadura y 10 mM ditioneitol) produciendo una concentración final de 3x10<sup>6</sup> dpm (desintegraciones por minuto) / 220 μl. Las secciones fueron puestas en una caja

sellada y con papel de filtro saturado con 50% solución tampón de formamida durante una noche en una incubadora a 55°C.

El día siguiente, se lavaron las secciones con concentraciones decrecientes de sales para eliminar las sondas no hibridadas y reducir el ruido de fondo. Las cubiertas de vidrio fueron retiradas y las secciones fueron enjuagadas dos veces en 2x SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente, incubadas durante 1 hora en ARNasa A (200 µg/ml en tampón Tris 10 mM, que contiene 0.5 M NaCl, pH 8.0) a 37°C. Posteriormente fueron lavadas en soluciones de SSC con gradientes de concentración decrecientes, 2x, 1x y 0.5x, seguido de un lavado de 1 hora en 0.1x SSC a 65°C. Después de enjuagar en agua destilada, las secciones fueron deshidratadas usando gradientes crecientes de alcohol, secadas al aire y expuestas a una película autoradiográfica Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) por al menos cuatro semanas.

Los estudios de control de la hibridación *in situ* se realizaron pretratando el tejido con ARNasa A (200 µg/ml) durante 1 hora previa a la hibridación, o utilizando ribosondas molde sintetizadas a partir del mismo inserto de plásmido. La señal observada en ambos casos no se diferenció del ruido de fondo.

Para evitar variaciones en la intensidad de la señal debidas a diferencias individuales en el protocolo de hibridación, las muestras correspondientes a cada área anatómica de los 60 sujetos fueron procesadas simultáneamente para cada sonda. Tanto el procesamiento como el análisis de imagen fueron realizados sin conocer el diagnóstico de los sujetos.

## ANÁLISIS DE IMAGEN

Se realizó un análisis densitométrico semicuantitativo de los autoradiogramas usando el sistema de análisis de imágenes MCID (Microcomputer Imaging Device; Imaging Research Inc., Ontario, Canadá) tras capturar las imágenes con una cámara CCD (TM-745, Pulnix, USA). Las imágenes fueron digitalizadas bajo un tiempo de exposición, ganancia y compensación constantes.

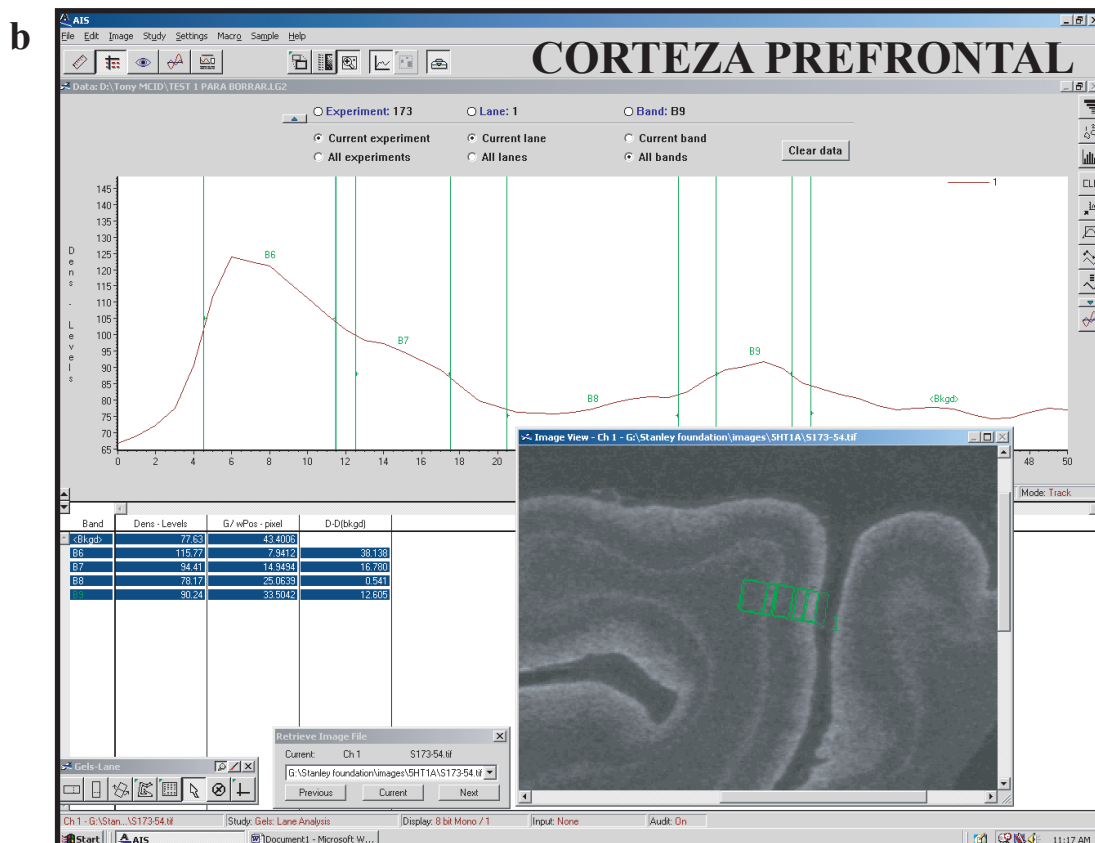
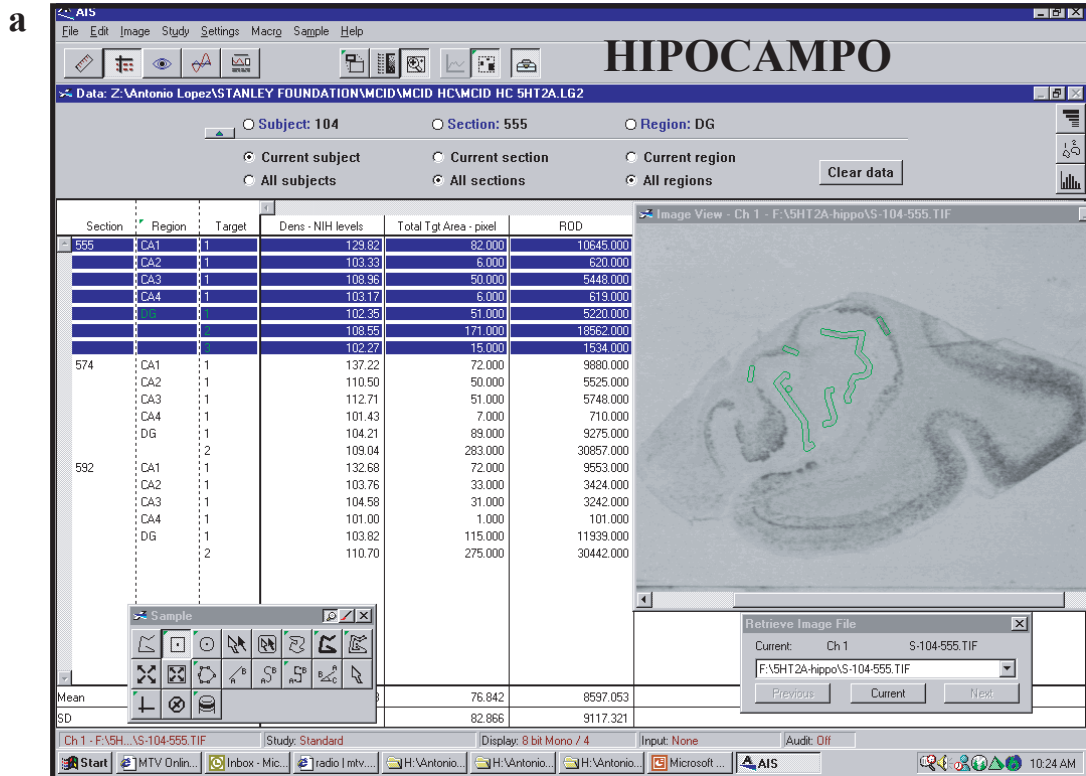
Las regiones hipocampales analizadas en este estudio fueron el asta de Ammon (CA1, CA2, CA4) y el giro dentado. Las regiones fueron identificadas según

patrones morfológicos macroscópicos y microscópicos. No fue posible realizar una identificación precisa de la región CA3 en todos los sujetos del estudio, por lo que se excluyó en el análisis estadístico ulterior. Debemos matizar que no todas las muestras correspondían al mismo nivel antero-posterior del lóbulo temporal, por lo que la extensión de cada una de las regiones hipocampales variaba ligeramente de unos sujetos a otros. Los valores numéricos individuales de intensidad de señal vienen dados por el producto  $DOI \times A$ , donde DOI es la densidad óptica integrada (intensidad óptica media de la señal) y A es el área de la señal por encima de la señal de fondo. En el hipocampo, el ruido de fondo está calculado como la media de todos los píxeles con la mínima densidad óptica dentro de un área carente de señal. La señal está definida como 3.5x desviaciones estándares por encima del ruido de fondo. **(Figura 6.a.)**

En el análisis de la corteza prefrontal dorsolateral, para evitar la inclusión de áreas marginales, se tomaron muestras de la circunvolución frontal media y de ambos labios de la cisura frontal superior (áreas 9 y 46 de Brodmann) y se diseñó un sistema compartimental de bandas densitométricas entre la superficie pial y la sustancia blanca, independiente para cada sonda y utilizando las herramientas del programa MCID. **(Figura 6.b.)** El patrón de bandas de cada sonda se estableció colocando una plantilla estándar sobre la corteza y determinando, por análisis visual y computarizado, el patrón básico de distribución de marcaje. Para 5-HT<sub>1A</sub> se consideraron cuatro bandas (de B1 a B4) y para 5-HT<sub>2A</sub> tres bandas (de B1 a B3). La denominación por bandas se ajusta a los de estudios previos que han delimitado la expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub> a neuronas piramidales de las capas II y III, la capa granular externa y la capa piramidal externa, respectivamente (*Burnet et al., 1995; Pasqualetti et al., 1996*), donde la banda B1 corresponde aproximadamente a la capa II, la B2 a la capa III, B3 a la capa IV y por último, la banda B4 a una delgada lámina en la capa V/VI. Asimismo la distribución del ARNm del receptor 5-HT<sub>2A</sub> es similar a la obtenida en estudios previos, en los cuales se encontró que la mayor expresión se correspondía a la capa cortical III (capa piramidal externa) y a la capa V (capa piramidal interna), con una expresión más intensa en la capa V (*Burnet et al., 1995; Pasqualetti et al., 1996*), donde B1 corresponde a las capas I-IV, la banda B2 corresponde aproximadamente a la capa V y B3 a la capa VI.

# ANÁLISIS DE IMAGEN

## PROGRAMA MCID



**Figura 6.** Análisis de imágenes de hibridación *in situ* con el programa MCID. **(a)** El análisis de las secciones del hipocampo se realizó con moldes estándares para cada una de las regiones analizadas y se obtuvieron valores de densidad, área y densidad por área. **(b)** El análisis de las secciones de la corteza prefrontal se realizó mediante un sistema compartimental de bandas densitométricas entre la superficie pial y la sustancia blanca. El patrón de bandas se estableció colocando una plantilla estándar sobre la corteza y determinando, por análisis visual y computarizado, el patrón básico de distribución de marcaje. En el análisis cortical se obtuvieron valores de densidad.

Los resultados del análisis se expresan como densidad óptica integrada (DOI), la cual representa el valor de densidad óptica media menos el ruido de fondo (densidad óptica en sustancia blanca) en un área seleccionada. Para cada sujeto y cada receptor se analizaron tres secciones y en cada una de ellas, dos campos.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como medias  $\pm$  SEM (error estándar). Para cada receptor se cuantificaron tres secciones por sujeto en 15 sujetos por grupo. En este estudio se utilizó el programa estadístico Statview (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA. 2002). El análisis estadístico fue realizado para cada sonda y cada región mediante “two-way” (de dos vías) análisis de varianza (ANOVA) con dos variables independientes, diagnóstico y área (Ej. CA1) en el hipocampo, o diagnóstico y banda (Ej. B1) en la corteza prefrontal. Los análisis post-hoc fueron realizados mediante el test de Scheffe para N observaciones. Los valores con  $p < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos. No hubo asociación entre los niveles de expresión de ARNm y la edad de las personas, la edad de aparición de la enfermedad, el intervalo postmortem o el pH del cerebro.

## **RESULTADOS**

## DISTRIBUCIÓN ANATÓMICA DE LOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS EN CEREBROS NORMALES

### ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>

Como comentamos en Material y Métodos, el análisis densitométrico de la distribución de ARNm de 5-HT<sub>1A</sub> en la corteza prefrontal dorsolateral humana muestra un patrón en 4 bandas, B1 que corresponde aproximadamente a la capa II, B2 a la capa III, B3 a la capa IV y B4 a una lámina delgada en la capa V/VI. (**Figuras 7.I.a y 7.II.a.**) En el grupo control, el marcaje más intenso se encuentra sobre todo en la banda B1, es menor en las bandas B2 (aproximadamente la mitad de B1) y B4 (aproximadamente la cuarta parte de B1), y el más débil se encuentra en la banda B3 (aproximadamente la décima parte de B1). (**Figuras 8.a.**)

En el hipocampo, el ARNm del 5-HT<sub>1A</sub> está presente en todas las subregiones estudiadas (CA1, CA2, CA4 y GD; **Figura 9.a.**), con los niveles más altos en la región CA1, seguido de CA2 y GD (su intensidad de marcaje es aproximadamente la mitad de CA1), y con la expresión más débil en la región CA4 (aproximadamente la décima parte de CA1). (**Figura 10.a.**) El hecho de que el patrón de marcaje forme una banda central bien delimitada a lo largo del CA y del GD, mientras que la parte profunda y superficial son negativas, indica que expresión del mensajero está restringida al estrato piramidal de CA y al estrato granular del GD. (**Figura 2.b-c.**)

### ARNm de 5-HT<sub>1B</sub>

En la corteza prefrontal dorsolateral no fue posible detectar una señal de expresión del ARNm para este receptor distinguible del ruido de fondo.

En el HC, aunque la expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>1B</sub> es baja, la señal está consistentemente por encima del ruido de fondo, y por lo tanto fue posible cuantificarla. (**Figura 9.b.**) Los niveles de transcripciones del receptor 5-HT<sub>1B</sub> son más altos en el GD y CA1, y más bajos (aproximadamente un tercio de lo niveles del GD y CA1) en CA2 y CA4. (**Figura 10.b.**)



### ARNm de 5-HT<sub>2A</sub>

En la corteza prefrontal dorsolateral, la expresión del mensajero de 5-HT<sub>2A</sub> es tan robusta como la del 5-HT<sub>1A</sub>, pero mostrando un patrón laminar diferente. (**Figuras 7.I.b y 7.II.b.**) La mayor expresión se encuentra en la banda B2, con una intensidad de expresión intermedia en las bandas B1 (aproximadamente el 60 % del marcaje de B2) y con menor intensidad en B3 (aproximadamente el 35% de B2). (**Figura 8.b.**)

En el HC, el ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> también presenta un marcaje muy sólido, con la mayor intensidad en la región CA1, disminuye considerablemente en las áreas CA2 y GD (una intensidad de marcaje aproximadamente la mitad de CA1) y es mínimo en el área CA4 (aproximadamente la décima parte). (**Figuras 9.c y 10.c.**)

## **EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE PACIENTES**

### Corteza prefrontal dorsolateral.

En la corteza prefrontal dorsolateral, el patrón morfológico de distribución laminar de marcaje de ARNm de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> no mostró diferencias entre el grupo control y los tres grupos de pacientes. Es decir, para 5-HT<sub>1A</sub> el marcaje siguió siendo más intenso en B1, seguido de B2, B4 y por último B3, y para 5-HT<sub>2A</sub> el más intenso fue B2, seguido de B1 y por último B3. Sin embargo, el análisis cuantitativo mostró diferencias en la intensidad de marcaje entre los grupos. (**Figuras 7 y 8.**) La expresión del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub> fue significativamente diferente según el diagnóstico ( $F = 7.25$ ,  $df = 3,208$ ,  $p < 0.0001$ ). El análisis post-hoc mostró que en el grupo con depresión mayor era significativamente menor que en el grupo control ( $p = 0.036$ ) y que en el grupo con esquizofrenia ( $p = 0.007$ ). (**Figura 8.a.; Tabla 4.**)

La expresión del ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> también mostró diferencias significativas según el diagnóstico ( $F = 4.84$ ,  $df = 3,154$ ,  $p < 0.003$ ). El análisis post-hoc desveló que en los pacientes con trastorno bipolar la expresión de mensajero era significativamente más baja que en el grupo control ( $p = 0.034$ ) y que en el grupo con depresión mayor ( $p = 0.007$ ). (**Figura 8.b.; Tabla 4.**)

En ninguno de los casos se halló una diferencia significativa en la interacción entre los diagnósticos y las bandas analizadas en la corteza prefrontal dorsolateral. Tanto el receptor 5-HT<sub>1A</sub> ( $F = 1.265$ ,  $df = 3,208$ ,  $p < 0.25$ ), como el receptor 5-HT<sub>2A</sub> ( $F = 0.925$ ,  $df = 3,252$ ,  $p < 0.52$ ) no mostraron diferencias significativas. Esto supone que ninguna de las bandas corticales por separado establecía la diferencia entre los grupos, sino que el conjunto de todas las bandas diferenciaba al grupo que presentaba una modificación en la expresión del ARNm de cada receptor con relación a los otros grupos.

### **Hipocampo**

En el hipocampo, al igual que describimos en la corteza prefrontal para el patrón laminar de 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>, el patrón morfológico de distribución regional de expresión de ARNm de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> no mostró diferencias entre el grupo control y los tres grupos de pacientes. Es decir, para 5-HT<sub>1A</sub> el marcaje siguió siendo más intenso en CA1, seguido de CA2 y GD y por último CA4; para 5-HT<sub>1B</sub>, más intenso en CA1 y GD que en CA2 y CA4, y para 5-HT<sub>2A</sub>, el más intenso fue CA1, seguido de CA2 y GD y por último CA4. Sin embargo, el análisis cuantitativo mostró diferencias en la intensidad de marcaje para los tres receptores en función del diagnóstico. **(Figuras 9 y 10.)**

La expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub> fue significativamente diferente entre los grupos ( $F = 3.021$ ,  $df = 3,175$ ,  $p < 0.031$ ). El análisis post-hoc reveló que esta diferencia era debida a los pacientes con depresión mayor, los cuales tenían una expresión significativamente menor que los del grupo control ( $p = 0.018$ ). **(Figura 10.a.; Tabla 4.)**

En la expresión del ARNm de 5-HT<sub>1B</sub> también se observaron cambios según el diagnóstico ( $F = 6.98$ ,  $df = 3,200$ ,  $p < 0.0002$ ). El análisis post-hoc mostró que el grupo con trastorno bipolar difería significativamente de los sujetos sanos ( $p = 0.031$ ) y del grupo con depresión mayor ( $p = 0.006$ ). Hubo una tendencia del grupo con diagnóstico de esquizofrenia a diferir del grupo de control ( $p = 0.077$ ), y una diferencia significativa con respecto al grupo con depresión mayor ( $p = 0.017$ ). Los niveles del ARNm de 5-HT<sub>1B</sub> eran más elevados en los grupos con trastorno bipolar y con esquizofrenia que los otros dos grupos en estudio. **(Figura 10.b.; Tabla 4.)**

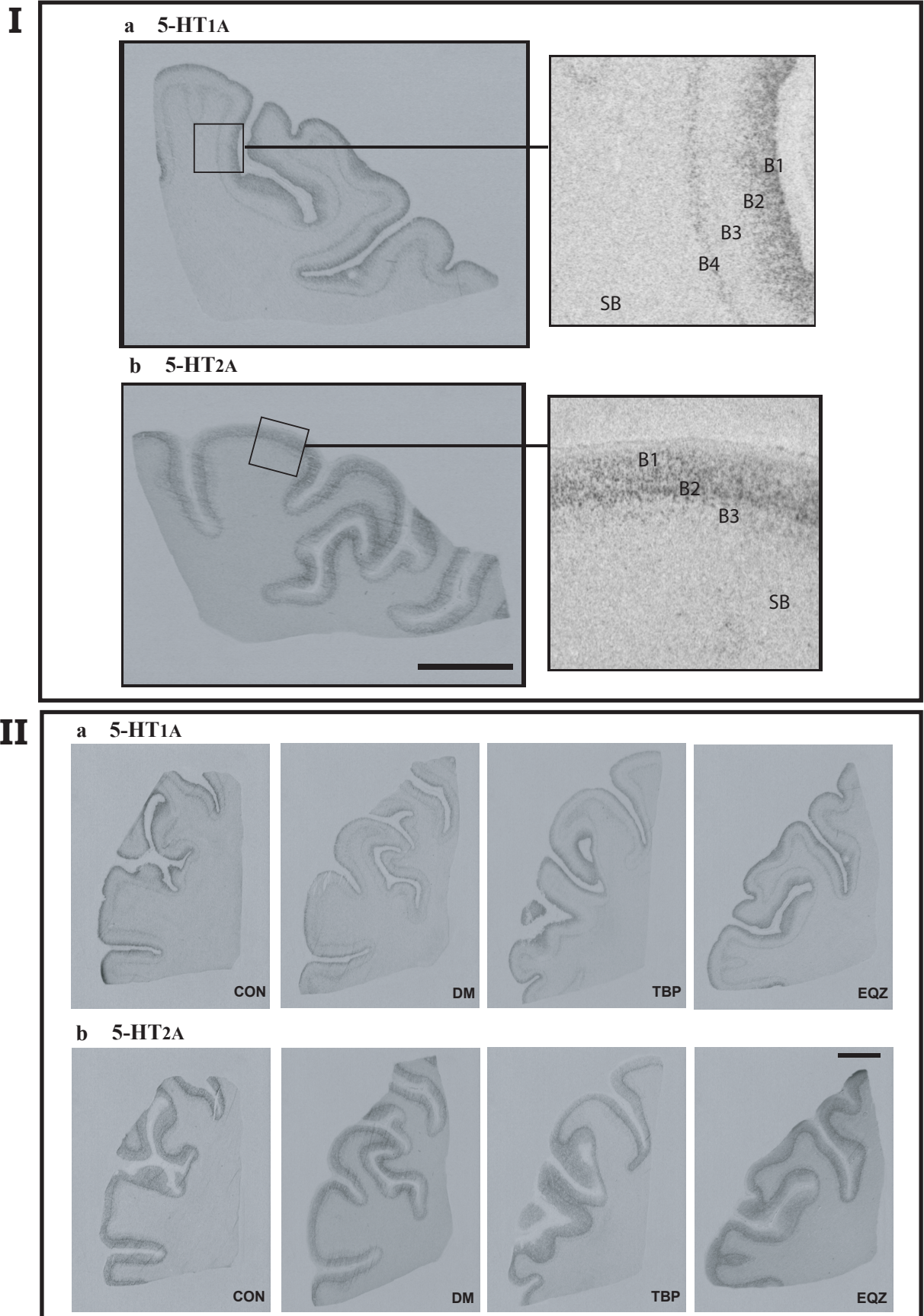
La expresión del ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> también mostró un cambio significativo debido principalmente al diagnóstico ( $F = 5.358$ ,  $df = 3,204$ ,  $p < 0.014$ ). El análisis

post-hoc reveló que los niveles del ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> eran significativamente inferiores en los pacientes esquizofrénicos ( $p = 0.003$ ) y en los pacientes bipolares ( $p = 0.043$ ) comparándolos con los pacientes del grupo de control. (**Figura 10.c.; Tabla 4.**)

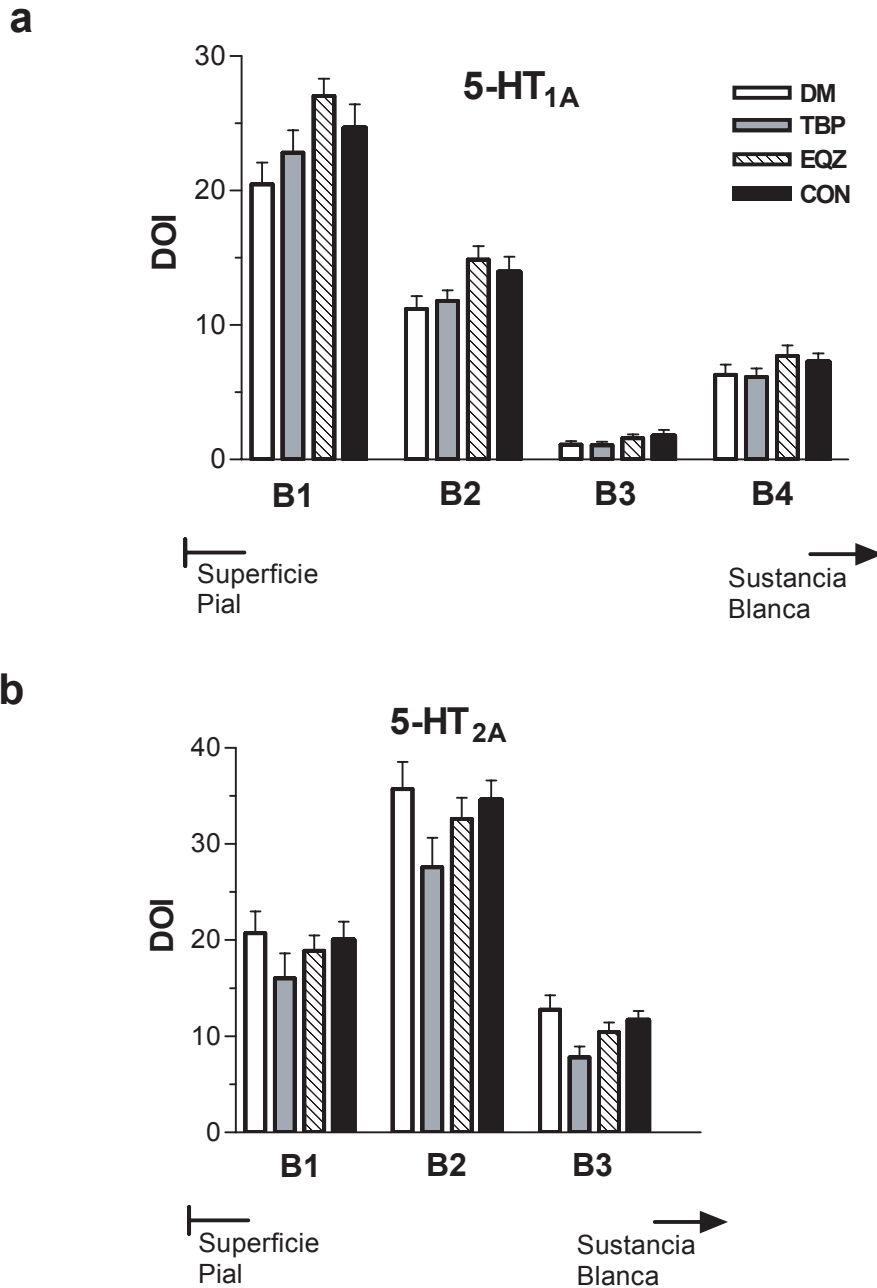
En ninguno de los casos se halló una diferencia significativa en la interacción entre los diagnósticos y las regiones analizadas en el hipocampo. En este paradigma, la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> ( $F = 0.871$ ,  $df = 3,175$ ,  $p < 0.55$ ), como la del 5-HT<sub>1B</sub> ( $F = 1.024$ ,  $df = 3,200$ ,  $p < 0.42$ ), así como la del 5-HT<sub>2A</sub> ( $F = 0.871$ ,  $df = 3,204$ ,  $p < 0.55$ ) no fueron significativamente diferentes. Esto supone que ninguna de las áreas hipocámpales por separado establecía una diferencia significativa entre los grupos, sino que el conjunto de todas las áreas diferenciaba al grupo que presentaba una modificación en la expresión del ARNm de cada receptor en relación con los otros grupos.

	<b>Corteza Prefrontal</b>	<b>Hipocampo</b>
<b>Depresión Mayor</b>	↓ 5-HT <sub>1A</sub>	↓ 5-HT <sub>1A</sub>
<b>Trastorno Bipolar</b>	↓ 5-HT <sub>2A</sub>	↑ 5-HT <sub>1B</sub> ↓ 5-HT <sub>2A</sub>
<b>Esquizofrenia</b>	↔	↑ 5-HT <sub>1B</sub> ↓ 5-HT <sub>2A</sub>

**Tabla 4.** Resumen de resultados. Comparación de los grupos psiquiátricos con el grupo control.

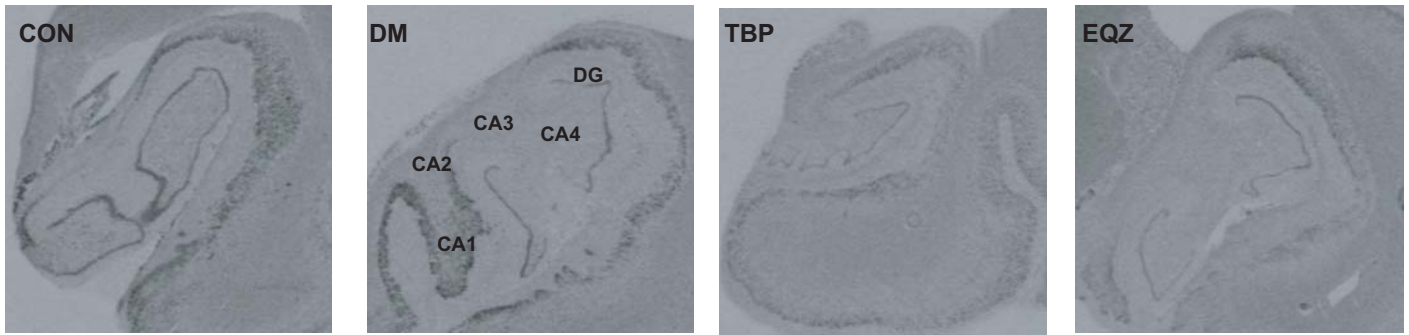


**Figura 7.** Imágenes digitalizadas de experimentos de hibridación *in situ* comparando los niveles de ARNm de receptores de serotonina en la corteza prefrontal dorsolateral (CPF DL). **I:** Distribución densitométrica por bandas de los receptores serotoninérgicos. **(a)** ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>; **(b)** ARNm de 5-HT<sub>2A</sub>. Barra de escala = 5 mm. Ampliación: 12x. **II:** Comparación entre los grupos a estudio. **(a)** Expresión del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>; **(b)** Expresión del ARNm de 5-HT<sub>2A</sub>. Barra de escala = 10mm. Abreviaciones: CON = control; DM = depresión mayor; TBP = trastorno bipolar; EQZ = esquizofrenia; B = banda; SB = sustancia blanca.

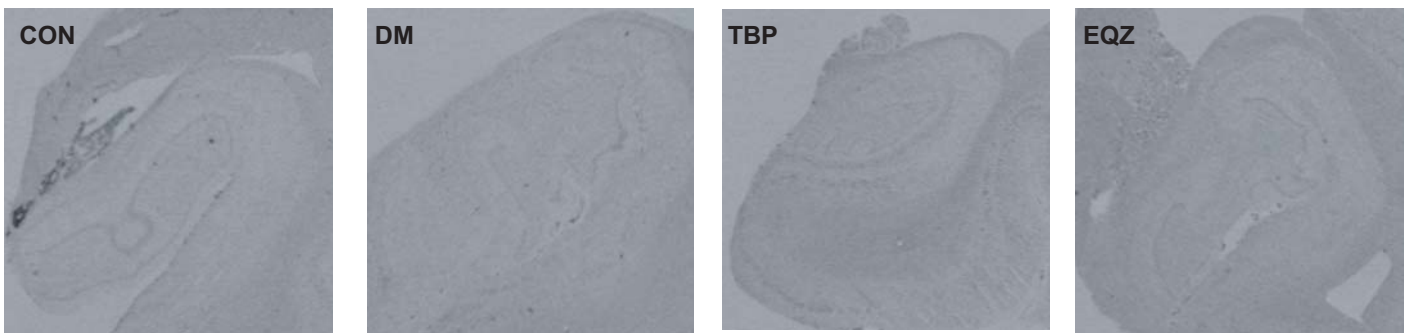


**Figura 8.** Niveles del ARNm de receptores de serotonina en la corteza prefrontal dorsolateral (CPFDL) en la depresión mayor (DM), el trastorno bipolar (TBP), la esquizofrenia (EQZ) y el grupo control (CON). **(a)** La expresión del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub> es significativamente diferente según el diagnóstico ( $p < 0.05$ ), debido a que el grupo con depresión mayor tiene niveles más bajos de expresión que en el grupo control. **(b)** La expresión del ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> muestra diferencias significativas según el diagnóstico ( $p < 0.05$ ), debido a que el grupo con trastorno bipolar tiene niveles más bajos de expresión que en el grupo control. Los datos son expresados como la media  $\pm$  EMS ( $n = 15$  por grupo). Abreviaciones: B = banda; DOI = Densidad Óptica Integrada; EMS = error medio estándar.

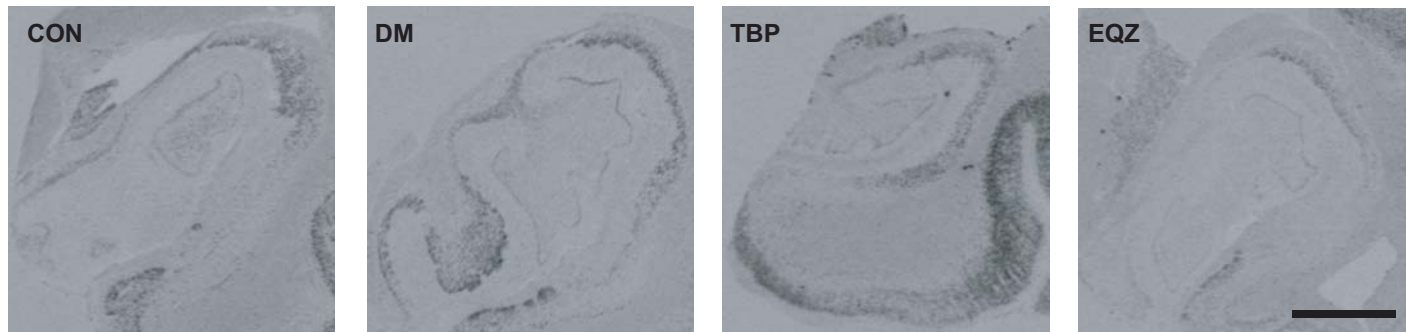
**a 5-HT<sub>1A</sub>**



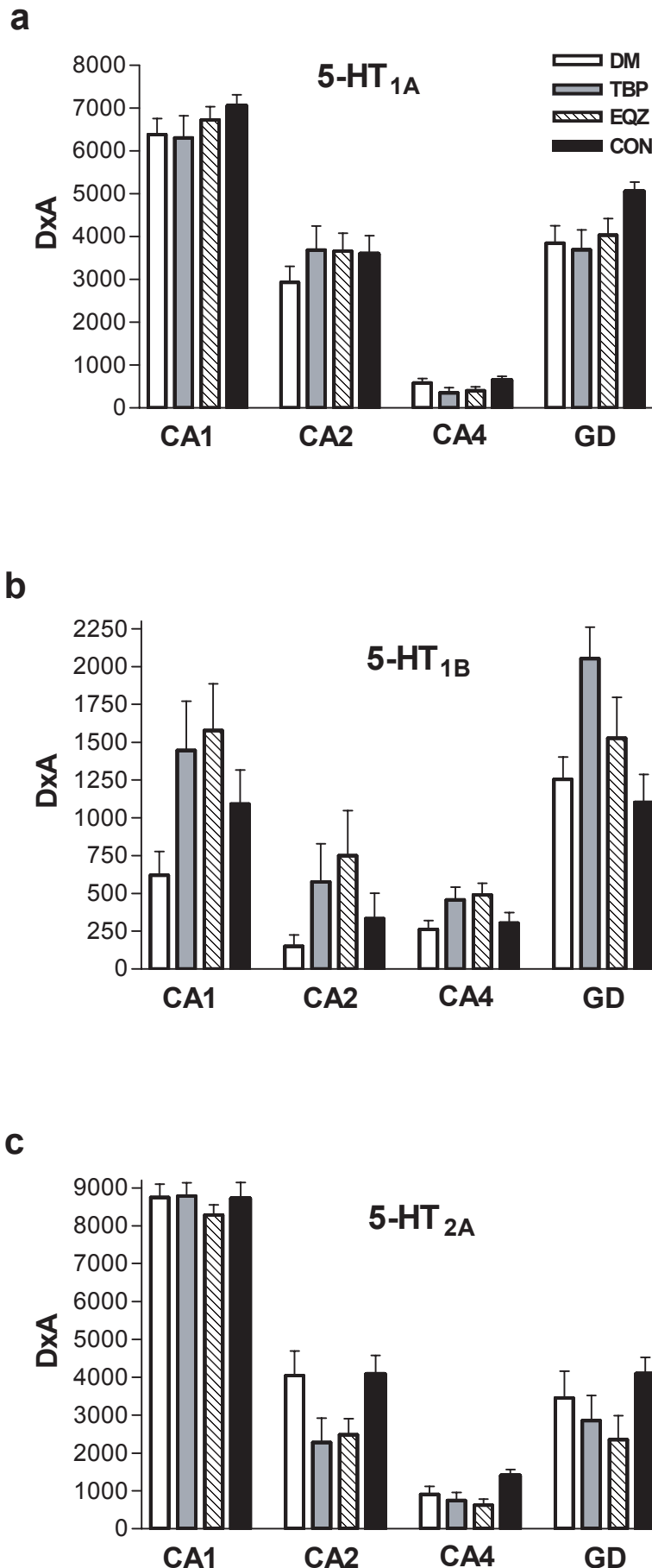
**b 5-HT<sub>1B</sub>**



**c 5-HT<sub>2A</sub>**



**Figura 9.** Imágenes digitalizadas de experimentos de hibridación *in situ* comparando los niveles de ARNm de receptores de serotonina en el hipocampo (HC). El tejido procede de pacientes con depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TBP), esquizofrenia (EQZ) y sujetos normales (CON). **(a)** Expresión del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>; **(b)** Expresión del ARNm de 5-HT<sub>1B</sub>; **(c)** Expresión del ARNm de 5-HT<sub>2A</sub>. Abreviaturas: CA = áreas del asta de Ammon; GD = giro dentado. Barra de escala = 5 mm.



**Figura 10.** Histograma de barras que ilustra los niveles de expresión de ARNm de los receptores de serotonina en regiones hipocampales de pacientes con depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TBP), esquizofrenia (EQZ) y el grupo control (CON). **(a)** La expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub> es significativamente diferente entre los grupos ( $p < 0.05$ ), debido a que el grupo con depresión mayor tiene niveles mas bajos de expresión que en el grupo control. **(b)** La expresión del ARNm de 5-HT<sub>1B</sub> es significativamente diferente según el diagnóstico ( $p < 0.05$ ), debido al mayor nivel de expresión del grupo con trastorno bipolar con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). El análisis post-hoc también muestra que el grupo EQZ tiene una tendencia en la misma dirección ( $p = 0.077$ ). **(c)** La expresión del ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> es significativamente diferente según el diagnóstico ( $p < 0.05$ ), debido a que los grupos con trastorno bipolar y esquizofrenia tienen niveles mas bajos de expresión que en el grupo control. Los datos son expresados como la media  $\pm$  EMS ( $n = 15$  por grupo). Abreviaciones: DxA = Densidad multiplicada por el Área; CA = áreas del asta de Ammon; GD = giro dentado; EMS = error medio estándar.

## **DISCUSIÓN**



El presente estudio es el primero en el que se analiza la expresión diferencial del ARNm de receptores de serotonina en tres grupos de pacientes con patología psiquiátrica y un grupo control.

### CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

Los estudios neurobiológicos llevados a cabo en pacientes con alteraciones de carácter afectivo o con esquizofrenia han puesto en evidencia la importancia del sistema serotoninérgico en este tipo de enfermedades. Sin embargo, el estudio de los aspectos neuroanatómicos y de interacción con otros sistemas que tienen lugar en el cerebro de pacientes que han sufrido estas patologías, han estado limitados. Uno de los principales problemas en este tipo de estudios son los de carácter ético y también, la escasez del número de donantes. Este trabajo pone en evidencia que estos cambios son también observados a nivel molecular en pacientes que han sufrido depresión mayor, trastorno bipolar y esquizofrenia.

#### **Comparación entre la hibridación *in situ* y los estudios de unión a ligandos.**

Como comentamos en la introducción, aunque se ha realizado estudios con inmunohistoquímica en roedores (*Francis et al., 1992; Morilak et al., 1993*), la mayor parte de estudios sobre receptores serotoninérgicos en cerebros humanos han sido realizados con técnicas de unión a ligandos, y se han centrado en su distribución en el cerebro normal o la comparación con una patología aislada (*Barnes y Sharp, 1999*). En nuestro caso hemos comparado diferentes patologías utilizando HIS. Al comparar ambas técnicas podemos ver que cada una nos ofrece información sobre aspectos diferentes del sistema que deben ser tenidas en cuenta. Entre las ventajas de la HIS se encuentra su especificidad, en cuanto usamos sondas diseñadas contra un receptor específico, que permite la visualización de las copias de ARNm a nivel somático, proporcionando información sobre la célula que lo sintetiza y los cambios en los niveles de transcripción de los receptores respectivos. En cambio, aunque la unión a ligandos no es tan específica, ya que la mayoría de las veces se pueden unir a diferentes subtipos de receptores, y no nos proporciona datos sobre la localización anatómica (presináptica o postsináptica) ni sobre cambios a nivel transcripcional, su ventaja es que al detectar los sitios de gran afinidad del ligando nos permite estudiar cambios en la expresión proteica de estos receptores o/y en su actividad biológica. Así, el análisis conjunto de ambas técnicas aporta datos sobre la compartimentación

de los receptores en la neurona, de tal forma que la superposición de las señales indica la localización somatodendrítica de los receptores, como ha sido descrito en roedores por Miquel et al. (1992) para 5-HT<sub>1A</sub>, mientras que la ausencia de co-localización sugiere que los receptores se encuentran en los axones, como ha sido también descrito en la rata por Boschert et al. (1994) para 5-HT<sub>1B</sub>. Por todo esto, los estudios de hibridación *in situ* que se presentan aquí aportan una información fundamental complementaria a los ya existentes con autoradiografía de ligandos, con la ventaja añadida de que se comparan simultáneamente diferentes patologías psiquiátricas.

### **DISTRIBUCIÓN ANATÓMICA DE LOS RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS**

Nuestro patrón de marcaje para ARNm del 5-HT<sub>1A</sub> en la corteza prefrontal muestra una distribución en 4 bandas, B1 que corresponde aproximadamente a la capa II, B2 a la capa III, B3 a la capa IV y B4 a una lámina delgada en la capa V/VI. El marcaje más intenso se observó en la banda B1, seguido por las bandas B2 y B4, y el más débil en la banda B3. En el hipocampo, todas las subregiones estudiadas mostraron marcaje, con los niveles más altos en CA1, seguido de CA2 y GD, y con la expresión más débil en la región CA4. Como ya se apuntó anteriormente, estudios previos (Burnet et al., 1995; Pasqualetti et al., 1996) han descrito que el ARNm del 5-HT<sub>1A</sub> en la corteza prefrontal humana se encuentra sobre todo las capas II y III (capa granular externa y la piramidal externa, respectivamente) y en el hipocampo, en todas las subregiones, con los niveles más altos en el área CA1 (Burnet et al., 1995). Estos estudios permitieron localizar el ARN mensajero en células piramidales tanto de la corteza prefrontal como del asta de Ammon y en las células granulares del GD, mientras que las células gliales carecen de expresión. Aunque en nuestro trabajo, no se realizaron estudios de doble marcaje para establecer el tipo celular que mostraba el marcaje, el hecho de que en la corteza prefrontal mostrara un patrón laminar similar, y que en el hipocampo se marcara solo el estrato piramidal del Asta de Ammon y el granular del giro dentado, sugiere que se trate de los mismos tipos celulares. Así mismo, la similitud entre nuestro patrón de expresión del ARNm con el de los estudios de unión a proteínas (Pazos et al., 1987a; Pompeiano et al., 1992; Joyce et al., 1993), confirma el carácter postsináptico (somatodendrítico) de este receptor.

En cuanto a la expresión del receptor de 5-HT<sub>1B</sub>, nuestros hallazgos coinciden con los de Jin y colaboradores (1992) en cuanto a la presencia de expresión en el

hipocampo humano, aunque sin establecer diferencias entre las regiones hipocampales. En nuestro estudio se analizó la distribución del ARNm del receptor de 5-HT<sub>1B</sub> a través de todos los subcampos hipocampales, observando por primera vez en tejido humano diferencias interregionales, con una mayor expresión en DG y CA1 que en CA2 y CA4. En ese estudio previo (*Jin et al., 1992*) se observó en la rata niveles altos expresión del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en la capa piramidal del asta de Ammon, mientras que en la corteza frontal de humanos, mono Rhesus y ratas se halló una banda con elevados niveles de hibridación que se corresponde con la capa V. También en ratas se ha localizado ARNm de este receptor en el HC tanto en células piramidales como en granulares (*Doucet et al., 1995*). La similitud con el patrón de marcaje de ARNm de 5-HT<sub>1A</sub> (banda central a lo largo del asta de Ammon y giro dentado) sugiere que se encuentra en células piramidales de asta de Ammon y en células granulares del giro dentado, sin embargo la confirmación de estos datos así como la compartimentación del propio receptor requiere otros estudios.

El marcaje para ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> en la corteza prefrontal dorsolateral mostró un patrón en tres bandas, con la mayor expresión en la banda B2 (que corresponde aproximadamente a la lámina V) y con una expresión menor en las bandas B1 (estratos I-IV) y B3 (estrato VI). Este patrón se corresponde con el descrito previamente por Burnet y colaboradores (*1995*) y por Pasqualetti y colaboradores (*1996*) según el cual los niveles de expresión son más altos en los estratos centrales (con mayor expresión en estrato V) que en los marginales (estratos I, II y VI). Según estos mismos estudios, las células que lo expresan son preferentemente neuronas piramidales y en menor grado interneuronas, mientras que la neuroglía no lo expresa. Con respecto a la expresión en el HC, nuestros hallazgos difieren de los de Burnet y colaboradores (*1995*), según los cuales la expresión de ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> en HC es baja, mientras que nuestro material mostró un marcaje sólido, sugiriendo unos niveles moderadamente altos de mensajero. Además, podemos distinguir una mayor expresión en CA1, disminuyendo considerablemente en las áreas CA2 y GD, y aún más en el área CA4. Esto es consistente con los hallazgos de Pasqualetti y colaboradores (*1996*) quienes encontraron que el ARNm de este receptor está presente sobre todo en las células piramidales de CA1, y ausente en células gliales, y con estudios de unión de ligandos a 5-HT<sub>2A</sub> que muestran patrones similares de la distribución en la corteza y el HC (*Pazos et al., 1987b; Joyce et al., 1993; Pompeiano et al., 1994*).

## ESQUIZOFRENIA

La EQZ es un trastorno psiquiátrico que se ha estudiado extensamente desde que fue descrito por primera vez por Kraepelin (1890). Aunque hay un número extenso de estudios que especulan con la patogenia de esta enfermedad, sólo algunos trabajos neurobiológicos (anatómicos, fisiológicos y neuroquímicos) han sido aceptados en la literatura de la EQZ (*Harrison, 1999a; Sawa y Snyder, 2002*). Es bien conocido que el HC está implicado en la integración afectiva y en la cognición (memoria), y que la corteza prefrontal está implicada tanto en el proceso cognitivo como en la atención y en la abstracción (*Weinberger et al., 1988; Weinberger, 1991; Park y Holzman, 1992; Goldman-Rakic, 1994; Meneses, 1999; Williams et al., 2002*). Por tanto, las alteraciones en estas áreas pueden dar lugar a un control anormal de las respuestas al estrés observadas y ser la base de muchos de las alteraciones del comportamiento y del conocimiento (inteligencia) asociadas a la EQZ. Entre las alteraciones morfológicas más frecuentemente encontradas en estos pacientes podemos destacar cambios en el tamaño y la conectividad del HC y de la corteza prefrontal, y dilatación de los ventrículos laterales y tercero (*Johnstone et al., 1976, 1994; Weinberger et al., 1979a, 1979b*).

En nuestro estudio, el patrón de expresión del ARNm de los receptores de 5-HT en el HC es diferente en los esquizofrénicos que en los controles. La expresión del gen de 5-HT<sub>1B</sub> es más alta, y la expresión del gen de 5-HT<sub>2A</sub> es más baja. (**Tabla 4.**) Hasta donde nosotros conocemos, esta es la primera descripción de cambios de la expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>1B</sub> en EQZ. Teniendo en cuenta que la localización del receptor 5-HT<sub>2A</sub> es exclusivamente postsináptica y que la del transportador de 5-HT es exclusivamente presináptica, como se comentó en la introducción (*Barnes y Sharp, 1999*), la disminución de la expresión de este receptor podría ser una respuesta compensatoria a la disminución de la actividad hipocampal del transportador de 5-HT que se ha postulado en la EQZ (*Dean et al., 1999b; Scarr et al., 2001*). Sin embargo, esta hipótesis no explica la sobre-expresión del receptor post-sináptico 5-HT<sub>1B</sub>, lo que nos obliga a recurrir a modelos animales.

A partir de experimentos básicos sabemos que la activación de los receptores de 5-HT<sub>2A</sub> inhibe la liberación de la noradrenalina (*Done y Sharp, 1994*) y aumenta la liberación de GABA (*Farber et al., 1998*). Además, la serotonina interacciona con la acetilcolina para modular la transmisión glutamatérgica en la formación hipocampal, donde 5-HT<sub>1B</sub> tiene un efecto inhibitorio en las neuronas colinérgicas (*Izumi et al.,*

1994). Interesantemente, los receptores colinérgicos están altamente concentrados en las interneuronas de GABAérgicas (*Van der Zee y Luiten, 1993*) y los heterorreceptores de 5-HT<sub>1B</sub> están situados en terminales GABAérgicas. Una reducción de la expresión de 5-HT<sub>2A</sub> y una sobre-expresión del receptor de 5-HT<sub>1B</sub> podría conducir a una actividad GABAérgica general disminuida (*Moret y Briley, 2000*). A su vez, la reducción en la actividad GABAérgica resultaría en una desinhibición de las eferencias glutamatérgicas, similar a lo que se ha propuesto en la hipótesis de la hipofunción del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA; *Farber et al., 1998; Olney et al., 1999, 2002*). Esta hipótesis se basa en el hecho de que el bloqueo experimental de la función de los receptores NMDA produce un incremento de la liberación de glutamato (*Moghaddam et al., 1997; Adams y Moghaddam, 1998*) y acetilcolina (*Hasegawa et al., 1993; Giovannini et al., 1994; Kim et al., 1999*). Dicha liberación de neurotransmisores excitatorios produciría consecuentemente una sobreestimulación neuronal a nivel postsináptico.

Como fue propuesto por Floresco y colaboradores (2001), el hipocampo produce una gran influencia sobre el sistema dopaminérgico mesolímbico. De acuerdo con los modelos animales, las aferencias glutamatérgicas del hipocampo producen un potente efecto excitatorio en el núcleo accumbens (NAc), el cual en consecuencia activa el área tegmental ventral (ATV) a través de un circuito de retroalimentación indirecto constituido por una proyección accumbens-pálido ventral y otra pálido ventral-ATV, ambas GABAérgicas (*Jones y Mogenson, 1980; Chrobak y Napier, 1993*). **(Figura 11.)** Así, de acuerdo con Floresco et al. (2001), la proyección hipocampal puede alterar la neurotransmisión dopaminérgica, influenciando tanto la actividad basal dopaminérgica como la regulación las propiedades de disparo de estas neuronas. También existe la posibilidad de una ruta neuromoduladora indirecta desde el hipocampo al NAc, mediante una conexión a través de la CPF (*Zahm y Heimer, 1990; Kalivas et al., 1993*), sin embargo la falta de efectos en la transmisión dopaminérgica mesolímbica tras la inhibición de la corteza prefrontal en roedores no apuntan en este sentido (*Floresco et al., 2001*). Apoyando esta idea, en el presente estudio no se encontraron diferencias en la CPF de los pacientes que sufrían esquizofrenia. De acuerdo con estas interacciones, los receptores de 5-HT<sub>1B</sub> y de 5-HT<sub>2A</sub> pueden desempeñar un papel importante en la transmisión neuronal hipocampal alterada en los pacientes esquizofrénicos.



En resumen, una disminución de 5-HT<sub>2A</sub> y un aumento de 5-HT<sub>1B</sub> podrían dar lugar a una salida glutamatérgica hipocampal aumentada. Esta situación podría contribuir al estado hiperexcitatorio del sistema dopaminérgico, el cual ha sido aceptado en la esquizofrenia (Creese *et al.*, 1976; Seeman *et al.*, 1976). De acuerdo con estas interacciones, los receptores de 5-HT<sub>1B</sub> y de 5-HT<sub>2A</sub> pueden desempeñar un papel importante en la transmisión neuronal hipocampal alterada en los pacientes esquizofrénicos. Además, nuestros hallazgos indican que este efecto es a través de su conexión directa con NAc. **(Figura 11.)**

Hasta la fecha, los estudios que han tratado la implicación del sistema serotoninérgico en la fisiopatología de la EQZ han sido escasos, poco concluyentes y sus resultados discordantes. Por ejemplo, en un estudio se encontró un incremento de la capacidad de unión de ligandos a 5-HT<sub>2A</sub> en la formación hipocampal de esquizofrénicos (Joyce *et al.*, 1993), mientras que en otro no se encontró ninguna diferencia (Burnet *et al.*, 1996). En la corteza prefrontal, unos estudios describen una unión a 5-HT<sub>2A</sub> más baja en esquizofrénicos (Mita *et al.*, 1986; Arora y Meltzer, 1991; Laruelle *et al.*, 1993; Burnet *et al.*, 1996; Dean y Hayes, 1996; Dean *et al.*, 1999b), y en otros no se observaron diferencias entre los esquizofrénicos y los controles (Whitaker *et al.*, 1981; Reynolds *et al.*, 1983; Joyce *et al.*, 1993). En cuanto al receptor 5-HT<sub>1A</sub>, en el HC, unos estudios describen la ausencia de cambios en esquizofrénicos con respecto a controles (Hashimoto *et al.*, 1991; Burnet *et al.*, 1996), mientras que otros encuentran un incremento en la unión a ligandos (Joyce *et al.*, 1993). En la corteza prefrontal, unos estudios no encuentran cambios en la unión al ligando (Joyce *et al.*, 1993; Dean *et al.*, 1999a), mientras otros la encuentran aumentada (Hashimoto *et al.*, 1991; Burnet *et al.*, 1996; Simpson *et al.*, 1996; Sumiyoshi *et al.*, 1996).

En nuestro conocimiento, solamente otro estudio ha examinado los niveles del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub> y de 5-HT<sub>2A</sub> en los cerebros de los pacientes que sufrían de EQZ (Burnet *et al.*, 1996). Coincidiendo con nosotros, no pudieron encontrar ningún cambio en los niveles del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub> tanto en el CPFDL, como en HC. Con respecto a 5-HT<sub>2A</sub>, el otro estudio no pudo analizar los niveles del ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> en el HC porque el marcaje era muy débil para poder cuantificar, pero si encontraron una disminución de la expresión en la corteza prefrontal (Burnet *et al.*, 1996), mientras que nuestro estudio no mostró ninguna diferencia.

Un dato llamativo de nuestro estudio es que, al contrario de lo que se ha publicado previamente (*Mita et al., 1986; Arora y Meltzer, 1991; Hashimoto et al., 1991; Laruelle et al., 1993; Burnet et al., 1996; Dean y Hayes, 1996; Simpson et al., 1996; Sumiyoshi et al., 1996; Dean et al., 1998; Dean et al., 1999a, 1999b*), nosotros no encontramos ningún cambio en la expresión de los receptores de 5-HT en la CPFDL. Es importante señalar que el tejido usado en el presente estudio es de una cohorte más joven (la edad media es 45) con respecto a la mayoría de los estudios previos, en los que se han incluido sujetos por encima de los 65 años de edad en el momento de la muerte (que en nuestro estudio fueron descartados para evitar el sesgo de factores intercurrentes relacionados con el envejecimiento). En la EQZ, los síntomas positivos (alucinaciones, delirios, etc.) son más destacados en edades más jóvenes, mientras que los síntomas negativos (anhedonia, aplanamiento afectivo, etc.) y la demencia son más frecuentes en etapas más avanzadas de la vida. La afectación del hipocampo se piensa que favorece los síntomas positivos, mientras que los cambios en la CPFDL pueden estar más relacionados con los síntomas negativos (*Silbersweig et al., 1995*). Es posible que las alteraciones de los receptores de 5-HT en la CPFDL pueden ocurrir durante las últimas etapas de la enfermedad. Así, nuestros resultados en el HC pueden ser representativos de los cambios que ocurren en estadios más precoces de la enfermedad.

Los fármacos neurolépticos atípicos, como la clozapina y la risperidona, han demostrado aliviar los síntomas positivos y negativos en la EQZ, posiblemente a través de una acción antagonista sobre los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub>, y menos sobre los receptores de dopamina (*Meltzer et al., 1989; Joyce, 1993; Sawa y Snyder, 2002*). Entre nuestros pacientes con EQZ, nueve tomaban neurolépticos clásicos, siete tomaban neurolépticos atípicos, cuatro tomaban antidepresivos, dos tomaban litio, y cinco tomaban ansiolíticos. La posibilidad de que los niveles específicos del ARNm puedan estar alterados en los pacientes con esquizofrenia, como resultado de la medicación, debe ser también tenida en cuenta. Bajo estas circunstancias, los efectos de la medicación no pueden ser descartados.

Es muy probable que la inconsistencia de los resultados en la literatura sea debida a múltiples factores, tales como la heterogeneidad de la enfermedad, el uso de muestras pequeñas, diferencias en las regiones del cerebro, indisponibilidad de ligandos selectivos, así como a una medicación diversificada y/o a una exposición a drogas ilegales.



## DEPRESIÓN MAYOR

Nuestros hallazgos muestran que tanto en el HC como en la CPF de estos pacientes se produce una reducción en la expresión de mensajero para 5-HT<sub>1A</sub> con respecto a los controles. (**Tabla 4.**) La disminución del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub> en el HC es consistente con resultados publicados por diversos grupos utilizando tanto técnicas de HIS (López *et al.*, 1998) como de unión a ligandos (Cheetham *et al.*, 1990; Lowther *et al.*, 1997). En cambio difieren de los hallazgos encontrados en CPFDL con técnicas de unión a ligandos (teniendo en cuenta que en la corteza cerebral este receptor es exclusivamente postsináptico), en los que no se han encontrado diferencias (Matsubara *et al.*, 1991; Arranz *et al.*, 1994; Lowther *et al.*, 1997; Stockmeier, 1997) o una unión aumentada en paciente con DM (Arango *et al.*, 1995). De cualquier forma debemos significar que estos estudios han publicado los hallazgos de unión a ligandos en víctimas de suicidio, que incluyen pero no se restringen a los pacientes que sufren de DM (Cheetham *et al.*, 1990; Lowther *et al.*, 1997).

Se ha observado que esta disminución se podría relacionar con una reducción de la actividad del circuito límbico bajo condiciones de estrés, puesto que la hipersecreción de cortisol se ha asociado a la DM (Chalmers *et al.*, 1993, 1994; López *et al.*, 1997, 1998, 1999). Estudios realizados con el mismo material de la Stanley Foundation (López-Figueroa *et al.*, 2001), muestran una reducción de la expresión de los receptores mineralocorticoides (MR) y glucocorticoides (GR) en la CPFDL en los pacientes con depresión, que posiblemente estén asociados a la elevada liberación de cortisol. La alteración del receptor 5-HT<sub>1A</sub> y los receptores MR y GR en la patología depresiva puede entenderse como uno de los mecanismos por el cual el estrés puede desencadenar y/o mantener los episodios depresivos. Los hallazgos en los estudios humanos postmortem se correlacionan con los de modelos animales de hipercortisolemia, en los que la expresión del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub> en el HC está reducida por el estrés crónico y por la administración exógena de glucocorticoides (Meador-Woodruff *et al.*, 1990; Mendelson y McEwen, 1991, 1992; Chalmers *et al.*, 1993; Meijer y de Kloet, 1998). En estos estudios se ha determinado que la extracción de las glándulas adrenales revierte el proceso inducido por el estrés crónico, logrando recuperar los niveles previos de expresión de 5-HT<sub>1A</sub>. Por todo ello, se cree que existen mecanismos, entre los que se encuentran los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> y el sistema corticoideo, que son moduladores de la respuesta al estrés.

## TRASTORNO BIPOLAR

En comparación a los controles, en la CPFDL de estos pacientes encontramos una disminución de la expresión de 5-HT<sub>2A</sub>, y en el HC una disminución de la expresión de 5-HT<sub>2A</sub> y un aumento de la expresión de 5-HT<sub>1B</sub>. (**Tabla 4.**) La disminución de la expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>2A</sub> encontrada en la corteza puede ser debida en principio a dos mecanismos básicos: una reducción de la síntesis del ARNm en cada neurona y/o una disminución del número de las células que contienen el ARNm. La última situación es probable en vista del hecho de que hay una disminución de la densidad neuronal en la corteza prefrontal de pacientes con el TBP debida a la pérdida tanto de neuronas grandes como pequeñas (*Rajkowska, 2000; Rajkowska et al., 2001*), en contraste a lo descrito en pacientes con DM que presentan una disminución relativa de neuronas grandes y un aumento en la densidad de neuronas pequeñas, sugiriendo una atrofia celular en contraposición a una pérdida celular (*Rajkowska, 2000; Manji et al., 2000; Rajkowska et al., 2001*). Según lo descrito previamente (*Burnet et al., 1995*), el ARNm del receptor de 5-HT<sub>2A</sub> se sintetiza en las interneuronas (neuronas pequeñas), por lo tanto, nuestros datos sugieren una síntesis reducida regionalmente específica de los receptores serotoninérgicos debida al descenso de estas neuronas, las cuales pueden desempeñar un papel importante en la patogénesis del TBP. Dado que las neuronas piramidales de la corteza prefrontal son sobre todo de naturaleza glutamatérgica, un posible efecto causado por la disminución de las interneuronas es un aumento en la salida de información excitatoria a otras áreas corticales y a los núcleos subcorticales.

Un hecho interesante es el paralelismo entre TBP y EQZ en las alteraciones observadas en el hipocampo, ambas entidades muestran niveles más altos de la transcripción de 5-HT<sub>1B</sub> y niveles más bajos de la de 5-HT<sub>2A</sub> comparándolo con el grupo control. (**Tabla 4.**) Aunque se ha descrito una reducción en el número de células no-piramidales en el área CA2 en TBP (*Benes et al., 1998*), este hallazgo no ha sido confirmado y otros estudios resaltan la ausencia de alteraciones histológicas en la formación hipocámpal (*Rajkowska, 2000*). De cualquier forma, una alteración restringida a las células no-piramidales en CA2 no explica la extensión (DG, CA1, CA2 y CA4) de los cambios en las transcripciones de los receptores de 5-HT observados en este estudio.

Nuestros resultados sugieren que el TBP y la EQZ tienen en común una alteración en un área específica del cerebro, la formación hipocampal. Estos resultados apoyan la hipótesis clínica de que el TBP comparte algunas características con la EQZ que se podrían relacionar con un malfuncionamiento hipocampal, incluyendo los episodios psicóticos (*Silbersweig et al., 1995*). Sin embargo es importante señalar que el TBP es una patología única, en cuanto presenta cambios del ARNm de receptores de 5-HT en la CPFDL que no fueron encontrados en el grupo de EQZ. A la luz de nuestros resultados, podemos decir que el sistema de la 5-HT desempeña un papel importante en la fisiopatología del TBP, como ha sido propuesto previamente en base a observaciones clínicas en consumidores de fármacos psicoactivos (*Prange et al., 1974; Price et al., 1990*). Por otra parte, varios autores han postulado una hipótesis “permisiva” del TBP (*Bunney y Davis, 1965; Prange et al., 1974; Shiah y Yatham, 2000; Vawter et al., 2000*). Esta hipótesis sugiere que mientras la DM está caracterizada por una hipofunción de la 5-HT, NA y DA, el TBP está caracterizado por una hipofunción de la 5-HT y una hiperfunción de la NA y DA. Además, también se ha propuesto la implicación de alteraciones de otros neurotransmisores (ej. baja actividad de GABA y de ACh) en la fisiopatología del TBP (*Shiah y Yatham, 2000; Vawter et al., 2000*). Por lo tanto, la correlación entre la 5-HT y estos otros sistemas de neurotransmisores puede jugar un papel importante en la fisiopatología del TBP.

La mayoría de estudios previos del sistema 5-HT en tejido postmortem de pacientes con TBP han sido realizados en el contexto de pacientes con depresión en los que el número de sujetos con TBP era pequeño (*Dean et al., 2001*), o estaban incluidos en un grupo suicida (*Mann et al., 1986; Arango et al., 1990*). Para paliar parcialmente esta carencia, el uso de los cerebros de La Stanley Foundation Neuropathology Consortium ha permitido la investigación de las posibles diferencias dentro de los trastornos del ánimo afectivo (*Knable et al., 2001, 2002*). Sin embargo, el tamaño de esta muestra sigue siendo relativamente pequeño e incluye casos de suicidio dentro de los trastornos del ánimo afectivo, lo que hace difícil generalizar los resultados incluso cuando utilizamos este material.

La posibilidad de que la expresión de los genes esté alterada en pacientes con trastornos del ánimo afectivo como consecuencia de la medicación debe ser también considerada. Por ejemplo, la medicación con antidepresivos aumenta la actividad de la 5-HT en estados depresivos y puede contribuir a la normalización de las funciones serotoninérgicas. Se ha encontrado que el litio aumenta la transmisión serotoninérgica

central (Sheard y Aghajanian, 1970; Perez-Cruet et al., 1971; Tagliamonte et al., 1971; Knapp y Mandell, 1973; Bunney y Garland-Bunney, 1987; Cowen, 1990; Price et al., 1990; Chen et al., 2000; Shiah y Yatham, 2000). El tratamiento farmacológico con litio, valproato y antidepresivos puede desempeñar un papel importante en la supervivencia neuronal (Bunney y Garland-Bunney, 1987; Cowen, 1990; Price et al., 1990; Lenox y Manji, 1995; Shiah y Yatham, 2000). Los subgrupos de sujetos de nuestro estudio tomaban este tipo de tratamiento a la hora de muerte. En estas circunstancias, los efectos de la medicación no pueden ser descartados. En este sentido debemos decir que en estudios animales no se han encontrado cambios evidentes en los niveles de los receptores postsinápticos de 5-HT<sub>1A</sub>, ni de 5-HT<sub>1B</sub> después de la administración crónica de medicaciones psicotrópicas (Serretti et al., 2000; Mahmood y Silverstone, 2001). Lo que apoyaría la irrelevancia del tratamiento farmacológico en nuestros hallazgos. Sin embargo, también debemos reconocer la inconsistencia entre algunos estudios experimentales, ya que por un lado la administración de antidepresivos tricíclicos disminuía la unión al receptor 5-HT<sub>2A</sub> a nivel cortical (Peroutka y Snyder, 1980), y por otro, se ha publicado un aumento del ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> tras el tratamiento con fluoxetina y con terapia electroconvulsiva (Butler et al., 1993). Con lo que los estudios animales no contribuyen a darnos un mayor grado de certidumbre.

## **CONCLUSIONES**

**1.** En la corteza prefrontal dorsolateral humana el ARNm de los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> se expresan en forma de bandas pero con patrones diferentes. El de 5-HT<sub>1A</sub> forma cuatro bandas: B1 (capa II), B2 (capa III), B3 (capa IV) y B4 (lamina delgada en capa V/VI). El de 5-HT<sub>2A</sub> forma tres bandas: B1 (capas I-IV), B2 (capa V) y B3 (capa VI). No se detectó señal para el mensajero del receptor 5-HT<sub>1B</sub>.

**2.** En el hipocampo se expresan los tres receptores (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>) aunque con patrones diferentes. El ARNm de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub> mostró mayores niveles en CA1 que en las otras áreas, mientras que el de 5-HT<sub>1B</sub> mostró niveles igualmente altos en CA1 y GD, y más bajos en CA2 y CA4.

**3.** En el hipocampo de pacientes esquizofrénicos se observó un descenso en los niveles de ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> y un incremento en los de ARNm de 5-HT<sub>1B</sub>. Estos cambios pueden ser representativos de los cambios que ocurren tempranamente en la esquizofrenia y la base de la hiperactividad del sistema dopaminérgico mesolímbico, característico de esta enfermedad, a través de la desinhibición de las vías glutamatérgicas de salida del hipocampo.

**4.** En la depresión mayor existe una disminución en la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> tanto en el HC como en la CPFDL. Estos cambios, junto con la alteración de los receptores esteroideos MR y GR, se pueden relacionar con una hipofunción del circuito límbico bajo condiciones de estrés y ser uno de los mecanismos por los que el estrés puede desencadenar y/o mantener los episodios depresivos.

**5.** En el trastorno bipolar existe una disminución en la expresión de 5-HT<sub>2A</sub> en ambas regiones y un aumento de 5-HT<sub>1B</sub> en el hipocampo. El descenso en los niveles de mensajero de 5-HT<sub>2A</sub> en la CPFDL puede ser debido a la reducción en el número de neuronas pequeñas. Por otro lado, la similitud en el comportamiento de la expresión hipocampal de ambos receptores (descenso de 5-HT<sub>2A</sub> y aumento de 5-HT<sub>1B</sub>) en el TBP y la esquizofrenia, avala la hipótesis de que ambos procesos comparten características clínicas que podrían ser atribuidas a la disfunción hipocampal.

**6.** En resumen, este trabajo nos ha permitido correlacionar, en el mismo experimento y en material humano postmortem, la expresión genética de receptores serotoninérgicos en dos regiones cerebrales de pacientes con trastornos del estado del ánimo afectivo, esquizofrenia y cerebros controles. Nuestros resultados muestran que en estas enfermedades se modifica la expresión de estos receptores y que el patrón de alteración varía dependiendo del diagnóstico. Este estudio aporta nuevos datos sobre la neuroanatomía química de los trastornos psiquiátricos, concretamente sobre el papel de la serotonina y sus receptores a nivel hipocampal y cortical en su fisiopatología, y puede contribuir al mejor manejo terapéutico de estos pacientes.

## **ABREVIATURAS**



5-HT: 5-hidroxitriptamina, serotonina, serotoninérgico.	DSM-IV: Diagnostic and stadistic manual for mental disorders IV (Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, IV; 1994).
5-HT <sub>1A</sub> : receptor serotoninérgico 1A.	DTT: ditiotritol.
5-HT <sub>1B</sub> : receptor serotoninérgico 1B.	EQZ: esquizofrenia.
5-HT <sub>2A</sub> : receptor serotoninérgico 2A.	EMS: error medio estándar.
5-HIAA = ácido 5-hidroxi-indolacético	F: F de Snedecor
8-OH-DPAT: 8-hidroxi-2-(di-n-propilamino) tretalina.	GABA: ácido gammaaminobutírico.
AADC = aminoácido descarboxilasa	GD: giro dentado, circunvolución dentada
ACh: acetilcolina.	GR: receptor glucocorticoide.
ADN: ácido desoxiribonucleico.	GTP: guanosina 5'-trifosfato.
ADNc: ADN complementario	HC: hipocampo.
ANOVA: análisis de varianza	HIS: hibridación <i>in situ</i> .
ARN: ácido ribonucleico.	IMAO: inhibidores de monoamino oxidasa.
ARNc: ARN complementario	IPM: intervalo postmortem.
ARNhn: ARN heterogéneo.	IRSN: inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina y noradrenalina.
ARNm: ARN mensajero.	ISRS: inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina.
ARNt: ARN de tranferencia.	LSD: ácido lisérgico dietilamida.
ATP: adenosina 5'-trifosfato	MAO: monoamino oxidasa.
ATV: área tegmental ventral.	MCID: Microcomputer Imaging Device.
B: banda	MR: receptor mineralocorticoide
CA: asta de Ammon, cornu Ammonis	NA: noradrenalina.
CFM: circunvolucion frontal media.	NAC: núcleo accumbens.
CFS: circunvolucion frontal superior.	NMDA: N-metil-D-aspartato.
CPF: corteza prefrontal.	OMS: Organización Mundial de la Salud.
CPFDL: corteza prefrontal dorsolateral	p: p valor.
CTP: citidina 5'-trifosfato	PB: pares de bases
DA: dopamina.	PV: palido ventral.
DA <sub>1</sub> - DA <sub>2</sub> : receptores dopaminérgicos	S <sup>35</sup> : azufre <sup>35</sup> .
df: grados de libertad	SB: sustancia blanca.
DM: depresión mayor.	SERT: transportador de 5-HT.
DMT: dimetiltryptamina.	SSC: citrato salino estándar (standard saline citrate).
DOI x A: DOI (densidad óptica integrada, intensidad óptica media de la señal) multiplicado por A (área).	
Dpm: desintegraciones por minuto.	

TBP: trastorno bipolar.

TPH = triptófano hidroxilasa

UTP: uridina 5'-trifosfato

UTR: región no transcribible

**FIGURAS Y TABLAS**

## FIGURAS

**Figura 1. (a).** Conexiones del sistema serotoninérgico. Principales eferencias de los núcleos del rafe a regiones corticales y subcorticales. **(b).** Metabolismo neuronal de la serotonina (5-HT) y localización de los receptores serotoninérgicos. A partir del aminoácido triptófano se sintetiza 5-HT, mediante las enzimas TPH y AADC. La serotonina es transportada en vesículas hasta las terminales axonales de las neuronas serotoninérgicas. Tras su liberación, la 5-HT es recaptada a nivel presináptico por el transportador de serotonina (SERT), pudiendo volver a las vesículas o ser degradado a 5-HIAA mediante la enzima monoamino oxidasa (MAO). Los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>1B</sub> se encuentran tanto en neuronas serotoninérgicas como en no-serotoninérgicas, mientras que el receptor 5-HT<sub>2A</sub> solo esta en neuronas no-serotoninérgicas. Abreviaturas: TPH = triptófano hidroxilasa; AADC = aminoácido descarboxilasa; 5-HIAA = ácido 5-hidroxi-indolacético.....12

**Figura 2.** El hipocampo. **(a)** El hipocampo está situado en la superficie medial del lóbulo temporal y junto con la amígdala, en su extremo anterior, está incluido en el sistema límbico. **(b)** Microcircuitos de la formación hipocámpal, modificación de Bear et al., 1996. **(c)** Imagen digitalizada de hibridación *in situ* del hipocampo, donde se aprecia las diferentes áreas del asta de Ammon (CA), el giro dentado (GD), el subiculum y la corteza entorrinal. **(d)** Rutas de las conexiones entre las diferentes regiones del hipocampo.....31

**Figura 3.** Corteza Prefrontal. **(a)** División citoarquitectónica de la corteza cerebral según K. Brodmann (1909). **(b)** Imagen digitalizada de hibridación *in situ* de la corteza prefrontal (CPF) dorsolateral. **(c)** División laminar de la corteza prefrontal humana. Imagen digitalizada de tinción con Nissl en la CPF. Esquema clásico de tres tinciones diferentes de la corteza prefrontal (Golgi, Nissl y Weigert).....34

**Figura 4.** Síntesis del ARNm y de la proteína. La transcripción del ADN para sintetizar ARN mensajero (ARNm) se inicia cuando la ARN polimerasa se une a un complejo de factores de iniciación, un conjunto especializado de factores de transcripción unidos al ADN dentro de la región promotora. El complejo de la ARN polimerasa forma una burbuja de transcripción la cual se mueve a lo largo la cadena

molde de ADN para sintetizar un transcrito primario, también denominado ARN heterogéneo (ARN<sub>hn</sub>). La unión de factores de transcripción proteicos a secuencias potenciadoras o inhibidoras determina la cantidad de ARN sintetizado. El montaje o "splicing" del ARN<sub>hn</sub> produce ARNm maduro. Los complejos ARN/proteína extraen los segmentos codificados por intrones y unen los segmentos codificados por exones para producir ARNm. La traducción de ARNm produce proteínas. Los ribosomas leen el código del ARNm y añaden aminoácidos (mediante ARN de transferencia, ARN<sub>t</sub>) a la cadena proteica en crecimiento.....37

**Figura 5.** Síntesis e hibridación de una sonda de ARN complementario (ARN<sub>c</sub>). La cadena doble de ADN complementario (ADN<sub>c</sub>) es sintetizada a partir de ARNm. La doble cadena de ADN<sub>c</sub> es insertada dentro de un plásmido unido a un promotor de la ARN polimerasa de un bacteriófago (promotor 1 o 2) para así transcribir la cadena complementaria de ADN en cadena molde de ARN (idéntica a la cadena original de ARNm), o transcribir la cadena molde de ADN en ARN complementario (ARN<sub>c</sub>, complementario al ARNm original). En la síntesis de cada una de las cadenas se añade nucleótidos marcados con azufre<sup>35</sup> para la detección del ARNm mediante la técnica de hibridación *in situ*. Posteriormente, si se añade las cadenas molde de ARN marcado sobre un tejido a estudio no se producirá hibridación, mientras que si se añade ARN<sub>c</sub> marcado, sí habrá hibridación con el ARNm y se observará marcaje sobre una película autoradiográfica.....38

**Figura 6.** Análisis de imágenes de hibridación *in situ* con el programa MCID. **(a)** El análisis de las secciones del hipocampo se realizó con moldes estándares para cada una de las regiones analizadas y se obtuvieron valores de densidad, área y densidad por área. **(b)** El análisis de las secciones de la corteza prefrontal se realizó mediante un sistema compartimental de bandas densitométricas entre la superficie pial y la sustancia blanca. El patrón de bandas se estableció colocando una plantilla estándar sobre la corteza y determinando, por análisis visual y computarizado, el patrón básico de distribución de marcaje. En el análisis cortical se obtuvieron valores de densidad. ....49

**Figura 7.** Imágenes digitalizadas de experimentos de hibridación *in situ* comparando los niveles de ARNm de receptores de serotonina en la corteza prefrontal dorsolateral

(CPFDL). **I:** Distribución de los receptores serotoninérgicos. **(a)** Expresión del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>; **(b)** Expresión del ARNm de 5-HT<sub>2A</sub>. Barra de escala = 10 mm. **II:** Comparación entre los grupos a estudio. **(a)** ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>; **(b)** ARNm de 5-HT<sub>2A</sub>. Abreviaciones: CON = control; DM = depresión mayor; TBP = trastorno bipolar; EQZ = esquizofrenia; B = banda; SB = sustancia blanca. Barra de escala = 5 mm. Ampliación: 12x. ....56

**Figura 8.** Niveles del ARNm de receptores de serotonina en la corteza prefrontal dorsolateral (CPFDL) en la depresión mayor (DM), el trastorno bipolar (TBP), la esquizofrenia (EQZ) y el grupo control (CON). **(a)** La expresión del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub> es significativamente diferente según el diagnóstico ( $p < 0.05$ ), debido a que el grupo con depresión mayor tiene niveles mas bajos de expresión que en el grupo control. **(b)** La expresión del ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> muestra diferencias significativas según el diagnóstico ( $p < 0.05$ ), debido a que el grupo con trastorno bipolar tiene niveles mas bajos de expresión que en el grupo control. Los datos son expresados como la media  $\pm$  EMS (n=15 por grupo). Abreviaciones: B = banda; DOI = Densidad Óptica Integrada; EMS = error medio estándar. ....57

**Figura 9.** Imágenes digitalizadas de experimentos de hibridación *in situ* comparando los niveles de ARNm de receptores de serotonina en el hipocampo (HC). El tejido procede de pacientes con depression mayor (DM), trastorno bipolar (TBP), esquizofrenia (EQZ) y sujetos normales (CON). **(a)** Expresión del ARNm de 5-HT<sub>1A</sub>; **(b)** Expresión del ARNm de 5-HT<sub>1B</sub>; **(c)** Expresión del ARNm de 5-HT<sub>2A</sub>. Abreviaturas: CA = áreas del asta de Ammon; GD = giro dentado. Barra de escala = 5 mm. ....58

**Figura 10.** Histograma de barras que ilustra los niveles de expresión de ARNm de los receptores de serotonina en regiones hipocampales de pacientes con depresión mayor (DM), trastorno bipolar (TBP), esquizofrenia (EQZ) y el grupo control (CON). **(a)** La expresión del ARNm del receptor 5-HT<sub>1A</sub> es significativamente diferente entre los grupos ( $p < 0.05$ ), debido a que el grupo con depresión mayor tiene niveles mas bajos de expresión que en el grupo control. **(b)** La expresión del ARNm de 5-HT<sub>1B</sub> es significativamente diferente según el diagnóstico ( $p < 0.05$ ), debido al mayor nivel de expresión del grupo con trastorno bipolar con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). El

análisis post-hoc también muestra que el grupo EQZ tiene una tendencia en la misma dirección ( $p=0.077$ ). (c) La expresión del ARNm de 5-HT<sub>2A</sub> es significativamente diferente según el diagnóstico ( $p<0.05$ ), debido a que los grupos con trastorno bipolar y esquizofrenia tienen niveles más bajos de expresión que en el grupo control. Los datos son expresados como la media  $\pm$  EMS ( $n=15$  por grupo). Abreviaciones: DxA = Densidad multiplicada por el Área; CA = áreas del asta de Ammon; GD = giro dentado; EMS = error medio estándar. ....59

**Figura 11.** Modelo de circuito neuronal por el cual el hipocampo podría modular la actividad dopaminérgica mesolímbica. La estimulación del subiculum activa eferencias glutamatérgicas directas hacia el núcleo accumbens (NAc). Esta conexión potencia la inhibición del NAc sobre las neuronas del palido ventral (PV). Como resultado se produciría la supresión de la inhibición tónica GABAérgica del PV sobre las neuronas del área tegmental ventral (ATV), y de esta manera habría un incremento en el número de neuronas dopaminérgicas del ATV que dispararían espontáneamente. Aunque también existe un circuito indirecto desde el subiculum al NAc a través de la corteza prefrontal, éste no parece ser crítico según los estudios de Floresco y cols (2001). Abreviaturas: CA = áreas del asta de Ammon; CFM = circunvolución frontal media; CFS = circunvolución frontal superior; GD = giro dentado.....66

## TABLAS

**Tabla 1.** Características de las muestras de los pacientes del Consorcio Neuropatológico de la Fundación Stanley. Abreviaturas: IPM = intervalo postmortem; H = hombre; M = mujer; C = caucásico; AA = afroamericano; A = excelente; B = bueno; C = aceptable; D = derecho; I = izquierdo. ....44

**Tabla 2.** Características clínicas de los pacientes del Consorcio Neuropatológico de la Fundación Stanley. ....44

**Tabla 3.** Características moleculares de los receptores de serotonina.....45

**Tabla 4.** Resumen de resultados. Comparación de los grupos psiquiátricos con el grupo control. ....55

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Adams B, Moghaddam B. Corticolimbic dopamine neurotransmission is temporally dissociated from the cognitive and locomotor effects of phencyclidine. *J Neurosci*. 1998 Jul 15;18(14):5545-54.
- Adham N, Romanienko P, Hartig P, Weinschenk RL, Branchek T. The rat 5-hydroxytryptamine<sub>1B</sub> receptor is the species homologue of the human 5-hydroxytryptamine<sub>1D</sub> beta receptor. *Mol Pharmacol*. 1992 Jan;41(1):1-7.
- Aghajanian GK, Bloom FE. Localization of tritiated serotonin in rat brain by electron-microscopic autoradiography. *J Pharmacol Exp Ther*. 1967 Apr;156(1):23-30.
- Aghajanian GK, Marek GJ. Serotonin model of schizophrenia: emerging role of glutamate mechanisms. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000 Mar;31(2-3):302-12. Review.
- Akil H, Haskett RF, Young EA, Grunhaus L, Kotun J, Weinberg V, Greden J, Watson SJ. Multiple HPA profiles in endogenous depression: effect of age and sex on cortisol and beta-endorphin. *Biol Psychiatry*. 1993 Jan 15;33(2):73-85.
- Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*. 1989 Oct;12(10):366-75. Review.
- Amaral DG, Insausti R. Hippocampal formation. The human nervous system. (eds. Paxinos G) 711-755 (Academic Press, San Diego, 1990).
- Amin AH, Crawford TBB, Gaddum JH. The distribution of substance P and 5-hydroxytryptamine in the central nervous system. *J Physiol*. 1954; 126, 596-618.
- Andreasen NC, Flaum M. Schizophrenia: the characteristic symptoms. *Schizophr Bull*. 1991;17(1):27-49. Review.
- Andreasen NC, Amdt S, Swayze V 2nd, Cizadlo T, Flaum M, O'Leary D, Ehrhardt JC, Yuh WT. Thalamic abnormalities in schizophrenia visualized through magnetic resonance image averaging. *Science*. 1994a Oct 14;266(5183):294-8.
- Andreasen NC, Nopoulos P, Schultz S, Miller D, Gupta S, Swayze V, Flaum M. Positive and negative symptoms of schizophrenia: past, present, and future. *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1994b; 384:51-9. Review.
- Andreasen NC. Pieces of the schizophrenia puzzle fall into place. *Neuron*. 1996 Apr;16(4):697-700. Review.
- Arango V, Emsberger P, Marzuk PM, Chen JS, Tierney H, Stanley M, Reis DJ, Mann JJ. Autoradiographic demonstration of increased serotonin 5-HT<sub>2</sub> and beta-adrenergic receptor binding sites in the brain of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* 1990; 47(11):1038-1047.
- Arango V, Underwood MD, Mann JJ. Alterations in monoamine receptors in the brain of suicide victims. *J Clin Psychopharmacol*. 1992 Apr;12(2 Suppl):8S-12S.
- Arango V, Underwood MD, Gubbi AV, Mann JJ. Localized alterations in pre- and postsynaptic serotonin binding sites in the ventrolateral prefrontal cortex of suicide victims. *Brain Res* 1995; 688(1-2):121-133.
- Arango V, Underwood MD, Mann JJ. Fewer pigmented locus coeruleus neurons in suicide victims: preliminary results. *Biol Psychiatry*. 1996 Jan 15;39(2):112-20.
- Arango V, Underwood MD, Boldrini M, Tamir H, Kassir SA, Hsiung S, Chen JJ, Mann JJ. Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology*. 2001 Dec;25(6):892-903.
- Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol*. 1999 Jan;160(1):1-12. Review.

- Arora RC, Meltzer HY. Serotonin<sub>2</sub> (5-HT<sub>2</sub>) receptor binding in the frontal cortex of schizophrenic patients. *J Neural Transm Gen Sect* 1991;85(1):19-29.
- Arranz B, Eriksson A, Mellerup E, Plenge P, Marcusson J. Brain 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, and 5-HT<sub>2</sub> receptors in suicide victims. *Biol Psychiatry* 1994; 35(7):457-463.
- Arranz MJ, Munro J, Owen MJ, Spurlock G, Sham PC, Zhao J, Kirov G, Collier DA, Kerwin RW. Evidence for association between polymorphisms in the promoter and coding regions of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene and response to clozapine. *Mol Psychiatry*. 1998 Jan;3(1):61-6.
- Avidsson LE, Hacksell U, Nilsson JL, Hjorth S, Carlsson A, Lindberg P, Sanchez D, Wikstrom H. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin, a new centrally acting 5-hydroxytryptamine receptor agonist. *J Med Chem*. 1981 Aug;24(8):921-3.
- Barnes NM, Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 1999; 38(8):1083-1152.
- Barta PE, Pearlson GD, Powers RE, Richards SS, Tune LE. Auditory hallucinations and smaller superior temporal gyrus volume in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1990 Nov;147(11):1457-62.
- Baumann B, Bogerts B. Neuroanatomical studies on bipolar disorder. *Br J Psychiatry Suppl*. 2001 Jun;41:s142-7. Review.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. *Neuroscience. Exploring the brain*. 546-575. (Williams and Wilkins, Baltimore, 1996).
- Benes FM. Altered glutamatergic and GABAergic mechanisms in the cingulate cortex of the schizophrenic brain. *Arch Gen Psychiatry*. 1995 Dec;52(12):1015-8; discussion 1019-24.
- Benes FM, Kwok EW, Vincent SL, Todtenkopf MS. A reduction of nonpyramidal cells in sector CA2 of schizophrenics and manic depressives. *Biol Psychiatry* 1998; 44(2):88-97.
- Benes FM. Emerging principles of altered neural circuitry in schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000 Mar;31(2-3):251-69. Review.
- Berrettini WH, Ferraro TN, Goldin LR, Weeks DE, Detera-Wadleigh S, Numberger JI Jr, Gershon ES. Chromosome 18 DNA markers and manic-depressive illness: evidence for a susceptibility gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 21;91(13):5918-21.
- Berrettini WH, Ferraro TN, Goldin LR, Detera-Wadleigh SD, Choi H, Muniec D, Guroff JJ, Kazuba DM, Numberger JI Jr, Hsieh WT, Hoehe MR, Gershon ES. A linkage study of bipolar illness. *Arch Gen Psychiatry*. 1997 Jan;54(1):27-35.
- Bertelsen A, Harvald B, Hauge M. A Danish twin study of manic-depressive disorders. *Br J Psychiatry*. 1977 Apr;130:330-51.
- Bing EG, Burnam MA, Longshore D, Fleishman JA, Sherbourne CD, London AS, Turner BJ, Eggan F, Beckman R, Vitiello B, Morton SC, Orlando M, Bozette SA, Ortiz-Barron L, Shapiro M. Psychiatric disorders and drug use among human immunodeficiency virus-infected adults in the United States. *Arch Gen Psychiatry*. 2001 Aug;58(8):721-8.
- Bleich A, Brown SL, Kahn R, van Praag HM. The role of serotonin in schizophrenia. *Schizophr Bull*. 1988;14(2):297-315. Review.
- Blier P, de Montigny C. Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci*. 1994 Jul;15(7):220-6. Review.
- Boschert U, Amara DA, Segu L, Hen R. The mouse 5-hydroxytryptamine<sub>1B</sub> receptor is localized predominantly on axon terminals. *Neuroscience*. 1994 Jan;58(1):167-82.
- Bowden C, Cheetham SC, Lowther S, Katona CL, Crompton MR, Horton RW. Dopamine uptake sites, labelled with [<sup>3</sup>H]GBR12935, in brain samples from depressed suicides and controls.

- Eur Neuropsychopharmacol. 1997 Nov;7(4):247-52.
- Bradley PB, Engel G, Feniuk W, Fozard JR, Humphrey PP, Middlemiss DN, Mylecharane EJ, Richardson BP, Saxena PR. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology*. 1986 Jun;25(6):563-76.
- Brodmann K. Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues, 1909. Leipzig: J. A. Barth. Traducido por Laurence Garey como: Localisation in the Cerebral Cortex .1994. London: Smith-Gordon.
- Bruinvels AT, Palacios JM, Hoyer D. Autoradiographic characterisation and localisation of 5-HT<sub>1D</sub> compared to 5-HT<sub>1B</sub> binding sites in rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1993 Jun;347(6):569-82.
- Bulik CM, Carpenter LL, Kupfer DJ, Frank E. Features associated with suicide attempts in recurrent major depression. *J Affect Disord*. 1990 Jan;18(1):29-37.
- Bunney WE Jr, Davis JM. Norepinephrine in depressive reactions. A review. *Arch Gen Psychiatry* 1965; 13(6):483-494.
- Bunney WE Jr, Garland-Bunney B, Patel SB. Biological markers in depression. *Psychopathology*. 1986;19 Suppl 2:72-8. Review.
- Burgess S, Geddes J, Hawton K, Townsend E, Jamison K, Goodwin G. Lithium for maintenance treatment of mood disorders. *Cochrane Database Syst Rev*. 2001;(2):CD003013. Review.
- Burnet PW, Eastwood SL, Lacey K, Harrison PJ. The distribution of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNA in human brain. *Brain Res* 1995; 676(1):157-168.
- Burnet PW, Eastwood SL, Harrison PJ. 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> receptor mRNAs and binding site densities are differentially altered in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 1996; 15(5):442-455.
- Butler MO, Morinobu S, Duman RS. Chronic electroconvulsive seizures increase the expression of serotonin<sub>2</sub> receptor mRNA in rat frontal cortex. *J Neurochem* 1993; 61(4):1270-1276.
- Calas A, Alonso G, Amaud E, Vincent JD. Demonstration of indolaminergic fibres in the media eminence of the duck, rat and monkey. *Nature*. 1974 Jul 19;250(463):241-3.
- Callado LF, Meana JJ, Grijalba B, Pazos A, Sastre M, Garcia-Sevilla JA. Selective increase of alpha<sub>2A</sub>-adrenoceptor agonist binding sites in brains of depressed suicide victims. *J Neurochem*. 1998 Mar;70(3):1114-23.
- Carlson JH, Bergstrom DA, Demo SD, Walters JR. Acute reduction of dopamine levels alters responses of basal ganglia neurons to selective D-1 and D-2 dopamine receptor stimulation. *Eur J Pharmacol*. 1988 Aug 2;152(3):289-300.
- Carlsson M, Carlsson A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia—implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends Neurosci*. 1990 Jul;13(7):272-6. Review.
- Carpenter MB, Sutin J. *Human Neuroanatomy*. 8th. 633. (Williams and Wilkins, Baltimore, 1983).
- Chalmers DT, Kwak SP, Mansour A, Akil H, Watson SJ. Corticosteroids regulate brain hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA expression. *J Neurosci* 1993; 13(3):914-923.
- Chalmers DT, López JF, Vazquez DM, Akil H, Watson SJ. Regulation of hippocampal 5-HT<sub>1A</sub> receptor gene expression by dexamethasone. *Neuropsychopharmacology* 1994; 10(3):215-222.
- Cheer SM, Goa KL. Fluoxetine: a review of its therapeutic potential in the treatment of depression associated with physical illness. *Drugs*. 2001;61(1):81-110. Review.
- Cheetham SC, Crompton MR, Katona CL, Horton RW. Brain 5-HT<sub>1</sub> binding sites in depressed

- suicides. *Psychopharmacology* 1990; 102(4):544-548.
- Chen YW, Dilsaver SC. Lifetime rates of suicide attempts among subjects with bipolar and unipolar disorders relative to subjects with other Axis I disorders. *Biol Psychiatry*. 1996 May 15;39(10):896-9.
- Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK. Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J Neurochem* 2000; 75(4):1729-1734.
- Chrobak JJ, Napier TC. Opioid and GABA modulation of accumbens-evoked ventral pallidal activity. *J Neural Transm Gen Sect*. 1993;93(2):123-43.
- Clay D. Mental health and psychosocial issues in HIV care. *Lippincotts Prim Care Pract*. 2000 Jan-Feb;4(1):74-82. Review.
- Coppen A. The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry*. 1967 Nov;113(504):1237-64. Review.
- Cowen PJ. A role for 5-HT in the action of antidepressant drugs. *Pharmacol Ther*. 1990;46(1):43-51. Review.
- Crawley JC, Owens DG, Crow TJ, Poulter M, Johnstone EC, Smith T, Oldland SR, Veall N, Owen F, Zanelli GD. Dopamine D2 receptors in schizophrenia studied in vivo. *Lancet*. 1986 Jul 26;2(8500):224-5.
- Creese I, Burt DR, Snyder SH. Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antischizophrenic drugs. *Science*. 1976 Apr 30;192(4238):481-3.
- Dahlstrom, A., Fuxe, K.: 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*. 1964; 62, Suppl. 232: 1-55.
- Dahlstrom, A., Fuxe, K.: Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. II. Experimentally induced changes in the intraneuronal amine levels of bulbospinal neuron systems. *Acta physiol. Scand*. 1965; 64, Suppl. 247: 1-36.
- Damasio H, Grabowski T, Frank R, Galaburda AM, Damasio AR. The return of Phineas Gage: clues about the brain from the skull of a famous patient. *Science*. 1994 May 20;264(5162):1102-5.
- Dean B, Hayes W. Decreased frontal cortical serotonin2A receptors in schizophrenia. *Schizophr Res* 1996; 21(3):133-139.
- Dean B, Hayes W, Hill C, Copolov D. Decreased serotonin2A receptors in Brodmann's area 9 from schizophrenic subjects. A pathological or pharmacological phenomenon? *Mol Chem Neuropathol* 1998; 34(2-3):133-145.
- Dean B, Tomaskovic-Crook E, Opeskin K, Keks N, Copolov D. No change in the density of the serotonin1A receptor, the serotonin4 receptor or the serotonin transporter in the dorsolateral prefrontal cortex from subjects with schizophrenia. *Neurochem Int* 1999a; 34(2):109-115.
- Dean B, Hussain T, Hayes W, Scarr E, Kitsoulis S, Hill C, Opeskin K, Copolov DL. Changes in serotonin2A and GABA(A) receptors in schizophrenia: studies on the human dorsolateral prefrontal cortex. *J Neurochem* 1999b; 72(4):1593-1599.
- Dean B, Pavey G, McLeod M, Opeskin K, Keks N, Copolov D. A change in the density of [(3)-H]flumazenil, but not [(3)-H]muscimol binding, in Brodmann's Area 9 from subjects with bipolar disorder. *J Affect Disord* 2001; 66(2-3):147-158.
- Descaries L, Beaudet A, Watkins KC. Serotonin nerve terminals in adult rat neocortex. *Brain Res*. 1975 Dec 26;100(3):563-88.
- Deutch AY, Moghaddam B, Innis RB, Krystal JH, Aghajanian GK, Bunney BS, Charney DS. Mechanisms of action of atypical antipsychotic drugs. Implications for novel therapeutic strategies for schizophrenia. *Schizophr Res*. 1991 Mar-Apr;4(2):121-56. Review.

- Deutch A, Roth R. Neurotransmitters. In: Zigmond M. (ed) *Fundamental Neuroscience*. Academic Press: San Diego, 1999, pp 208-212.
- Dilsaver SC, Chen YW, Swann AC, Shoab AM, Krajewski KJ. Suicidality in patients with pure and depressive mania. *Am J Psychiatry*. 1994 Sep;151(9):1312-5.
- Done CJ, Sharp T. Biochemical evidence for the regulation of central noradrenergic activity by 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors: microdialysis studies in the awake and anaesthetized rat. *Neuropharmacology* 1994; 33(3-4):411-421.
- Doucet E, Pohl M, Fattaccini CM, Adrien J, Mestikawy SE, Hamon M. In situ hybridization evidence for the synthesis of 5-HT<sub>1B</sub> receptor in serotonergic neurons of anterior raphe nuclei in the rat brain. *Synapse*. 1995 Jan;19(1):18-28.
- DSM -IV. American Psychiatric Association (1994). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders* (4th ed.). Washington, DC: American Psychiatric Association.
- Engel G, Gothert M, Hoyer D, Schlicker E, Hillenbrand K. Identity of inhibitory presynaptic 5-hydroxytryptamine (5-HT) autoreceptors in the rat brain cortex with 5-HT<sub>1B</sub> binding sites. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1986 Jan;332(1):1-7.
- Ersparmer V, Asero B. Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*. 1952;169:800-801.
- Falck B. Observations on the possibilities for cellular localization of monoamines with a fluorescence method. *Acta Physiol Scand Sup*. 1962; 197:1-25.
- Farber NB, Hanslick J, Kirby C, McWilliams L, Olney JW. Serotonergic agents that activate 5HT<sub>2A</sub> receptors prevent NMDA antagonist neurotoxicity. *Neuropsychopharmacology* 1998; 18(1):57-62.
- Fargin A, Raymond JR, Lohse MJ, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ. The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *Nature* 1988; 335(6188):358-360.
- Feldberg W, Hellon RF, Myers RD. Effects on temperature of monoamines injected into the cerebral ventricles of anaesthetized dogs. *J Physiol*. 1966 Oct;186(2):416-23.
- Fernstrom JD, Wurtman RJ. Brain serotonin content increase following ingestion of carbohydrate diet. *Science*. 1971 Dec 3;174(13):1023-5.
- Ferrando SJ, Wapenyi K. Psychopharmacological treatment of patients with HIV and AIDS. *Psychiatr Q*. 2002 Spring;73(1):33-49. Review
- Fink M. Meduna and the origins of convulsive therapy. *Am J Psychiatry*. 1984 Sep;141(9):1034-41.
- Francis PT, Pangalos MN, Pearson RC, Middlemiss DN, Stratmann GC, Bowen DM. 5-Hydroxytryptamine<sub>1A</sub> but not 5-hydroxytryptamine<sub>2</sub> receptors are enriched on neocortical pyramidal neurones destroyed by intrastriatal volkensin. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992 Jun;261(3):1273-81.
- Gaddum JH. Antagonism between lysergic acid diethylamide and 5-hydroxytryptamine. *J Physiol London* 1953; 121: 15.
- Gaddum JH, Hammeed KA. Drugs which antagonize 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol* 1954; 9: 240-248.
- Gaddum JH, Picarelli ZP. Two kinds of tryptamine receptor. 1957. *Br J Pharmacol*. 1997 Feb;120(4 Suppl):134-9; discussion 132-3.
- Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1969 Jun;63(2):378-83.
- Giovannini MG, Mutolo D, Bianchi L, Michelassi A, Pepeu G. NMDA receptor antagonists decrease GABA outflow from the septum and increase acetylcholine outflow from the hippocampus: a microdialysis study. *J Neurosci*. 1994 Mar;14(3 Pt 1):1358-65.

- Glick ID, Suppes T, DeBattista C, Hu RJ, Marder S. Psychopharmacologic treatment strategies for depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Ann Intern Med.* 2001 Jan 2;134(1):47-60. Review.
- Gold PW, Goodwin FK, Chrousos GP. Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to the neurobiology of stress. *N Eng J Med* 1988; 319:413-420.
- Golden RN, Gilmore JH, Corrigan MH, Ekstrom RD, Knight BT, Garbutt JC. Serotonin, suicide, and aggression: clinical studies. *J Clin Psychiatry.* 1991 Dec;52 Suppl:61-9. Review.
- Goldman-Rakic PS. Development of cortical circuitry and cognitive function. *Child Dev.* 1987 Jun;58(3):601-22.
- Goldman-Rakic PS. Working memory dysfunction in schizophrenia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 1994 Fall;6(4):348-57. Review.
- Goodwin GM. Neuropsychological and neuroimaging evidence for the involvement of the frontal lobes in depression. *J Psychopharmacol.* 1997;11(2):115-22. Review.
- Gorzalka BB, Mendelson SD, Watson NV. Serotonin receptor subtypes and sexual behavior. *Ann N Y Acad Sci.* 1990;600:435-44; discussion 445-6. Review.
- Goulet JL, Molde S, Constantino J, Gaughan D, Selwyn PA. Psychiatric comorbidity and the long-term care of people with AIDS. *J Urban Health.* 2000 Jun;77(2):213-21.
- Grace AA. Gating of information flow within the limbic system and the pathophysiology of schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000 Mar;31(2-3):330-41. Review.
- Greenberg PE, Stiglin LE, Finkelstein SN, Berndt ER. The economic burden of depression in 1990. *J Clin Psychiatry.* 1993 Nov;54(11):405-18.
- Gulya K. The opioid system in neurologic and psychiatric disorders and in their experimental models. *Pharmacol Ther.* 1990; 46(3):395-428. Review.
- Gurevich I, Tamir H, Arango V, Dwork AJ, Mann JJ, Schmauss C. Altered editing of serotonin 2C receptor pre-mRNA in the prefrontal cortex of depressed suicide victims. *Neuron.* 2002 Apr 25;34(3):349-56.
- Hamblin MW, Metcalf MA, McGuffin RW, Karpells S. Molecular cloning and functional characterization of a human 5-HT1B serotonin receptor: a homologue of the rat 5-HT1B receptor with 5-HT1D-like pharmacological specificity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 Apr 30;184(2):752-9.
- Harlow JM. Passage of an iron rod through the head. *Boston Medical and Surgical Journal.* 1848; 39, 389-393.
- Harrison PJ. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation. *Brain* 1999a; 122 (Pt4):593-624. Review.
- Harrison PJ. The neuropathological effects of antipsychotic drugs. *Schizophr Res.* 1999b Nov 30;40(2):87-99. Review.
- Harrison PJ. Neurochemical alterations in schizophrenia affecting the putative receptor targets of atypical antipsychotics. Focus on dopamine (D1, D3, D4) and 5-HT2a receptors. *Br J Psychiatry Suppl.* 1999c;(38):12-22. Review.
- Harrison PJ, Eastwood SL. Neuropathological studies of synaptic connectivity in the hippocampal formation in schizophrenia. *Hippocampus.* 2001;11(5):508-19. Review.
- Hartig PR, Hoyer D, Humphrey PP, Martin GR. Alignment of receptor nomenclature with the human genome: classification of 5-HT1B and 5-HT1D receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci* 1996; 17(3):103-105.
- Hasegawa M, Kinoshita H, Amano M, Hasegawa T, Kameyama T, Nabeshima T. MK-801 increases endogenous acetylcholine release in the rat

- parietal cortex: a study using brain microdialysis. *Neurosci Lett*. 1993 Feb 5;150(1):53-6.
- Hashimoto T, Nishino N, Nakai H, Tanaka C. Increase in serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors in prefrontal and temporal cortices of brains from patients with chronic schizophrenia. *Life Sci* 1991; 48(4):355-363.
- Herman JP, Schafer MK, Young EA, Thompson R, Douglass J, Akil H, Watson SJ. Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Neurosci*. 1989 Sep;9(9):3072-82.
- Hermann D, Heinz A, Mann K. Dysregulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in alcoholism. *Addiction*. 2002 Nov;97(11):1369-1381.
- Hjorth S, Magnusson T. The 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist, 8-OH-DPAT, preferentially activates cell body 5-HT autoreceptors in rat brain in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1988 Nov;338(5):463-71.
- Hjorth S, Sharp T. Effect of the 5-HT<sub>1A</sub> receptor agonist 8-OH-DPAT on the release of 5-HT in dorsal and median raphe-innervated rat brain regions as measured by in vivo microdialysis. *Life Sci*. 1991;48(18):1779-86.
- Hjorth S, Tao R. The putative 5-HT<sub>1B</sub> receptor agonist CP-93,129 suppresses rat hippocampal 5-HT release in vivo: comparison with RU 24969. *Eur J Pharmacol*. 1991 Dec 17;209(3):249-52.
- Hjorth S, Bengtsson HJ, Milano S, Lundberg JF, Sharp T. Studies on the role of 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors and alpha 1-adrenoceptors in the inhibition of 5-HT release-I. BMJ7378 and prazosin. *Neuropharmacology*. 1995 Jun;34(6):615-20.
- Hoffman BJ, Mezey E. Distribution of serotonin 5-HT<sub>1C</sub> receptor mRNA in adult rat brain. *FEBS Lett*. 1989 Apr 24;247(2):453-62.
- Honigfeld G, Patin J. Predictors of response to clozapine therapy. *Psychopharmacology (Berl)*. 1989;99 Suppl:S64-7.
- Homung JP, Fritschy JM, Tork I. Distribution of two morphologically distinct subsets of serotonergic axons in the cerebral cortex of the marmoset. *J Comp Neurol*. 1990 Jul 8;297(2):165-81.
- Homykiewicz O. Brain catecholamines in schizophrenia: a good case for noradrenaline. *Nature*. 1982 Oct 7;299(5883):484-6.
- Hoyer D, Engel G, Kalkman HO. Characterization of the 5-HT<sub>1B</sub> recognition site in rat brain: binding studies with (-)[125I]iodocyanopindolol. *Eur J Pharmacol*. 1985 Nov 26;118(1-2):1-12.
- Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev*. 1994 Jun;46(2):157-203. Review.
- Hoyer D, Martin G. 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology*. 1997 Apr-May;36(4-5):419-28. Review.
- Humphrey PP, Hartig P, Hoyer D. A proposed new nomenclature for 5-HT receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 1993 Jun;14(6):233-6. Review.
- Hyman SE. Introduction to the complex genetics of mental disorders. *Biol Psychiatry*. 1999 Mar 1;45(5):518-21.
- Izumi J, Washizuka M, Miura N, Hiraga Y, Ikeda Y. Hippocampal serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor enhances acetylcholine release in conscious rats. *J Neurochem* 1994; 62(5):1804-1808.
- Jablensky A, Sartorius N. Is schizophrenia universal? *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 1988;344:65-70. Review.
- Jamison KR. Suicide and bipolar disorder. *J Clin Psychiatry*. 2000;61 Suppl 9:47-51. Review.

- Janowsky DS, Overstreet DH. The role of acetylcholine mechanisms in mood disorders. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. (eds. Bloom FE, Kupfer DJ) 911-920 (Raven, New York, 1995).
- Jin H, Oksenberg D, Ashkenazi A, Peroutka SJ, Duncan AM, Rozmahel R, Yang Y, Mengod G, Palacios JM, O'Dowd BF. Characterization of the human 5-hydroxytryptamine<sub>1B</sub> receptor. *J Biol Chem* 1992; 267(9):5735-5738.
- John HA, Birnstiel ML, Jones KW. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*. 1969 Aug 9;223(206):582-7.
- Johnson SW, Mercuri NB, North RA. 5-hydroxytryptamine<sub>1B</sub> receptors block the GABA<sub>B</sub> synaptic potential in rat dopamine neurons. *J Neurosci*. 1992 May;12(5):2000-6.
- Johnstone EC, Crow TJ, Frith CD, Husband J, Kreef L. Cerebral ventricular size and cognitive impairment in chronic schizophrenia. *Lancet* 1976; 2(7992):924-926.
- Johnstone EC, Bruton CJ, Crow TJ, Frith CD, Owens DG. Clinical correlates of postmortem brain changes in schizophrenia: decreased brain weight and length correlate with indices of early impairment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994; 57(4):474-479.
- Jones DL, Mogenson GJ. Nucleus accumbens to globus pallidus GABA projection subserving ambulatory activity. *Am J Physiol*. 1980 Jan;238(1):R65-9.
- Jouvet M. Neurophysiology of the states of sleep. *Physiol Rev*. 1967 Apr;47(2):117-77. Review.
- Joyce JN. The dopamine hypothesis of schizophrenia: limbic interactions with serotonin and norepinephrine. *Psychopharmacology* 1993;112(1 Suppl):S16-34. Review.
- Joyce JN, Shane A, Lexow N, Winokur A, Casanova MF, Kleinman JE. Serotonin uptake sites and serotonin receptors are altered in the limbic system of schizophrenics. *Neuropsychopharmacology* 1993; 8(4): 315-336.
- Joyce JN, Goldsmith SG, Gurevich EV. Limbic circuits and monoamine receptors: dissecting the effects of antipsychotics from disease processes. *J Psychiatr Res*. 1997 Mar-Apr;31(2):197-217. Review.
- Joyce JN, Meador-Woodruff JH. Linking the family of D<sub>2</sub> receptors to neuronal circuits in human brain: insights into schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*. 1997 Jun;16(6):375-84. Review.
- Julius D, Huang KN, Livelli TJ, Axel R, Jessell TM. The 5HT<sub>2</sub> receptor defines a family of structurally distinct but functionally conserved serotonin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Feb;87(3):928-32.
- Julius D, MacDermott AB, Jessell TM, Huang K, Molineaux S, Schieren I, Axel R. Functional expression of the 5-HT<sub>1c</sub> receptor in neuronal and nonneuronal cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1988;53 Pt 1:385-93.
- Kalivas PW, Churchill L, Klitenick MA. GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and ventral pallidum to the ventral tegmental area. *Neuroscience*. 1993 Dec;57(4):1047-60.
- Kane JM, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H. Clozapine in treatment-resistant schizophrenics. *Psychopharmacol Bull*. 1988;24(1):62-7.
- Kapur S, Remington G. Serotonin-dopamine interaction and its relevance to schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 1996 Apr;153(4):466-76. Review.
- Kelly J, Murray RM. What risk factors tell us about the causes of schizophrenia and related psychoses. *Curr Psychiatry Rep*. 2000 Oct;2(5):378-85. Review.
- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA. Causal relationship between stressful life events and the



- onset of major depression. *Am J Psychiatry*. 1999 Jun;156(6):837-41.
- Kent JM. SNaRIs, NaSSAs, and NaRIs: new agents for the treatment of depression. *Lancet*. 2000 Mar 11;355(9207):911-8. Review.
- Kerwin R, Robinson P, Stephenson J. Distribution of CCK binding sites in the human hippocampal formation and their alteration in schizophrenia: a post-mortem autoradiographic study. *Psychol Med*. 1992 Feb; 22(1):37-43.
- Kim SH, Price MT, Olney JW, Farber NB. Excessive cerebrocortical release of acetylcholine induced by NMDA antagonists is reduced by GABAergic and alpha2-adrenergic agonists. *Mol Psychiatry*. 1999 Jul;4(4):344-52.
- Klimek V, Stockmeier C, Overholser J, Meltzer HY, Kalka S, Dilley G, Ordway GA. Reduced levels of norepinephrine transporters in the locus coeruleus in major depression. *J Neurosci*. 1997 Nov 1;17(21):8451-8.
- Knable MB, Torrey EF, Webster MJ, Bartko JJ. Multivariate analysis of prefrontal cortical data from the Stanley Foundation Neuropathology Consortium. *Brain Res Bull* 2001; 55(5):651-659.
- Knable MB, Barci BM, Bartko JJ, Webster MJ, Torrey EF. Molecular abnormalities in the major psychiatric illnesses: Classification and Regression Tree (CRT) analysis of post-mortem prefrontal markers. *Mol Psychiatry* 2002; 7(4):392-404.
- Knapp S, Mandell AJ. Short- and long-term lithium administration: effects on the brain's serotonergic biosynthetic systems. *Science* 1973; 180(86):645-647.
- Kraepelin E. *Manic-depressive insanity and paranoia*. E&S Livingstone; Edinburgh. 1921.
- Kreiss DS, Lucki I. Differential regulation of serotonin (5-HT) release in the striatum and hippocampus by 5-HT1A autoreceptors of the dorsal and median raphe nuclei. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994 Jun;269(3):1268-79.
- Kursar JD, Nelson DL, Wainscott DB, Cohen ML, Baez M. Molecular cloning, functional expression, and pharmacological characterization of a novel serotonin receptor (5-hydroxytryptamine2F) from rat stomach fundus. *Mol Pharmacol*. 1992 Oct;42(4):549-57.
- Laruelle M, Abi-Dargham A, Casanova MF, Toi R, Weinberger DR, Kleinman JE. Selective abnormalities of prefrontal serotonergic receptors in schizophrenia. A postmortem study. *Arch Gen Psychiatry* 1993; 50(10):810-8.
- Lieberman JA, Koreen AR. Neurochemistry and neuroendocrinology of schizophrenia: a selective review. *Schizophr Bull*. 1993;19(2):371-429. Review.
- Lindstrom LH. The effect of long-term treatment with clozapine in schizophrenia: a retrospective study in 96 patients treated with clozapine for up to 13 years. *Acta Psychiatr Scand*. 1988 May;77(5):524-9.
- López JF, Vazquez DM, Chalmers DT, Watson SJ. Regulation of 5-HT receptors and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Implications for the neurobiology of suicide. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 836:106-134.
- López JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ. A.E. Bennett Research Award. Regulation of serotonin1A, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. *Biol Psychiatry* 1998; 43(8):547-573.
- López JF, Akil H, Watson SJ. Neural circuits mediating stress. *Biol Psychiatry* 1999; 46(11):1461-1471. Review.
- López-Figueroa AL, López-Figueroa MO, Armellini-Dodel DR, Watson SJ, López JF. "Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptor mRNA Levels in the brains of subject with Depression, Bipolar Disorder, and Schizophrenia." Society for Neurosciences, San Diego, Nov 2001.

- López-Figueroa MO, Day HE, Lee S, Rivier C, Akil H, Watson SJ. Temporal and anatomical distribution of nitric oxide synthase mRNA expression and nitric oxide production during central nervous system inflammation. *Brain Res* 2000; 852(1):239-246.
- Lorente de Nó R. Studies on the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of ammonic system. *Journal für Psychologie und Neurologie*. 1934; 46:113-77.
- Lowther S, De Paermentier F, Cheetham SC, Crompton MR, Katona CL, Horton RW. 5-HT<sub>1A</sub> receptor binding sites in post-mortem brain samples from depressed suicides and controls. *J Affect Disord* 1997; 42(2-3):199-207.
- Mackay AV, Iversen LL, Rossor M, Spokes E, Bird E, Aregui A, Creese I, Snyder SH. Increased brain dopamine and dopamine receptors in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry*. 1982 Sep;39(9):991-7.
- Mahmood T, Silverstone T. Serotonin and bipolar disorder. *J Affect Disord*. 2001 Sep;66(1):1-11. Review.
- Malone KM, Haas GL, Sweeney JA, Mann JJ. Major depression and the risk of attempted suicide. *J Affect Disord*. 1995 Jun 8;34(3):173-85.
- Manji HK, Chen G, Shimon H, Hsiao JK, Potter WZ, Belmaker RH. Guanine nucleotide-binding proteins in bipolar affective disorder. Effects of long-term lithium treatment. *Arch Gen Psychiatry*. 1995 Feb;52(2):135-44.
- Manji HK, Lenox RH. Lithium: a molecular transducer of mood-stabilization in the treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology*. 1998 Sep;19(3):161-6. Review.
- Manji HK, Moore GJ, Rajkowska G, Chen G. Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders. *Mol Psychiatry* 2000; 5(6):578-593.
- Manji HK, Drevets WC, Chamey DS. The cellular neurobiology of depression. *Nat Med*. 2001 May;7(5):541-7. Review.
- Mann JJ, Stanley M, McBride PA, McEwen BS. Increased serotonin<sub>2</sub> and beta-adrenergic receptor binding in the frontal cortices of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* 1986; 43(10):954-959.
- Mann JJ, Arango V, Marzuk PM, Theccanat S, Reis DJ. Evidence for the 5-HT hypothesis of suicide. A review of post-mortem studies. *Br J Psychiatry Suppl*. 1989 Dec;(8):7-14. Review.
- Mann JJ, Arango V. Integration of neurobiology and psychopathology in a unified model of suicidal behavior. *J Clin Psychopharmacol*. 1992 Apr;12(2 Suppl):2S-7S. Review.
- Mann JJ, Oquendo M, Underwood MD, Arango V. The neurobiology of suicide risk: a review for the clinician. *J Clin Psychiatry*. 1999;60 Suppl 2:7-11; discussion 18-20, 113-6. Review.
- Mann JJ, Brent DA, Arango V. The neurobiology and genetics of suicide and attempted suicide: a focus on the serotonergic system. *Neuropsychopharmacology*. 2001 May;24(5):467-77. Review.
- Matsubara S, Arora RC, Meltzer HY. Serotonergic measures in suicide brain: 5-HT<sub>1A</sub> binding sites in frontal cortex of suicide victims. *J Neural Transm Gen Sect* 1991; 85(3):181-194.
- Maura G, Roccatagliata E, Raiteri M. Serotonin autoreceptor in rat hippocampus: pharmacological characterization as a subtype of the 5-HT<sub>1</sub> receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1986a Dec;334(4):323-6.
- Maura G, Raiteri M. Cholinergic terminals in rat hippocampus possess 5-HT<sub>1B</sub> receptors mediating inhibition of acetylcholine release. *Eur J Pharmacol*. 1986b Oct 7;129(3):333-7.
- McCall WV. Electroconvulsive therapy in the era of modern psychopharmacology. *Int J*

- Neuropsychopharmacol. 2001 Sep;4(3):315-24. Review.
- McCarthy G, Blamire AM, Puce A, Nobre AC, Bloch G, Hyder F, Goldman-Rakic P, Shulman RG. Functional magnetic resonance imaging of human prefrontal cortex activation during a spatial working memory task. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Aug 30;91(18):8690-4.
- McCarthy G, Puce A, Constable RT, Krystal JH, Gore JC, Goldman-Rakic P. Activation of human prefrontal cortex during spatial and nonspatial working memory tasks measured by functional MRI. *Cereb Cortex*. 1996 Jul-Aug;6(4):600-11.
- McGuffin P, Owen MJ, Farmer AE. Genetic basis of schizophrenia. *Lancet*. 1995 Sep 9; 346(8976):678-82.
- Meador-Woodruff JH, Greden JF, Grunhaus L, Haskett RF. Severity of depression and hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation: identification of contributing factors. *Acta Psychiatr Scand* 1990; 81(4):364-371.
- Meador-Woodruff JH, Healy DJ. Glutamate receptor expression in schizophrenic brain. *Brain Res Brain Res Rev*. 2000 Mar;31(2-3):288-94. Review.
- Meijer OC, de Kloet ER. Corticosterone and serotonergic neurotransmission in the hippocampus: functional implications of central corticosteroid receptor diversity. *Crit Rev Neurobiol* 1998; 12(1-2):1-20.
- Meltzer H. Serotonergic dysfunction in depression. *Br J Psychiatry* 1989; 155: 25-31.
- Meltzer HY, Matsubara S, Lee JC. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D-1, D-2 and serotonin<sub>2</sub> pK<sub>i</sub> values. *J Pharmacol Exp Ther*. 1989 Oct;251(1):238-46.
- Meltzer HY. The role of serotonin in schizophrenia and the place of serotonin-dopamine antagonist antipsychotics. *J Clin Psychopharmacol*. 1995 Feb;15(1 Suppl 1):2S-3S.
- Meltzer CC, Smith G, DeKosky ST, Pollock BG, Mathis CA, Moore RY, Kupfer DJ, Reynolds CF. Serotonin in aging, late-life depression, and Alzheimer's disease: the emerging role of functional imaging. *Neuropsychopharmacology*. 1998 Jun;18(6):407-30. Review.
- Mendelson SD, McEwen BS. Autoradiographic analyses of the effects of restraint-induced stress on 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1C</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the dorsal hippocampus of male and female rats. *Neuroendocrinology* 1991; 54(5):454-461.
- Mendelson SD, McEwen BS. Autoradiographic analyses of the effects of adrenalectomy and corticosterone on 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors in the dorsal hippocampus and cortex of the rat. *Neuroendocrinology* 1992; 55(4):444-450.
- Mendlewicz J, Rainer JD. Morbidity risk and genetic transmission in manic-depressive illness. *Am J Hum Genet*. 1974 Nov;26(6):692-701.
- Meneses A. Physiological, pathophysiological and therapeutic roles of 5-HT systems in learning and memory. *Rev Neurosci*. 1998;9(4):275-89. Review.
- Meneses A. 5-HT system and cognition. *Neurosci Biobehav Rev*. 1999 Dec;23(8):1111-25. Review.
- Mengod G, Nguyen H, Le H, Waeber C, Lubbert H, Palacios JM. The distribution and cellular localization of the serotonin 1C receptor mRNA in the rodent brain examined by in situ hybridization histochemistry. Comparison with receptor binding distribution. *Neuroscience*. 1990a;35(3):577-91.
- Mengod G, Pompeiano M, Martinez-Mir MI, Palacios JM. Localization of the mRNA for the 5-HT<sub>2</sub> receptor by in situ hybridization histochemistry. Correlation with the distribution of receptor sites. *Brain Res*. 1990b Jul 30;524(1):139-43.
- Metcalf MA, McGuffin RW, Hamblin MW. Conversion of the human 5-HT<sub>1D</sub> beta serotonin receptor to the rat 5-HT<sub>1B</sub> ligand-binding phenotype by

- Thr355Asn site directed mutagenesis. *Biochem Pharmacol.* 1992 Nov 17;44(10):1917-20.
- Miquel MC, Doucet E, Riad M, Adrien J, Verge D, Hamon M. Effect of the selective lesion of serotonergic neurons on the regional distribution of 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 1992 Aug;14(4):357-62.
- Mita T, Hanada S, Nishino N, Kuno T, Nakai H, Yamadori T, Mizoi Y, Tanaka C. Decreased serotonin S<sub>2</sub> and increased dopamine D<sub>2</sub> receptors in chronic schizophrenics. *Biol Psychiatry* 1986;21(14):1407-1414.
- Moghaddam B, Adams B, Verma A, Daly D. Activation of glutamatergic neurotransmission by ketamine: a novel step in the pathway from NMDA receptor blockade to dopaminergic and cognitive disruptions associated with the prefrontal cortex. *J Neurosci.* 1997 Apr 15;17(8):2921-7.
- Molineaux SM, Jessell TM, Axel R, Julius D. 5-HT<sub>1c</sub> receptor is a prominent serotonin receptor subtype in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Sep;86(17):6793-7.
- Mongeau R, Blier P, de Montigny C. The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res Brain Res Rev.* 1997 Apr;23(3):145-95. Review.
- Moret C, Biley M. The possible role of 5-HT(1B/D) receptors in psychiatric disorders and their potential as a target for therapy. *Eur J Pharmacol* 2000; 404(1-2):1-12. Review.
- Morilak DA, Gartow SJ, Ciaranello RD. Immunocytochemical localization and description of neurons expressing serotonin<sub>2</sub> receptors in the rat brain. *Neuroscience.* 1993 Jun;54(3):701-17.
- National Institute of Mental Health's Genetics Workgroup. Genetics and mental disorders. *Biol Psychiatry.* 1999 Mar 1;45(5):559-73.
- Nemeroff CB, Owens MJ, Bissette G, Andorn AC, Stanley M. Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the frontal cortex of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry.* 1988 Jun;45(6):577-9.
- Nemeroff CB. The neurobiology of depression. *Sci Am* 1998;278: 42-49.
- Nemeroff CB, Compton MT, Berger J. The depressed suicidal patient. Assessment and treatment. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Apr;932:1-23. Review.
- Nemeroff CB, Owens MJ. Treatment of mood disorders. *Nat Neurosci.* 2002 Nov;5 Suppl 1:1068-70.
- Norton CS, Neal CR, Kumar S, Akil H, Watson SJ. Nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor-like receptor mRNA expression in dopamine systems. *J Comp Neurol* 2002; 444(4):358-368.
- Olney JW, Farber NB. Glutamate receptor dysfunction and schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry.* 1995 Dec;52(12):998-1007.
- Olney JW, Newcomer JW, Farber NB. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J Psychiatr Res* 1999; 33(6):523-533. Review.
- Olney JW, Newcomer JW, Farber NB. Is NMDA Receptor Hypofunction in Schizophrenia Associated With a Primary Hyperglutamatergic State? *Arch Gen Psychiatry* 2002; 59(5):466-468.
- Ongur D, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Oct 27;95(22):13290-5.
- Osmond H, Smythies JR. Schizophrenia: a new approach, *J. Ment. Sci.* 1952; 98: 309-315.
- Oquendo MA, Watemau C, Brodsky B, Parsons B, Haas GL, Malone KM, Mann JJ. Suicidal behavior in bipolar mood disorder: clinical characteristics of attempters and nonattempters. *J Affect Disord.* 2000 Aug;59(2):107-17.
- Owen F, Cross AJ, Crow TJ, Longden A, Poulter M, Riley GJ. Increased dopamine-receptor sensitivity in schizophrenia. *Lancet.* 1978 Jul 29;2(8083):223-6.

- Park S, Holzman PS. Schizophrenics show spatial working memory deficits. *Arch Gen Psychiatry*. 1992 Dec;49(12):975-82.
- Pasqualetti M, Nardi I, Ladinsky H, Marazziti D, Cassano GB. Comparative anatomical distribution of serotonin 1A, 1D alpha and 2A receptor mRNAs in human brain postmortem. *Brain Res Mol Brain Res* 1996; 39(1-2):223-233.
- Pazos A, Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. I. Serotonin-1 receptors. *Brain Res*. 1985 Nov 4;346(2):205-30.
- Pazos A, Cortes R, Palacios JM. Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res*. 1985 Nov 4;346(2):231-49.
- Pazos A, Probst A, Palacios JM. Serotonin receptors in the human brain—III. Autoradiographic mapping of serotonin-1 receptors. *Neuroscience* 1987a; 21(1):97-122.
- Pazos A, Probst A, Palacios JM. Serotonin receptors in the human brain—IV. Autoradiographic mapping of serotonin-2 receptors. *Neuroscience* 1987b; 21(1):123-139.
- Pearce BD. Schizophrenia and viral infection during neurodevelopment: a focus on mechanisms. *Mol Psychiatry*. 2001 Nov; 6(6):634-46. Review.
- Pedigo NW, Yamamura HI, Nelson DL. Discrimination of multiple [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine binding sites by the neuroleptic spiperone in rat brain. *J Neurochem*. 1981 Jan;36(1):220-6.
- Perez-Cruet J, Tagliamonte A, Tagliamonte P, Gessa GL. Stimulation of serotonin synthesis by lithium. *J Pharmacol Exp Ther* 1971; 178(2):325-330.
- Peroutka SJ, Snyder SH. Multiple serotonin receptors: differential binding of [<sup>3</sup>H]5-hydroxytryptamine, [<sup>3</sup>H]lysergic acid diethylamide and [<sup>3</sup>H]spiperidol. *Mol Pharmacol*. 1979 Nov;16(3):687-99.
- Peroutka SJ, Snyder SH. Regulation of serotonin2 (5-HT<sub>2</sub>) receptors labeled with [<sup>3</sup>H]spiperidol by chronic treatment with the antidepressant amitriptyline. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 215(3):582-587.
- Peroutka SJ. Molecular biology of serotonin (5-HT) receptors. *Synapse*. 1994 Nov;18(3):241-60. Review.
- Pochet R, Brocas H, Vassart G, Toubeau G, Seo H, Refetoff S, Dumont JE, Pasteels JL. Radioautographic localization of prolactin messenger RNA on histological sections by in situ hybridization. *Brain Res*. 1981 May 4;211(2):433-8.
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT<sub>1A</sub> receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci* 1992; 12(2):440-453.
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. Distribution of the serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor family mRNAs: comparison between 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 23(1-2):163-178.
- Porrino LJ, Goldman-Rakic PS. Brainstem innervation of prefrontal and anterior cingulate cortex in the rhesus monkey revealed by retrograde transport of HRP. *J Comp Neurol*. 1982 Feb 10;205(1):63-76.
- Prange AJ Jr, Wilson IC, Lynn CW, Alltop LB, Stikeleather RA. L-tryptophan in mania. Contribution to a permissive hypothesis of affective disorders. *Arch Gen Psychiatry* 1974; 30(1):56-62.
- Price LH, Charney DS, Delgado PL, Heninger GR. Lithium and serotonin function: implications for the serotonin hypothesis of depression. *Psychopharmacology* 1990;100(1):3-12.
- Rajkowska G. Morphometric methods for studying the prefrontal cortex in suicide victims and psychiatric patients. *Ann N Y Acad Sci*. 1997 Dec 29;836:253-68. Review.

- Rajkowska G. Postmortem studies in mood disorders indicate altered numbers of neurons and glial cells. *Biol Psychiatry* 2000; 48(8):766-777.
- Rajkowska G, Halaris A, Selemon LD. Reductions in neuronal and glial density characterize the dorsolateral prefrontal cortex in bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2001; 49(9):741-752.
- Rapport MM, Green AA, Page IH. Serum vasoconstrictor (serotonin) IV. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 1948; 176: 1243-1251.
- Reynolds GP, Rossor MN, Iversen LL. Preliminary studies of human cortical 5-HT<sub>2</sub> receptors and their involvement in schizophrenia and neuroleptic drug action. *J Neural Transm Suppl* 1983;18:273-277.
- Risch SC, Nemeroff CB. Neurochemical alterations of serotonergic neuronal systems in depression. *J Clin Psychiatry*. 1992 Oct; 53 Suppl:3-7. Review.
- Roca AL, Weaver DR, Reppert SM. Serotonin receptor gene expression in the rat suprachiasmatic nuclei. *Brain Res*. 1993 Apr 9;608(1):159-65.
- Rosenberg PB, Rosse RB, Schwartz BL, Deutsch SI. Nefazodone in the adjunctive therapy of schizophrenia: an open-label exploratory study. *Clin Neuropharmacol*. 2000 Jul-Aug;23(4):222-5.
- Sartorius N, Ustun TB, Lecrubier Y, Wittchen HU. Depression comorbid with anxiety: results from the WHO study on psychological disorders in primary health care. *Br J Psychiatry Suppl*. 1996 Jun;(30):38-43.
- Sawa A, Snyder SH. Schizophrenia: diverse approaches to a complex disease. *Science* 2002; 296(5568):692-695.
- Scarr E, Copolov DL, Dean B. A proposed pathological model in the hippocampus of subjects with schizophrenia. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28(1-2): 70-73.
- Schatzberg AF, Schildkraut JJ. Recent studies on norepinephrine systems in mood disorders. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. (eds. Bloom FE, Kupfer DJ) 911-920 (Raven, New York, 1995).
- Seeman P, Chau-Wong M, Tedesco J, Wong K. Dopamine receptors in human and calf brains, using [<sup>3</sup>H]apomorphine and an antipsychotic drug. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Dec;73(12):4354-8.
- Seeman P, Ulpian C, Bergeron C, Riederer P, Jellinger K, Gabriel E, Reynolds GP, Tourtellotte WW. Bimodal distribution of dopamine receptor densities in brains of schizophrenics. *Science*. 1984 Aug 17;225(4663):728-31.
- Selemon LD, Rajkowska G, Goldman-Rakic PS. Abnormally high neuronal density in the schizophrenic cortex. A morphometric analysis of prefrontal area 9 and occipital area 17. *Arch Gen Psychiatry*. 1995 Oct;52(10):805-18; discussion 819-20.
- Serretti A, Lorenzi C, Lilli R, Smeraldi E. Serotonin receptor 2A, 2C, 1A genes and response to lithium prophylaxis in mood disorders. *J Psychiatr Res*. 2000 Mar-Apr;34(2):89-98.
- Sheard MH, Aghajanian GK. Neuronally activated metabolism of brain serotonin: effect of lithium. *Life Sci* 1970; 9(5):285-290.
- Shenton ME, Kikinis R, Jolesz FA, Polak SD, LeMay M, Wible CG, Hokama H, Martin J, Metcalf D, Coleman M, et al. Abnormalities of the left temporal lobe and thought disorder in schizophrenia. A quantitative magnetic resonance imaging study. *N Engl J Med*. 1992 Aug 27;327(9):604-12.
- Sher L. Etiopathogenesis of depression in patients with alcoholism: role of changes in thyroid function. *Med Hypotheses*. 2002 Aug;59(2):167.
- Shiah IS, Yatham LN. Serotonin in mania and in the mechanism of action of mood stabilizers: a review of clinical studies. *Bipolar Disord* 2000; 2(2):77-92.

- Silbersweig DA, Stern E, Frith C, Cahill C, Holmes A, Grootenck S, Seaward J, McKenna P, Chua SE, Schnorr L, et al. A functional neuroanatomy of hallucinations in schizophrenia. *Nature* 1995; 378(6553):176-179.
- Simpson MD, Lubman DI, Slater P, Deakin JF. Autoradiography with [<sup>3</sup>H]8-OH-DPAT reveals increases in 5-HT(1A) receptors in ventral prefrontal cortex in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 1996; 39(11):919-928.
- Smiley JF, Goldman-Rakic PS. Serotonergic axons in monkey prefrontal cerebral cortex synapse predominantly on interneurons as demonstrated by serial section electron microscopy. *J Comp Neurol*. 1996 Apr 8;367(3):431-43.
- Smith RS. A comprehensive macrophage-T-lymphocyte theory of schizophrenia. *Med Hypotheses*. 1992 Nov; 39(3):248-57. Review.
- Scoates JC, Mann JJ. The functional neuroanatomy of mood disorders. *J Psychiatr Res*. 1997 Jul-Aug;31(4):393-432. Review.
- Sprouse JS, Aghajanian GK. (-)-Propranolol blocks the inhibition of serotonergic dorsal raphe cell firing by 5-HT<sub>1A</sub> selective agonists. *Eur J Pharmacol*. 1986 Sep 9;128(3):295-8.
- Stanley M, Virgilio J, Gershon S. Tritiated imipramine binding sites are decreased in the frontal cortex of suicides. *Science*. 1982 Jun 18;216(4552):1337-9.
- Stanley M, Stanley B. Postmortem evidence for serotonin's role in suicide. *J Clin Psychiatry*. 1990 Apr;51 Suppl:22-8; discussion 29-30. Review.
- Stein L, Wise CD. Possible etiology of schizophrenia: progressive damage to the noradrenergic reward system by 6-hydroxydopamine. *Science*. 1971 Mar 12;171(975):1032-6.
- Steinbusch HW, Verhofstad AA, Joosten HW. Localization of serotonin in the central nervous system by immunohistochemistry: description of a specific and sensitive technique and some applications. *Neuroscience*. 1978;3(9):811-9.
- Steinbusch HW. Distribution of serotonin-immunoreactivity in the central nervous system of the rat-cell bodies and terminals. *Neuroscience*. 1981;6(4):557-618.
- Stockmeier CA, Dilley GE, Shapiro LA, Overholser JC, Thompson PA, Meltzer HY. Serotonin receptors in suicide victims with major depression. *Neuropsychopharmacology* 1997; 16(2):162-173
- Stockmeier CA. Neurobiology of serotonin in depression and suicide. *Ann N Y Acad Sci* 1997; 836:220-232
- Sumiyoshi T, Stockmeier CA, Overholser JC, Dilley GE, Meltzer HY. Serotonin<sub>1A</sub> receptors are increased in postmortem prefrontal cortex in schizophrenia. *Brain Res* 1996; 708(1-2):209-214.
- Tagliamonte A, Tagliamonte P, Perez-Cruet J, Stern S, Gessa GL. Effect of psychotropic drugs on tryptophan concentration in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 1971; 177(3):475-480.
- Takeuchi Y, Sano Y. Immunohistochemical demonstration of serotonin nerve fibers in the neocortex of the monkey (*Macaca fuscata*). *Anat Embryol (Berl)*. 1983;166(2):155-68.
- Tenen SS. The effects of p-chlorophenylalanine, a serotonin depletor, on avoidance acquisition, pain sensitivity and related behavior in the rat. *Psychopharmacologia*. 1967;10(3):204-19.
- Thornicroft G, Sartorius N. The course and outcome of depression in different cultures: 10-year follow-up of the WHO Collaborative Study on the Assessment of Depressive Disorders. *Psychol Med*. 1993 Nov;23(4):1023-32.
- Torrey EF, Webster M, Knable M, Johnston N, Yolken RH. The Stanley Foundation Brain Collection and Neuropathology Consortium. *Schizophr Res* 2000; 44(2):151-155.
- Torrey EF, Yolken RH. The schizophrenia-rheumatoid arthritis connection: infectious, immune, or both? *Brain Behav Immun*. 2001 Dec; 15(4):401-10. Review.

- Tsigos C, Chrousos G. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* 2002 Oct;53(4):865.
- Twarog BM, Page IH. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol.* 1953; 175: 157-61
- Van der Zee EA, Luiten PG. GABAergic neurons of the rat dorsal hippocampus express muscarinic acetylcholine receptors. *Brain Res Bull* 1993; 32(6):601-609.
- Vamas K, Hall H, Bonaventure P, Sedvall G. Autoradiographic mapping of 5-HT(1B) and 5-HT(1D) receptors in the post mortem human brain using [(3)H]GR 125743. *Brain Res.* 2001 Oct 5;915(1):47-57.
- Vaidya VA, Marek GJ, Aghajanian GK, Duman RS. 5-HT2A receptor-mediated regulation of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the hippocampus and the neocortex. *J Neurosci.* 1997 Apr 15;17(8):2785-95.
- Vawter MP, Freed WJ, Kleinman JE. Neuropathology of bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 2000; 48(6):486-504.
- Vazquez-Barquero JL, Garcia J, Simon JA, Iglesias C, Montejo J, Herran A, Dunn G. Mental health in primary care. An epidemiological study of morbidity and use of health resources. *Br J Psychiatry.* 1997 Jun;170:529-35.
- Verge D, Daval G, Marcinkiewicz M, Patey A, el Mestikawy S, Gozlan H, Hamon M. Quantitative autoradiography of multiple 5-HT1 receptor subtypes in the brain of control or 5,7-dihydroxytryptamine-treated rats. *J Neurosci.* 1986 Dec;6(12):3474-82.
- Verge D, Calas A. Serotonergic neurons and serotonin receptors: gains from cytochemical approaches. *J Chem Neuroanat.* 2000 Feb;18(1-2):41-56. Review.
- Waeber C, Schoeffter P, Hoyer D, Palacios JM. The serotonin 5-HT1D receptor: a progress review. *Neurochem Res.* 1990 Jun;15(6):567-82. Review.
- Watson SJ, Patel P, Burke S, Herman J, Schafer M, Kwak S. 1988. In situ hybridization of mRNA in nervous tissue: a primer. In: Sundermann A, editor. Washington, DC: Society for Neuroscience Short Course 1 Syllabus. p 4-29.
- Weinberger DR, Torrey EF, Neophytides AN, Wyatt RJ. Structural abnormalities in the cerebral cortex of chronic schizophrenic patients. *Arch Gen Psychiatry* 1979a; 36(9):935-939.
- Weinberger DR, Torrey EF, Neophytides AN, Wyatt RJ. Lateral cerebral ventricular enlargement in chronic schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1979b; 36(7):735-739.
- Weinberger DR, Berman KF, Illowsky BP. Physiological dysfunction of dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia.III. A new cohort and evidence for a monoaminergic mechanism. *Arch Gen Psychiatry.* 1988 Jul;45(7):609-15.
- Weinberger DR. Hippocampal injury and chronic schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 1991 Mar 1;29(5):509-11.
- Weinberger DR. The biological basis of schizophrenia: new directions. *J Clin Psychiatry.* 1997; 58 Suppl 10:22-7. Review.
- Weinshank RL, Zgombick JM, Macchi MJ, Branchek TA, Hartig PR. Human serotonin 1D receptor is encoded by a subfamily of two distinct genes: 5-HT1D alpha and 5-HT1D beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(8):3630-3634.
- Weissman MM, Bland RC, Canino GJ, Faravelli C, Greenwald S, Hwu HG, Joyce PR, Karam EG, Lee CK, Lellouch J, Lepine JP, Newman SC, Rubio-Stipec M, Wells JE, Wickramaratne PJ, Wittchen H, Yeh EK. Cross-national epidemiology of major depression and bipolar disorder. *JAMA.* 1996 Jul 24-31;276(4):293-9.



- Wender PH, Kety SS, Rosenthal D, Schulsinger F, Ortmann J, Lunde I. Psychiatric disorders in the biological and adoptive families of adopted individuals with affective disorders. *Arch Gen Psychiatry*. 1986 Oct;43(10):923-9.
- Whitaker PM, Crow TJ, Ferrier IN. Tritiated LSD binding in frontal cortex in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 1981; 38(3):278-280.
- Williams GV, Rao SG, Goldman-Rakic PS. The physiological role of 5-HT<sub>2A</sub> receptors in working memory. *J Neurosci*. 2002 Apr 1;22(7):2843-54.
- Willner P. Dopaminergic mechanisms in depression and mania. *Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress*. (eds. Bloom FE, Kupfer DJ) 911-920 (Raven, New York, 1995).
- Winokur G, Coryell W, Akiskal HS, Endicott J, Keller M, Mueller T. Manic-depressive (bipolar) disorder: the course in light of a prospective ten-year follow-up of 131 patients. *Acta Psychiatr Scand*. 1994 Feb;89(2):102-10.
- Wise CD, Stein L. Dopamine-beta-hydroxylase deficits in the brains of schizophrenic patients. *Science*. 1973 Jul 27;181(97):344-7.
- Woolley DW, Shaw E. A biochemical and pharmacological suggestion about certain mental disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1954; 40:228-231.
- Yates M, Leake A, Candy JM, Fairbairn AF, McKeith IG, Ferrier IN. 5HT<sub>2</sub> receptor changes in major depression. *Biol Psychiatry*. 1990a Mar 1;27(5):489-96.
- Yates CM, Simpson J, Gordon A. 5-Hydroxytryptamine and dopamine in pre-senile and senile Alzheimer-type dementia. *Biochem Soc Trans*. 1990b Jun;18(3):422-3.
- Zahm DS, Heimer L. Two transpallidal pathways originating in the rat nucleus accumbens. *J Comp Neurol*. 1990 Dec 15;302(3):437-46.
- Zilles K. Cortex. *The human nervous system*. (ed. Paxinos G) 757-802 (Academic Press, San Diego, 1990).

**NOTAS**



