

ESTUDIO DEL RATÓN HETEROCIGOTO
REELER COMO MODELO ANIMAL IN VITRO
DE LA ESQUIZOFRENIA.
CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE
LOS RECEPTORES D₂ Y 5-HT_{2A}



María José Varela Liste

2011

ISBN 978-84-9887-625-3 (Edición digital PDF)

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTADE DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOXÍA



**ESTUDIO DEL RATÓN HETEROCIGOTO REELER COMO
MODELO ANIMAL IN VITRO DE LA ESQUIZOFRENIA.
CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS
RECEPTORES D₂ Y 5-HT_{2A}**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor

María José Varela Liste

2011



FACULTADE DE FARMACIA

DPTO. DE FARMACOLOXÍA

Campus Universitario Sur s/n. 15782 Santiago de Compostela

Dña. **María Isabel Loza García**, Doctora en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela y D. **José Manuel Brea Floriani**, Doctor en Farmacia por la Universidad de Santiago de Compostela

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “Estudio del ratón heterocigoto reeler como modelo animal *in vitro* de la esquizofrenia. Caracterización farmacológica de los receptores D₂ y 5-HT_{2A}”, que para optar al grado de Doctora presenta Dña. **María José Varela Liste**, ha sido realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia y cumple los requisitos para ser presentada y juzgada por el tribunal correspondiente.

En Santiago de Compostela, a 5 de enero de 2011.

Fdo: María Isabel Loza García

Fdo. José Manuel Brea Floriani

Cuando buscamos el tesoro, nos damos cuenta
de que el camino es el propio tesoro.

Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas con las que he compartido camino a lo largo de estos años, que han colaborado tanto con sus aportaciones profesionales como personales y que merecen mucho más que mi agradecimiento.

En primer lugar me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores María Isabel Loza y José Manuel Brea por su excelente asesoramiento científico y estímulo para seguir formándome, así como por su dedicación y apoyo constante. Gracias Mabel por ofrecerme una oportunidad mostrando plena confianza en mi desde el principio y animarme y ayudarme a perseguir mis sueños. Gracias Pepo por tu ayuda y tus invaluable consejos tanto profesionales como personales, por hacer que todo funcione e incluso parezca de otro color, así como por tu amistad y por conseguir arrancarme una sonrisa siempre.

A Maribel Cadavid por sus aportaciones a este trabajo pero sobre todo por sus buenos consejos y su apoyo.

A Marian Castro por estar siempre dispuesta a resolver mis dudas y ayudarme de modo desinteresado.

Al Dr. Héctor Caruncho y a su grupo por las valiosas aportaciones siempre dirigidas a mejorar este trabajo. En especial a Iria por estar siempre dispuesta a ayudarme y a enriquecer mis conocimientos.

Al Dr. Javier González-Maeso por su ayuda desinteresada en la puesta a punto de los ensayos funcionales.

Al Dr. Rafael Maldonado por la oportunidad de realizar mi estancia y a todo el Grupo de Neurofarmacología de la UPF por hacerme sentir como una más desde el primer día. En especial a Patricia Robledo por su entrega y dedicación que hicieron que mi estancia fuera tan enriquecedora tanto a nivel profesional como personal.

A todos los miembros del departamento de Farmacología con los que he convivido estos años. A Ana por sus consejos y ayuda con los ratones.

A todos y cada uno de los compañeros del grupo Biofarma, tanto a los que ya no están como a los que continúan (Ainhoa, Alba, Bea, Belén, Carlos, Cristina, Emiliano, Filipe, Isabel, Javier, Marta, Miriam, Patricio y Silvia) porque todos y cada uno de vosotros me habéis aportado algo, por las horas de poyata compartidas, inquietudes, comidas, seminarios, compañía, comprensión, palabras de ánimo y

apoyo en los momentos difíciles, así como risas y alegría en los distintos momentos a lo largo de esta trayectoria. A Rocío y María por todo esto pero además por vuestra amistad y vuestras palabras que siempre iban dirigidas a levantarme el ánimo y animarme a seguir. A Óscar por estar siempre dispuesto a solucionar los inimaginables y numerosos problemas informáticos. A Jose por asesorarme y solucionar todo de la manera más eficiente pero sobre todo por sus palabras de aliento a continuar en los momentos de bajón.

A aquellos que han sido compañeros de camino durante la elaboración de nuestras tesis y demás trabajos. A Fátima y Edu por darme las primeras clases de farmacología y sus valiosos consejos. A Sonia y a Vanesa con las que he compartido ensayos formando un equipo perfecto. A María Regueiro por ser tan especial y aportarme esa inmensa alegría que le caracteriza.

A Belén por conseguir que levantara la vista de la pantalla sacándome una sonrisa.

A la Xunta de Galicia por la ayuda económica con la concesión del contrato María Barbeito y la ayuda para realizar mi estancia.

A mis amigas por su amistad y consejos y por seguir ahí a pesar de mi constante ausencia en los últimos meses. A Concha por sus consejos de redacción. A Yoli por estar siempre ahí, para celebrar los buenos momentos pero sobre todo para apoyarme en los momentos difíciles y ayudarme a ver la luz aun cuando estaba inmersa en un pozo.

A mi familia y a mis padrinos por vuestro cariño y apoyo incondicional. A mis padres por transmitirme unos valores y unos principios con una gran dosis de amor, así como por confiar siempre en mi mostrándome vuestro apoyo infinito. A mi madre por su lucha inagotable para que yo pudiera perseguir mis sueños sin venirme abajo.

A la familia de César por su cariño y por hacerme sentir como una más desde el primer día. A María y a Raquel por poder contar siempre con vosotras. A los peques, Álex y Yeray, porque con vuestras pequeñas sonrisas hacéis que todo sea especial.

A César por su paciencia, su comprensión, su apoyo, su confianza y sobre todo por su amor infinito que consigue siempre hacerme ver las cosas de otra manera.

María

A mi madre

A César

ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	1
JUSTIFICACIÓN	3
HIPÓTESIS	6
OBJETIVOS	6
INTRODUCCIÓN	9
I. ESQUIZOFRENIA.....	11
Síntomas.....	11
Diagnóstico y evolución.....	12
Etiología.....	18
Tratamiento.....	20
Tratamiento farmacológico.....	21
Intervenciones psicosociales.....	27
Neurobiología.....	28
II. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs).....	30
Estructura y vías de señalización.....	31
Modelos de activación como desplazamientos de equilibrios conformacionales..	35
Alosterismo.....	39
Oligomerización.....	40
Receptor D ₂	42
Receptor 5-HT _{2A}	45
III. REELINA.....	47
Estructura del gen y de la proteína reelina.....	48
Vías de señalización de la reelina.....	50
Función.....	54
La reelina en la esquizofrenia.....	56
IV. MODELOS ANIMALES DE ESQUIZOFRENIA.....	60
El ratón heterocigoto reeler como modelo animal de esquizofrenia.....	63
MATERIALES Y MÉTODOS	67
I. ANIMALES.....	69
II. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO.....	70
Extracción de ADN genómico.....	70
PCR (“polymerase chain reaction”).....	70
Electroforesis de ADN.....	71
III. ENSAYOS DE UNIÓN DE RADIOLIGANDOS.....	72
Ensayos de saturación.....	72
Ensayos de competición.....	72
Análisis de los resultados.....	75
Estudios de caracterización de receptores D ₂ Y 5-HT _{2A} en membranas de estriado y de corteza frontal.....	76
Preparación de las membranas de corteza frontal y estriado.....	76
Ensayos de saturación por la unión a receptor D ₂ en estriado.....	76

Ensayos de saturación por la unión a receptor 5-HT _{2A} en corteza frontal	77
IV. ENSAYOS FUNCIONALES DE [³⁵ S]GTPγS	78
Preparación de las membranas de corteza frontal y estriado	81
Ensayo de unión de [³⁵ S]GTPγS	82
V. TRATAMIENTO CON HALOPERIDOL EN RATONES REELER	83
Animales	83
Tratamiento 24 horas	84
Tratamiento 15 días	84
Preparación de las membranas de corteza frontal y estriado	85
Ensayos de saturación por la unión a receptor D ₂ en estriado	85
Ensayos de saturación por la unión a receptor 5-HT _{2A} en corteza frontal	85
VI. ENSAYOS EN SINAPTOSOMAS	86
Aislamiento y purificación de sinaptosomas	86
Preparación de las membranas de sinaptosomas	87
Ensayos de unión de radioligandos en sinaptosomas de ratón Swiss	87
Ensayos de saturación por la unión a receptor D ₂	87
Ensayos de competición por la unión a receptor D ₂	88
Ensayos de saturación por la unión a receptor 5-HT _{2A}	89
Ensayos de competición por la unión a receptor 5-HT _{2A}	89
Ensayos en sinaptosomas de ratón reeler	90
Preparación de los sinaptosomas para microscopía electrónica	90
Ensayos de unión de radioligandos en sinaptosomas de ratón reeler	91
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	96
VIII. REACTIVOS UTILIZADOS	97
Reactivos utilizados en la preparación de tampones	97
Reactivos farmacológicos utilizados en los ensayos de unión de radioligandos	97
RESULTADOS	99
I. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES EN HOMOGENADOS DE CEREBRO DE RATÓN	101
Estudios en ratón Swiss	101
Caracterización del receptor D ₂ de dopamina en el estriado	101
Caracterización del receptor 5-HT _{2A} de serotonina en la corteza frontal	102
Estudios en ratón reeler	103
Determinación del genotipo	104
Ensayos de unión de radioligandos en membranas de estriado y de corteza frontal	105
II. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD EN EL ACOPLAMIENTO A LAS PROTEÍNAS G	108
Estudios de la funcionalidad en el acoplamiento a proteínas G del receptor D ₂ de dopamina en el estriado	108
Estudios de la funcionalidad en el acoplamiento a proteínas G del receptor 5-HT _{2A} de serotonina en la corteza frontal	109
III. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES POR EL TRATAMIENTO CON EL ANTIPSICÓTICO HALOPERIDOL	111
Tratamiento 24 horas	111
Ensayos de saturación de la unión a receptor D ₂ en el estriado	111
Ensayos de saturación de la unión a receptor 5-HT _{2A} en la corteza frontal	114

Tratamiento 15 días	116
Ensayos de saturación de la unión a receptor D ₂ en el estriado.....	116
Ensayos de saturación de la unión a receptor 5-HT _{2A} en la corteza frontal	119
IV. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS	
RECEPTORES D₂ Y 5-HT_{2A} EN SINAPTOSOMAS	122
Caracterización del receptor D ₂ de dopamina en sinaptosomas	122
Caracterización del receptor 5-HT _{2A} de serotonina en sinaptosomas.....	123
Análisis comparativo de la expresión de los receptores D ₂ y 5-HT _{2A} en función de los niveles de reelina	124
Microscopía electrónica de sinaptosomas de ratón reeler	124
Ensayos de unión de radioligandos en sinaptosomas de ratón reeler	125
V. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS CONFORMACIONALES	
DE LOS RECEPTORES D₂ Y 5-HT_{2A} EN SINAPTOSOMAS	132
Estudios en sinaptosomas de ratón Swiss	132
Caracterización conformacional del receptor D ₂ de dopamina en sinaptosomas.....	132
Caracterización conformacional del receptor 5-HT _{2A} de serotonina en sinaptosomas.....	135
Estudios en sinaptosomas de ratón reeler	139
Caracterización conformacional del receptor D ₂ de dopamina en sinaptosomas.....	139
Caracterización conformacional del receptor 5-HT _{2A} de serotonina en sinaptosomas.....	142
DISCUSIÓN	149
CONCLUSIONES	167
BIBLIOGRAFÍA	171

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Evolución de la esquizofrenia con las fases de la enfermedad.....	16
Figura 2: Heterogeneidad fenotípica de la esquizofrenia.....	18
Figura 3: Receptoroma de los antipsicóticos	27
Figura 4: Representación de la estructura de la rodopsina.....	33
Figura 5: Representación esquemática de los diversos mecanismos de señalización de los GPCRs	35
Figura 6: Modelos cinéticos de activación de GPCRs.....	37
Figura 7: Esquema de la proteína reelina.....	49
Figura 8: Representación esquemática de las vías de señalización de la reelina y sus posibles efectos.....	53
Figura 9: Desarrollo del plato cortical normal y en el reeler	55
Figura 10: Distintas poblaciones de interneuronas GABAérgicas expresan reelina que actúa en las espinas dendríticas de las neuronas piramidales.....	59
Figura 11: Microfotografías de dendritas de neuronas piramidales de ratón homocigoto reeler , heterocigoto y <i>wild type</i>	65
Figura 12: Estructura química de los fármacos utilizados en los ensayos de competición.	73
Figura 13: Estructura química de las herramientas farmacológicas sintetizadas por el grupo de los Dres. Raviña y Masaguer.....	74
Figura 14: Ciclo de activación-desactivación de las proteínas G heterotriméricas tras la interacción de un agonista con el GPCR en condiciones normales y en un ensayo de [³⁵ S]GTPγS.....	80
Figura 15: Curva de unión específica de [³ H]-espiperona en el receptor D ₂ de dopamina en membranas de estriado de ratón Swiss.....	101
Figura 16: Curva de unión específica de [³ H]-LSD en el receptor 5-HT _{2A} de serotonina en membranas de corteza frontal de ratón Swiss	102
Figura 17: Ratones B6C3Fe reeler (HZ) portadores de una mutación autosómica recesiva espontánea en el gen de la reelina. Productos amplificados por PCR a partir de ADN genómico de ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y <i>wild type</i> (WT).....	104
Figura 18: Curva de unión específica de [³ H]-espiperona en el receptor D ₂ de dopamina en membranas de estriado de ratón heterocigoto reeler (HZ) y <i>wild type</i> (WT).....	105
Figura 19: Curva de unión específica de [³ H]-LSD en el receptor 5-HT _{2A} de serotonina en membranas de corteza frontal de ratón heterocigoto reeler (HZ) y <i>wild type</i> (WT).....	106
Figura 20: Estimulación de la unión de [³⁵ S]GTPγS por dopamina 100 μM en el receptor D ₂ en membranas de estriado de ratones heterocigoto reeler (HZ), <i>wild type</i> (WT) y Swiss.	109
Figura 21: Estimulación de la unión de [³⁵ S]GTPγS por DOI 100 μM en el receptor 5-HT _{2A} en membranas de corteza frontal de ratones heterocigoto reeler (HZ), <i>wild type</i> (WT) y Swiss	110
Figura 22: Curva de unión específica de [³ H]-espiperona en el receptor D ₂ de dopamina en membranas de estriado de ratones heterocigoto reeler (HZ) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10g), HZ tratados con	

haloperidol (0.2 mg/kg), <i>wild type</i> (WT) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10 g) y WT tratados con haloperidol (0.2 mg/kg)	112
Figura 23: Densidad (B_{max}) en fmol/mg proteína del receptor D_2 de dopamina en membranas de estriado de los cuatro grupos de tratamiento.....	113
Figura 24: Curva de unión específica de [3H]-LSD en el receptor D_2 de dopamina en membranas de estriado de ratones heterocigoto reeler (HZ) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10g), HZ tratados con haloperidol (0.2 mg/kg), <i>wild type</i> (WT) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10 g) y WT tratados con haloperidol (0.2 mg/kg)	114
Figura 25: Densidad (B_{max}) en fmol/mg proteína del receptor 5-HT $_{2A}$ de serotonina en membranas de corteza frontal de los cuatro grupos de tratamiento	115
Figura 26: Curva de unión específica de [3H]-espiperona en el receptor D_2 de dopamina en membranas de estriado de ratones heterocigoto reeler (HZ) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10g), HZ tratados con haloperidol (0.2 mg/kg), <i>wild type</i> (WT) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10 g) y WT tratados con haloperidol (0.2 mg/kg) durante 15 días	117
Figura 27: Densidad (B_{max}) en fmol/mg proteína del receptor D_2 de dopamina en membranas de estriado de los cuatro grupos de tratamiento.....	118
Figura 28: Curva de unión específica de [3H]-LSD en el receptor 5-HT $_{2A}$ de serotonina en membranas de corteza frontal de ratones heterocigoto reeler (HZ) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10 g), HZ tratados con haloperidol (0.2 mg/kg), <i>wild type</i> (WT) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10 g) y WT tratados con haloperidol (0.2 mg/kg) durante 15 días.	120
Figura 29: Densidad (B_{max}) en fmol/mg proteína del receptor 5-HT $_{2A}$ de serotonina en membranas de corteza frontal de los cuatro grupos de tratamiento	121
Figura 30: Curva de unión específica de [3H]-espiperona en el receptor D_2 de dopamina en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss.....	122
Figura 31: Curva de unión específica de [3H]-LSD en el receptor 5-HT $_{2A}$ de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss.....	123
Figura 32: Microfotografías de sinaptosomas.	124
Figura 33: Curva de unión específica de [3H]-espiperona en el receptor D_2 de dopamina en membranas de sinaptosomas de ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y <i>wild type</i> (WT).	126
Figura 34: Densidad (B_{max}) en fmol/mg proteína del receptor D_2 de dopamina en sinaptosomas de ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y <i>wild type</i> (WT)	127
Figura 35: Curva de unión específica de [3H]-ketanserina en el receptor 5-HT $_{2A}$ de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ) <i>wild type</i> (WT).....	128
Figura 36: Curva de unión específica de [3H]-LSD en el receptor 5-HT $_{2A}$ de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y <i>wild type</i> (WT)	130

Figura 37: Densidad (B_{max}) en fmol/mg proteína del receptor 5-HT _{2A} de serotonina en sinaptosomas de ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y <i>wild type</i> (WT).....	131
Figura 38: Curva de competición de los compuestos: Haloperidol, Clozapina, Risperidona frente a [³ H]-espiperona en el receptor D ₂ de dopamina en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss	133
Figura 39: Curva de competición de los compuestos: QF1004B, QF0108B, QF0703B frente a [³ H]-espiperona en el receptor D ₂ de dopamina en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss	134
Figura 40: Curva de competición de los compuestos: Haloperidol, Clozapina, Ketanserina frente a [³ H]-LSD en el receptor 5-HT _{2A} de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss.	136
Figura 41: Curva de competición de los compuestos: QF1004B, QF0108B, QF2004B frente a [³ H]-LSD en el receptor 5-HT _{2A} de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss.	137
Figura 42: Curva de competición de los compuestos: Haloperidol, Clozapina, Risperidona frente a [³ H]-espiperona en el receptor D ₂ de dopamina en membranas de sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ).....	140
Figura 43: Curva de competición de los compuestos: A) Haloperidol, B) Clozapina, Risperidona frente a [³ H]-espiperona en el receptor D ₂ de dopamina en membranas de sinaptosomas de ratón <i>wild type</i> (WT)	141
Figura 44: Curva de competición de los compuestos: Haloperidol, Clozapina, Risperidona frente a [³ H]-LSD en el receptor 5-HT _{2A} de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ).....	143
Figura 45: Curva de competición de los compuestos: Haloperidol, Clozapina, Risperidona frente a [³ H]-LSD en el receptor 5-HT _{2A} de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón <i>wild type</i> (WT).	144
Figura 46: Curva de competición de los compuestos: Haloperidol y Risperidona frente a [³ H]-LSD en el receptor 5-HT _{2A} de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ) en ausencia y en presencia de 100 μ M de Gpp(NH)p..	146
Figura 47: Curva de competición de los compuestos: A) Haloperidol y B) Risperidona frente a [³ H]-LSD en el receptor 5-HT _{2A} de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón <i>wild type</i> (WT) en ausencia y en presencia de 100 μ M de Gpp(NH)p.	147

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Criterios de diagnóstico de la esquizofrenia DSM-IV-TR.....	14
Tabla 2: Criterios de diagnóstico de la esquizofrenia ICD-10.....	15
Tabla 3: Tabla resumen del ensayo de saturación por la unión a receptor D ₂ en membranas de estriado.....	77
Tabla 4: Tabla resumen del ensayo de saturación por la unión a receptor 5-HT _{2A} en corteza frontal.	78
Tabla 5: Tabla resumen del ensayo de unión de [³⁵ S]GTP γ S.....	83
Tabla 6: Tabla resumen del ensayo de saturación por la unión a receptor D ₂ en sinaptosomas de ratón Swiss.....	87

Tabla 7:	Tabla resumen del ensayo de competición por la unión a receptor D ₂ en sinaptosomas de ratón Swiss.....	88
Tabla 8:	Tabla resumen del ensayo de saturación por la unión a receptor 5-HT _{2A} en sinaptosomas de ratón Swiss.....	89
Tabla 9:	Tabla resumen del ensayo de competición por la unión a receptor 5-HT _{2A} en sinaptosomas de ratón Swiss.....	90
Tabla 10:	Tabla resumen del ensayo de saturación por la unión a receptor D ₂ en sinaptosomas de ratón reeler.....	92
Tabla 11:	Tabla resumen del ensayo de competición por la unión a receptor D ₂ en sinaptosomas de ratón reeler.....	93
Tabla 12:	Tabla resumen del ensayo de saturación por la unión a receptor 5-HT _{2A} en sinaptosomas de ratón reeler.....	94
Tabla 13:	Tabla resumen del ensayo de competición por la unión a receptor 5-HT _{2A} en sinaptosomas de ratón reeler.....	95
Tabla 14:	Tabla resumen del ensayo de competición por la unión a receptor 5-HT _{2A} en presencia de Gpp(NH)p en sinaptosomas de ratón reeler.....	96
Tabla 15:	Parámetros de unión (B _{max} y K _D) de [³ H]-espiperona en membranas de estriado de ratón Swiss.....	102
Tabla 16:	Parámetros de unión (B _{max} y K _D) de [³ H]-LSD en membranas de corteza frontal de ratón Swiss.....	103
Tabla 17:	Parámetros de unión (B _{max} y K _D) de [³ H]-espiperona en membranas de estriado de ratón heterocigoto reeler (HZ) y <i>wild type</i> (WT).....	106
Tabla 18:	Parámetros de unión (B _{max} y K _D) de [³ H]-LSD en membranas de corteza frontal de ratón heterocigoto reeler (HZ) y <i>wild type</i> (WT).....	107
Tabla 19:	Parámetros de unión (B _{max} y K _D) de [³ H]-espiperona en membranas de estriado de los cuatro grupos de tratamiento.....	113
Tabla 20:	Parámetros de unión (B _{max} y K _D) de [³ H]-LSD en membranas de corteza frontal de los cuatro grupos de tratamiento.....	115
Tabla 21:	Parámetros de unión (B _{max} y K _D) de [³ H]-espiperona en membranas de estriado de los cuatro grupos de tratamiento.....	118
Tabla 22:	Parámetros de unión (B _{max} y K _D) de [³ H]-LSD en membranas de corteza frontal de los cuatro grupos de tratamiento.....	121
Tabla 23:	Parámetros de unión (B _{max} y K _D) de [³ H]-espiperona en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss.....	123
Tabla 24:	Parámetros de unión (B _{max} y K _D) de [³ H]-LSD en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss.....	124
Tabla 25:	Parámetros de unión (B _{max} y K _D) de [³ H]-espiperona en sinaptosomas de ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y <i>wild type</i> (WT).....	127
Tabla 26:	Parámetros de unión (B _{max} y K _D) de [³ H]-ketanserina en sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ) y <i>wild type</i> (WT).....	129
Tabla 27:	Parámetros de unión (B _{max} y K _D) de [³ H]-LSD en sinaptosomas de ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y <i>wild type</i> (WT).....	131
Tabla 28:	Afinidad (K _i y pK _i) por el receptor D ₂ de dopamina de sinaptosomas de ratón Swiss marcado con [³ H]-espiperona de los compuestos estudiados.....	135
Tabla 29:	Afinidad (K _i y pK _i) por el receptor 5-HT _{2A} de serotonina de sinaptosomas de ratón Swiss marcado con [³ H]-LSD de los compuestos estudiados.....	138

Tabla 30: Afinidad (K_i y pK_i) por el receptor D_2 de dopamina de sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ) y <i>wild type</i> (WT) con [3 H]-espiperona de los compuestos estudiados.....	142
Tabla 31: Afinidad por el receptor $5-HT_{2A}$ de serotonina de sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ) con [3 H]-LSD de los compuestos estudiados	145
Tabla 32: Afinidad por el receptor $5-HT_{2A}$ de serotonina de sinaptosomas de ratón <i>wild type</i> (WT) con [3 H]-LSD de los compuestos estudiados.....	145
Tabla 33: Afinidad por el receptor $5-HT_{2A}$ de serotonina de sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ) con [3 H]-LSD de los compuestos estudiados en ausencia o en presencia de 100 μ M de Gpp(NH)p	147
Tabla 34: Afinidad por el receptor $5-HT_{2A}$ de serotonina de sinaptosomas de ratón <i>wild type</i> (WT) con [3 H]-LSD de los compuestos estudiados en ausencia o en presencia de 100 μ M de Gpp(NH)p.	148

ABREVIATURAS

µg:	Microgramo
µl:	Microlitro
µm:	Micrómetro o micra
µM:	Micromolar
τ:	proteína tau
β-AR:	Receptor adrenérgico beta
α₁:	Receptor adrenérgico α ₁
α₂:	Receptor adrenérgico α ₂
5-HT₁-5-HT₇:	Receptores de serotonina 1 a 7
5-HT_{1A}:	Receptor de serotonina del subtipo 1A
5-HT_{2A}:	Receptor de serotonina del subtipo 2A
5-HT_{2C}:	Receptor de serotonina del subtipo 2C
°C:	Grados Celsius
AC:	Adenilato ciclasa
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AFM:	Atomic Force Microscopy (Microscopía de fuerza atómica)
AMPc:	Adenosín monofosfato cíclico
ApoER2:	Receptor de apolipoproteína E 2
ARNasa:	Ribonucleasa
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
B_{max}:	Número o densidad máxima de sitios de unión
BRET:	Bioluminescence Resonance Energy Transfer (Transferencia de energía de resonancia bioluminiscente)
BSA:	Bovine serum albumin (albúmina de suero bovino)
BT:	Total binding (Unión total)
BZP:	Benzodiacepina
Ca²⁺:	Ion calcio
CaCl₂:	Cloruro de calcio
CB:	Receptores de cannabinoides
Ci:	Curio
CI₅₀:	Concentración inhibitoria del 50 %

Cl:	Cloro
cm:	Centímetro
CO₂:	Dióxido de carbono
COMT:	Catecol-O-metiltransferasa
CR:	Células Cajal-Retzius
CREB:	Elemento de respuesta a AMPc
D₁:	Receptor de dopamina 1
D₂:	Receptor de dopamina 2
D₃:	Receptor de dopamina 3
D₄:	Receptor de dopamina 4
Dab1:	proteína adaptadora <i>disabled 1</i>
DAG:	Diacilglicerol
DAT:	Transportador de dopamina
DISC1:	<i>Disrupted in schizophrenia 1</i>
DLPFC:	Corteza dorsolateral prefrontal
DMS:	Diferencia menos significativa
DMSO:	Dimetil sulfóxido
DNMT1:	ADN metiltransferasa 1
dNTPs:	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DOI:	(±)-2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine
Dominio PI/PTB:	Dominio phosphotyrosine interaction/phosphotyrosine binding (Dominio de interacción con fosfotirosinas/de unión con fosfotirosinas).
dpm:	Desintegraciones por minuto
DSM-IV-TR:	Manual de diagnóstico y estadística de las enfermedades mentales de la American Psychiatric Association
DTNBP1:	Disbindina
DTT:	DL-dithiothreitol
e1, e2, e3:	lazos extracelulares 1, 2 y 3
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic acid
eem:	Error estándar de la media
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico
EGTA:	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

EP:	Receptores de la prostaglandina E ₂
F:	Flúor
fmol:	Fentomol
FRET:	Fluorescence Resonance Energy Transfer (Transferencia de energía por resonancia de fluorescencia)
FSH:	Hormona folículo estimulante
g:	Gramo
g:	Unidad relativa de medida de aceleración
GABA:	Ácido gamma-aminobutírico
GAD₆₅:	Descarboxilasa del ácido glutámico de 65 kDa
GAD₆₇:	Descarboxilasa del ácido glutámico de 67 kDa
GAP:	Proteína aceleradora de la actividad GTPasa
GDP:	Guanosín difosfato
GEF:	Factor intercambiador de nucleótido de guanina
GPCR:	G protein coupled receptor (Receptor acoplado a proteína G)
Gpp(NH)p:	Guanosina 5'-(β,γ-imido) trifosfato
GRM3:	Receptor metabotrópico de glutamato 3
GSK3β:	Glucógeno sintasa cinasa 3 beta
GTP:	Guanosín trifosfato
GTPasa:	Guanosín trifosfatasa
[³⁵S]GTPγS:	[³⁵ S]-guanosina 5'-O-(gamma-tio) trifosfato
H:	Hidrógeno
h:	Hora
H1:	Receptor histaminérgico 1
H₂NaPO₄·2 H₂O:	Dihidrógeno fosfato de sodio dihidratado
HCl:	Ácido clorhídrico
HEPES:	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
HZ:	Ratón heterocigoto reeler (<i>Reln +/-</i>)
i1, i2, i3:	lazos intracelulares 1, 2 y 3
ICD-10:	Clasificación Internacional de Enfermedades
i.p.:	intraperitoneal
IP3:	Inositol 1,4,5-trifosfato
kb:	Kilobase

KCl:	Cloruro de potasio
K_D:	Constante de disociación en el equilibrio
kDa:	KiloDalton
kg:	Kilogramo
K_i alta:	Constante de inhibición alta afinidad
K_i baja:	Constante de inhibición baja afinidad
K_i:	Constante de inhibición
LH:	Hormona luteinizante
LIMK:	LIM cinasa 1
LPA:	Ácido lisofosfatídico
LSD:	Dietilamida de ácido lisérgico
LTD:	Long- term depression (Depresión a largo plazo)
LTP:	Long-term potentiation (Potenciación a largo plazo)
M:	Molaridad o concentración molar
M1:	Receptor muscarínico 1
M2:	Receptor muscarínico 2
M3:	Receptor muscarínico 3
M4:	Receptor muscarínico 4
MDMA:	3,4-metilendioximetamfetamina
mg:	Miligramo
MgCl₂:	Cloruro de magnesio
MgCl₂ . 6 H₂O:	Cloruro de magnesio hexahidratado
mGlu:	Receptores metabotrópicos de glutamato
min:	Minuto
ml:	Mililitro
mM:	milimolar
mmol:	Minimol
MNN:	<i>Mismatch negativity</i>
mTOR:	Mammalian Target of Rapamycin
mTORC1:	Mammalian Target of Rapamycin Complex 1
mTORC2:	Mammalian Target of Rapamycin Complex 2
N:	Nitrógeno
n:	Tamaño de la muestra

NaCl:	Cloruro de sodio
NaOH:	Hidróxido de sodio
NET:	Transportador de noradrenalina y adrenalina
nM:	Nanomolar
nm:	Nanómetro
NMDA:	Ácido N-metil-D-aspartato
NMDAR:	Receptor de N-metil D-aspartato
NOS:	Óxido nítrico sintasa
NR1:	Subunidad NR1 del receptor de NMDA
NR2A:	Subunidad NR2A del receptor de NMDA
NRG1:	Neuroregulina 1
NSB:	Non-specific binding (Unión no específica)
O:	Oxígeno
p:	Probabilidad
P300:	Respuesta auditiva P300
P50:	Respuesta auditiva P50
pb:	Par de bases nitrogenadas
PCP:	Fenciclidina
PCR:	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PDZ:	Acrónimo que combina las primeras letras de tres proteínas: post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (DlgA) y zonula occludens-1 protein (zo-1).
PET:	Positron emission tomography (Tomografía por emisión de positrones)
PFA:	Factor activador de plaquetas
PI3K:	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PIP2:	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKB ó Akt:	Proteína cinasa B
PLC:	Fosfolipasa C
PLCβ:	Fosfolipasa C- β
pmol:	picomol
PPI:	Prepulse inhibition (Inhibición del prepulso)
Proteínas RGS:	Proteínas de señalización de reguladores de proteína G

Reln:	Gen de la reelina
RL:	Ratón homocigoto reeler (<i>Reln -/-</i>)
rpm:	Revoluciones por minuto
S6K1:	Proteína S6 cinasa 1
S1P:	Esfingosina 1-fosfato
SDS:	Dodecilsulfato sódico
SERT:	Transportador de serotonina
SFKs:	Tirosina cinasas de la familia Src
SNC:	Sistema Nervioso Central
SP:	Subplato cortical
SPECT:	Single photon emission computed tomography (Tomografía computarizada por emisión de fotones individuales)
TBE:	Tampón formado por Tris, borato y EDTA
TMI-VII:	Dominio transmembrana I-VII
Tris, Trizma:	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
TSH:	Hormona estimulante de la tiroides
U:	Unidad Enzimática
v:	Volumen
VLDLR:	Receptor de lipoproteína de muy baja densidad
VTA:	Área tegmental ventral
VZ:	Zona ventricular
WT:	Ratón <i>wild type</i> (<i>Reln +/+</i>)

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

La esquizofrenia es una enfermedad mental grave y relativamente frecuente caracterizada por una distorsión de los procesos del pensamiento, la percepción y las respuestas emocionales. Esta enfermedad se manifiesta básicamente como una mezcla de signos y síntomas característicos, que afectan a múltiples procesos psicológicos asociándose así con diversos tipos de discapacidades funcionales, disfunción social y ocupacional. Se asocia con un aumento de la mortalidad, del riesgo de suicidio y violencia, del abuso de sustancias y de la morbilidad de otras condiciones médicas como la enfermedad cardiovascular y la diabetes entre otras (Para revisión ver la serie Keshavan y cols., 2008; Tandon y cols., 2008a; Tandon y cols., 2008b; Tandon y cols., 2009; Tandon y cols., 2010). Por todo ello y como consecuencia de la penetración y gravedad de los déficits asociados así como del curso a lo largo de la vida, la esquizofrenia se considera una de las enfermedades psiquiátricas más discapacitantes con efectos profundos en los individuos afectados y en sus familias. Además, supone una carga económica enorme en términos de hospitalización, tratamiento crónico, rehabilitación y pérdida de productividad.

Se han desarrollado distintas hipótesis que intentan explicar la etiología y fisiopatología de la esquizofrenia. Algunas de ellas implican alteraciones en distintos sistemas de neurotransmisión, particularmente en los sistemas dopaminérgico, serotoninérgico y glutamatérgico. En adición a estas hipótesis, distintas líneas de evidencias llevaron a postular la hipótesis del neurodesarrollo según la cual la esquizofrenia podría implicar un proceso patológico durante el desarrollo cerebral temprano que conducen a la activación de circuitos neuronales alterados durante la adolescencia que originan la emergencia de los síntomas de la enfermedad (Fatemi y Folsom, 2009; Miyamoto y cols., 2003).

A día de hoy la esquizofrenia se considera una enfermedad compleja, de herencia no mendeliana, poligénica, con múltiples polimorfismos genéticos comunes cada uno de los cuales contribuye a un pequeño efecto de susceptibilidad a la enfermedad y con importantes influencias ambientales. Las exposiciones de riesgo específico y cómo interactúan estos factores para causar la esquizofrenia es un

mecanismo actualmente desconocido, lo que limita nuestra comprensión etiológica de la enfermedad.

Los fármacos antipsicóticos constituyen la primera línea de elección en el tratamiento farmacológico de la esquizofrenia, y aunque son altamente eficaces en controlar algunos síntomas de la enfermedad, como las alucinaciones y los síntomas positivos en general, son menos eficaces respecto a otros síntomas como los negativos y los cognitivos. Es conocido que estos fármacos, descubiertos inicialmente por serendipidad interaccionan con distintos receptores tanto a nivel presináptico como postsináptico. En este sentido entre las dianas terapéuticas más aceptadas de los fármacos antipsicóticos se encuentran los receptores D₂ de dopamina y 5-HT_{2A} de serotonina que son receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). Actualmente se sabe que estos receptores existen en un equilibrio dinámico entre distintas conformaciones que se pueden relacionar con distintos comportamientos funcionales de los GPCRs. Los comportamientos de los GPCRs (interacción con múltiples proteínas G y con otras proteínas, internalización y oligomerización) influyen en su respuesta farmacológica, siendo uno de los mayores retos en la farmacología de receptores el conocimiento y la aplicación terapéutica de los mecanismos moleculares por los cuales los fármacos regulan diferencialmente las vías de señalización mediadas por los GPCRs. La expresión de los receptores en los terminales sinápticos está condicionada por múltiples factores, entre ellos se ha descrito que la proteína reelina modula la densidad de las espinas dendríticas y la agrupación proteica en su membrana. Los receptores dopaminérgicos y serotoninérgicos, entre otras proteínas situadas en los terminales sinápticos, pueden ver afectadas tanto sus características conformacionales como funcionales.

La reelina es una glicoproteína de la matriz extracelular que regula la correcta migración de las neuronas y la formación de las capas corticales durante el desarrollo embrionario (Huang, 2009) y modula la plasticidad sináptica y el crecimiento dendrítico en el adulto (Herz y Chen, 2006; Niu y cols., 2004). Se ha descrito que en la esquizofrenia los niveles de esta proteína están disminuidos en un 50 % en varias estructuras cerebrales (Guidotti y cols., 2000; Impagnatiello y cols., 1998) y esta disminución se considera uno de los hallazgos más consistentes en el tejido cerebral postmortem en esquizofrenia (Torrey y cols., 2005). En base a esta reducción de la

proteína reelina y a la modificación de otras proteínas sinápticas se ha propuesto la alteración de la conectividad sináptica como una característica neuropatológica de la esquizofrenia que sería compatible con un origen del neurodesarrollo para la esquizofrenia (Eastwood y cols., 2003).

A pesar de los intensos estudios realizados y de los grandes avances de los últimos años, la heterogeneidad fenotípica, fisiopatológica y etiológica de la esquizofrenia junto con las limitaciones tecnológicas han limitado el conocimiento de los mecanismos que operan en el desarrollo de esta enfermedad por lo que todavía es necesaria una investigación básica que permita conocer los mecanismos fisiopatológicos para desarrollar tratamientos más efectivos. Todos estos condicionantes junto con la presencia de síntomas típicos de la condición humana han dificultado la obtención de un modelo animal que reproduzca todos los aspectos de la enfermedad. Esto ha dado lugar al desarrollo de distintos modelos animales para probar distintas hipótesis o mecanismos fisiopatológicos específicos más que intentar imitar completamente el desorden humano (Marcotte y cols., 2001).

Uno de estos modelos es el ratón heterocigoto reeler que presenta una mutación autosómica recesiva en el gen de la reelina (*Reln*) que resulta en una disminución de aproximadamente el 50 % de la cantidad de esta proteína (Tueting y cols., 1999), lo que convierte al ratón heterocigoto reeler en un modelo animal para evaluar el papel de esta disminución del 50 % de la reelina en la psicosis humana. Además este ratón presenta varias alteraciones neuroquímicas y neuroanatómicas similares a las descritas en pacientes esquizofrénicos entre las que se incluyen: una disminución de la expresión de la descarboxilasa del ácido glutámico de 67 kDa (GAD_{67}), una reducción del neuropilo, un aumento de la densidad de empaquetamiento neuronal y una disminución de las espinas dendríticas (Costa y cols., 2001). Estos cambios en los terminales sinápticos podrían condicionar las distintas poblaciones de las proteínas receptoras relacionadas con la farmacología de la esquizofrenia.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en la presente Tesis Doctoral hemos considerado de interés evaluar si el ratón heterocigoto reeler, propuesto como modelo animal de esquizofrenia por su nivel disminuido de expresión de reelina similar a los pacientes, presenta alteraciones en las características de los receptores

D₂ y 5-HT_{2A}, implicados en la farmacología de la esquizofrenia, tanto en su expresión como en su funcionalidad y en la distribución conformacional en las espinas dendríticas alteradas en el modelo heterocigoto reeler.

☆ La reelina que está disminuida en un 50 % en pacientes esquizofrénicos, condiciona la expresión proteica en los terminales sinápticos, donde se encuentran los receptores implicados en la farmacología de la esquizofrenia.

☆ Existe un modelo de ratón (heterocigoto reeler) que de forma natural tiene disminuida en un 50 % la expresión de la proteína reelina.

HIPÓTESIS

La expresión de la reelina *podría* influir en los receptores implicados en la farmacología de la esquizofrenia, siendo el ratón heterocigoto reeler un buen modelo para su estudio.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar farmacológicamente los receptores D₂ y 5-HT_{2A}, relacionados con las acciones de los actuales fármacos antipsicóticos, en el ratón heterocigoto reeler.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudiar comparativamente la densidad de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} en cerebro de ratones con distinta expresión de reelina en función de sus genotipos (ratón Swiss, ratón heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT)).
2. Definir la funcionalidad en el acoplamiento a proteínas G de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} en función del nivel de expresión de reelina en dichos genotipos.

3. Determinar la regulación de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} ejercida por el antipsicótico haloperidol en relación con los niveles de expresión de reelina en los ratones.
4. Poner a punto un modelo de estudio en los terminales sinápticos (sinaptosomas) para una caracterización farmacológica detallada de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} en el modelo de ratón reeler.
 - 4.1 Poner a punto un método de caracterización de los receptores en sinaptosomas.
 - 4.2 Analizar comparativamente la expresión de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} en sinaptosomas en función de los niveles de expresión de reelina en los ratones.
5. Estudiar la influencia de la expresión de reelina en las características conformacionales de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} en sinaptosomas de ratones heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT).

INTRODUCCIÓN

I. ESQUIZOFRENIA

La esquizofrenia (del griego, *schizo*: «división» o «escisión» y *phrenos*: «mente»), es una enfermedad mental crónica y grave que se caracteriza por una pérdida de contacto con la realidad (psicosis) y una disminución en el desarrollo general de las funciones cerebrales.

En un metaanálisis se observa una incidencia media de la esquizofrenia (proporción de casos nuevos por unidad de tiempo) de 15.2/100,000/año (McGrath y cols., 2004), sin observarse diferencias entre las distintas regiones del mundo o según las condiciones económicas de los países (Saha y cols., 2006). Este estudio revela, sin embargo, un aumento del riesgo de desarrollar la enfermedad asociado a un determinado entorno urbano, migración y género masculino (McGrath y cols., 2004). El riesgo de desarrollar la enfermedad a lo largo de la vida se estima entre un 0.3 y 2 % con una media de aproximadamente 0.7 % (Saha y cols., 2005), siendo este riesgo mayor en hombres que en mujeres, observándose una relación de riesgo relativo hombre/mujer de 1.4 (Aleman y cols., 2003; McGrath y cols., 2004).

La prevalencia media a lo largo de la vida es de 4.0 por 1000 habitantes. La mayor prevalencia se asocia con los países desarrollados y la inmigración, sin observarse diferencias entre hombres y mujeres o asociadas a un entorno rural o urbano (Bhugra, 2005; Saha y cols., 2005).

Es una enfermedad altamente incapacitante tanto a nivel laboral, familiar como social (American Psychiatric Association, 2004) y se asocia con elevados niveles de carga y coste social (Rice, 1999), además de con un incalculable dolor y sufrimiento de los individuos (Barbato, 1998). Por ello, se ha descrito como la peor de las enfermedades mentales (Tandon y cols., 2008b) y está entre las diez primeras causas por enfermedad en el mundo (World Health Organization, 2001).

■ Síntomas

Los síntomas de la esquizofrenia generalmente comienzan en la adolescencia o en la edad adulta temprana y normalmente continúan a lo largo de la vida

(Freedman, 2003). Estos síntomas se pueden dividir en tres categorías fundamentales:

1. Síntomas “positivos” o psicóticos
2. Síntomas “negativos”
3. Deterioro cognitivo

Los síntomas **positivos** representan una versión distorsionada o excesiva de las funciones normales e incluyen: alucinaciones (pueden ocurrir en las cinco modalidades sensoriales, aunque las auditivas son las más comunes), delirios o creencias falsas, lenguaje desorganizado y comportamiento raro (Thaker y Carpenter, Jr., 2001; Wong y Van Tol, 2003)

Los síntomas **negativos** representan la disminución o ausencia de las funciones que están normalmente presentes e incluyen: alogia (disminución de la fluidez de ideas y del lenguaje), aplanamiento afectivo (disminución de la capacidad para expresar emociones), abulia (falta de motivación para perseguir un objetivo) y anhedonia (disminución de la capacidad de experimentar placer) (Andreasen, 2000).

El deterioro **cognitivo** implica déficits en un amplio rango de tareas de procesamiento de la información, entre las que se incluyen: pobreza de la función ejecutiva (disminución de la capacidad de procesar la información), reducción de la capacidad de atención, así como alteraciones de la memoria y del funcionamiento intelectual general (Wong y Van Tol, 2003).

La presentación clínica de la esquizofrenia es muy heterogénea, los síntomas varían considerablemente de unos individuos a otros e incluso dentro del mismo individuo a lo largo de las diferentes fases de la enfermedad (Barbato, 1998).

Diagnóstico y evolución

Debido a la ausencia de una prueba diagnóstica objetiva o de una patología específica de la esquizofrenia, el diagnóstico clínico actual se basa en el examen del estado mental, normalmente a través de una entrevista clínica, y en la observación del comportamiento del paciente. El Manual de diagnóstico y estadística de las enfermedades mentales (DSM-IV-TR) y la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD-10) son los dos sistemas de clasificación de estas enfermedades

aceptados actualmente como estándares para el diagnóstico de la esquizofrenia (Tabla 1 y 2) (American Psychiatric Association, 2000; World Health Organization, 1992).

Estos dos sistemas de clasificación intentan explicar la heterogeneidad de la esquizofrenia mediante la subclasificación en los cinco subtipos “tradicionales”: catatónica, desorganizada, paranoide, esquizoafectiva, indiferenciada y residual. El ICD-10 incluye además dos subtipos adicionales: simple y latente. Sin embargo, estos subtipos tradicionales de la esquizofrenia presentan una utilidad limitada en la clínica y en la investigación, porque son inestables durante el curso de la enfermedad y no discriminan con respecto al pronóstico y respuesta al tratamiento de los pacientes. Adicionalmente, no sirven para dar una explicación a la heterogeneidad etiológica y patofisiológica de la enfermedad.

Alternativamente, se ha propuesto un sistema que plantea delimitar los hallazgos clínicos de la esquizofrenia en un rango de dimensiones: síntomas positivos, síntomas negativos, desorganización, trastornos cognitivos, trastornos del ánimo y trastornos motores. La severidad y proporción relativa de los diferentes complejos de síntomas (dimensiones) puede variar entre los pacientes y a lo largo del curso de la enfermedad permitiendo discriminar con respecto al curso de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (Tandon y cols., 2009). Estas dimensiones podrían reflejar distintos procesos etiopatogénicos asociados con distintos factores de riesgo y permitirían definir endofenotipos o “fenotipos intermedios”, entendidos como déficits o variaciones biológicas cuantificables que servirían de indicadores de la acción de los genes en la predisposición al desarrollo de la enfermedad de un individuo, proporcionando así una vía de unión entre la etiología y la expresión clínica y podrían mejorar el diagnóstico. Además, estos endofenotipos permitirían definir específicamente dianas moleculares para el desarrollo de fármacos y ayudarían a reducir la heterogeneidad identificando subgrupos homogéneos de pacientes con una patofisiología, síntomas y déficits funcionales similares.

Tabla 1: Criterios de diagnóstico de la esquizofrenia DSM-IV-TR. (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition, Revisión del texto. American Psychiatric Association, 2000).

A. *Síntomas característicos*: Dos (o más) de los siguientes, cada uno presente durante un período significativo de tiempo, durante un período de un mes (o menos, si se tratan con éxito):

1. Delirios
2. Alucinaciones
3. Discurso desorganizado (equivocaciones frecuentes o incoherencia)
4. Desorganización extrema o comportamiento catatónico
5. Síntomas negativos, es decir, aplanamiento afectivo (falta o disminución de respuesta emocional), alogia (falta o disminución del habla), o anhedonia (falta o disminución de la motivación)

Nota: Sólo un síntoma del criterio A si los delirios son raros o las alucinaciones consisten en escuchar una voz sosteniendo comentarios sobre la conducta o los pensamientos de la persona, o dos o más voces hablando entre sí.

B. *Disfunción social/ocupacional*: Durante un período significativo de tiempo a partir de la aparición de la enfermedad, una o más de las áreas principales de actuación tales como el trabajo, relaciones interpersonales o el cuidado de uno mismo, están notablemente bajo el nivel logrado antes de la aparición de la enfermedad (o cuando la aparición de la enfermedad es la infancia o en la adolescencia, el fracaso para alcanzar los logros esperados a nivel interpersonal, académico u ocupacional).

C. *Duración*: Signos continuos de perturbación durante al menos seis meses. Este período de seis meses debe incluir al menos un mes de síntomas (o menos, si se trata con éxito) que cumplan con el criterio A (es decir, síntomas de la fase activa) y podría incluir períodos de síntomas prodrómicos o residuales. Durante estos períodos prodrómicos o residuales, los signos de alteración podrían manifestarse únicamente por síntomas negativos o dos o más síntomas del criterio A presentes de forma atenuada (p. ej. creencias extrañas, experiencias de percepción inusuales).

D. *Exclusión de trastorno esquizoafectivo y de comportamiento*: Las características de trastorno esquizoafectivo y de comportamiento han sido descartadas si (1) no han sucedido episodios de depresión mayor, manía o una mezcla de ambos durante la fase activa de los síntomas; o (2) si los episodios de conducta han sucedido durante las fases activas de los síntomas, la duración total ha sido breve en relación a la duración de los períodos activos y residuales.

E. *Exclusión de fármacos o drogas/estado de salud general*: La alteración no es debida a los efectos fisiológicos directos de una droga o fármaco (p. ej. un estupefaciente o un tratamiento farmacológico) o a un estado médico determinado.

F. *Relación con una enfermedad del desarrollo*: Si hay historia de autismo o de otra enfermedad del desarrollo, el diagnóstico adicional de esquizofrenia se realiza únicamente si los delirios y alucinaciones están presentes durante al menos un mes (o menos, si se tratan con éxito).

Tabla 2: Criterios de diagnóstico de la esquizofrenia ICD-10. (The International Classification of Mental and Behavioural Disorders, ICD-10. World Health Organization, 1992).

Sintomatología característica:

Presencia como mínimo de un síntoma muy evidente perteneciente a cualquiera de los grupos A a D o síntomas de al menos dos de los grupos referidos entre la E y la I deberían haber estado claramente presentes la mayor parte del tiempo durante un período de un mes o más:

- A. Eco, robo, inserción o retraimiento, o difusión del pensamiento.
 - B. Delirios de control, influencia o pasividad, referidos con claridad a movimientos del cuerpo o de las extremidades o pensamientos específicos, acciones o sensaciones; percepción delirante.
 - C. Voces alucinatorias que comentan la propia actividad, que discuten entre ellas sobre el enfermo u otros tipos de voces alucinatorias que proceden de alguna parte del cuerpo.
 - D. Ideas delirantes persistentes de otro tipo que no son adecuadas a la cultura del individuo o que son completamente imposibles, tales como las de identidad religiosa o política, capacidad y poderes sobrehumanos (p. ej. de ser capaz de controlar el clima, de estar en comunicación con seres de otros mundos).
 - E. Alucinaciones persistentes de cualquier modalidad, cuando se acompañan de ideas delirantes no estructuradas y fugaces sin contenido afectivo claro, o ideas sobrevaloradas persistentes, o cuando se presentan a diario durante semanas, meses o permanentemente.
 - F. Interpolaciones o bloqueos en el curso del pensamiento, que dan lugar a un lenguaje divagatorio, disgregado, incoherente o lleno de neologismos.
 - G. Manifestaciones catatónicas, tales como excitación, posturas características o flexibilidad cérea, negativismo, mutismo, estupor.
 - H. Síntomas “negativos” tales como apatía marcada, empobrecimiento del lenguaje, bloqueo o incongruencia de la respuesta emocional (estas últimas habitualmente conducen a retraimiento social y disminución de la competencia social). Debe quedar claro que estos síntomas no se deban a una depresión o a la medicación neuroléptica.
 - I. Cambio consistente y significativo de la cualidad general de algunos aspectos de la conducta personal, que se manifiestan como pérdida de interés, falta de objetivos, ociosidad, estar absorto y aislamiento social.
-

A pesar de la heterogeneidad con respecto a la severidad y evolución a lo largo del tiempo (Andreasen y cols., 2005), típicamente se acepta que la esquizofrenia sigue una trayectoria secuencial que implica cuatro fases (Figura 1) (Lieberman y cols., 2001; Tandon y cols., 2009):

1. Fase premórbida, con alteraciones cognitivas, motoras y/o sociales sutiles y no específicas.

2. Fase prodrómica, caracterizada por síntomas básicos o síntomas positivos atenuados y declive funcional.
3. Fase psicótica, con el primer episodio psicótico, que anuncia el comienzo formal de la esquizofrenia y es compatible con el criterio A del DSM-IV-TR, y generalmente marcada por episodios repetidos de psicosis con inter-episodios de remisión de duración y grado variable y parcial.
4. Fase estable, caracterizada por síntomas psicóticos menos prominentes y aumento predominante de síntomas negativos y déficits cognitivos estables.

La separación entre estas fases de la esquizofrenia es imprecisa y pueden ocurrir en cualquier etapa de la enfermedad grados de recuperación variable.

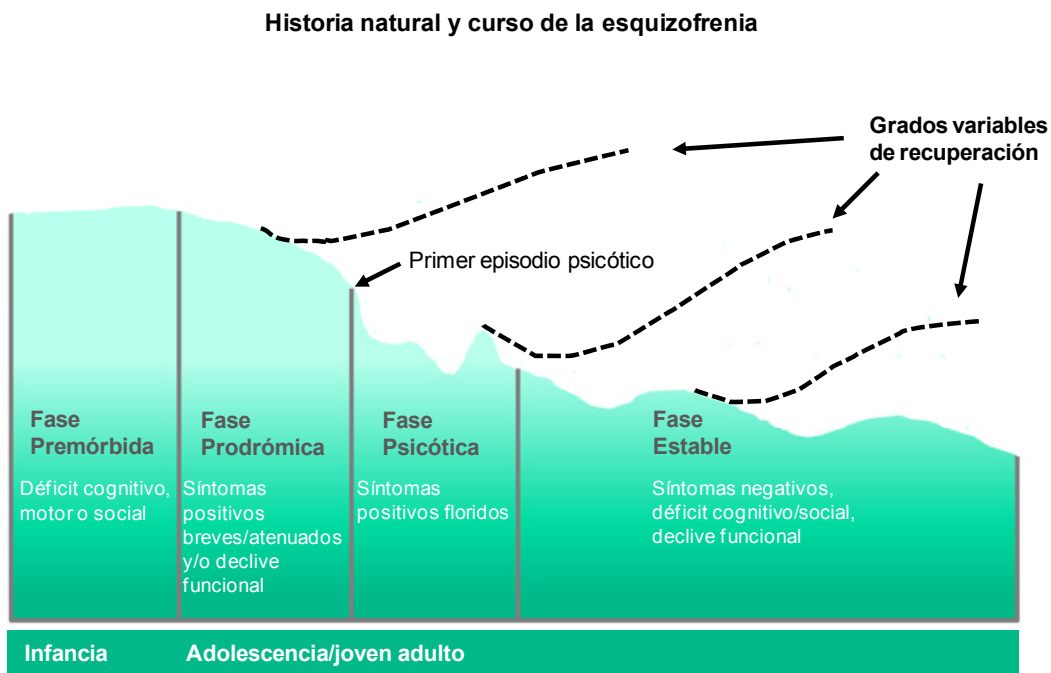


Figura 1: Evolución de la esquizofrenia con las fases de la enfermedad. (Modificado de Tandon y cols., 2009).

Actualmente está ganando importancia la validez de desarrollar un sistema de clasificación clínico-patológico en etapas discretas de la enfermedad que definan el grado de evolución de la enfermedad en un individuo en un momento determinado

asociado con diferencias en el pronóstico, tratamiento óptimo y patología (McGorry, 2010). Este sistema de clasificación permitiría integrar los factores de vulnerabilidad biológica, social y psicológica implicados en el desarrollo de la enfermedad, y a su vez, se podría evaluar la efectividad de los tratamientos para prevenir su progresión y producir la remisión o retorno a etapas más tempranas de la enfermedad (McGorry, 2010). Este sistema distinguiría las siguientes etapas de la enfermedad: etapa premórbida o etapa 0 (definida por grados variables de riesgo a desarrollar la esquizofrenia pero sin evidencias clínicas de la enfermedad), etapa prodrómica (subdividida en etapa Ia definida por la expresión clínica de algunos de estos factores de riesgo y etapa Ib caracterizada por la manifestación de síntomas psicóticos básicos o subumbrales), etapa II (comprende el primer episodio psicótico sin deterioración observable durante la remisión), etapa III (caracterizada por la aparición de déficits entre los episodios en unión con la psicosis) y etapa IV (implica un deterioro substancial) (Figura 2) (McGorry y cols., 2006; Tandon y cols., 2009).

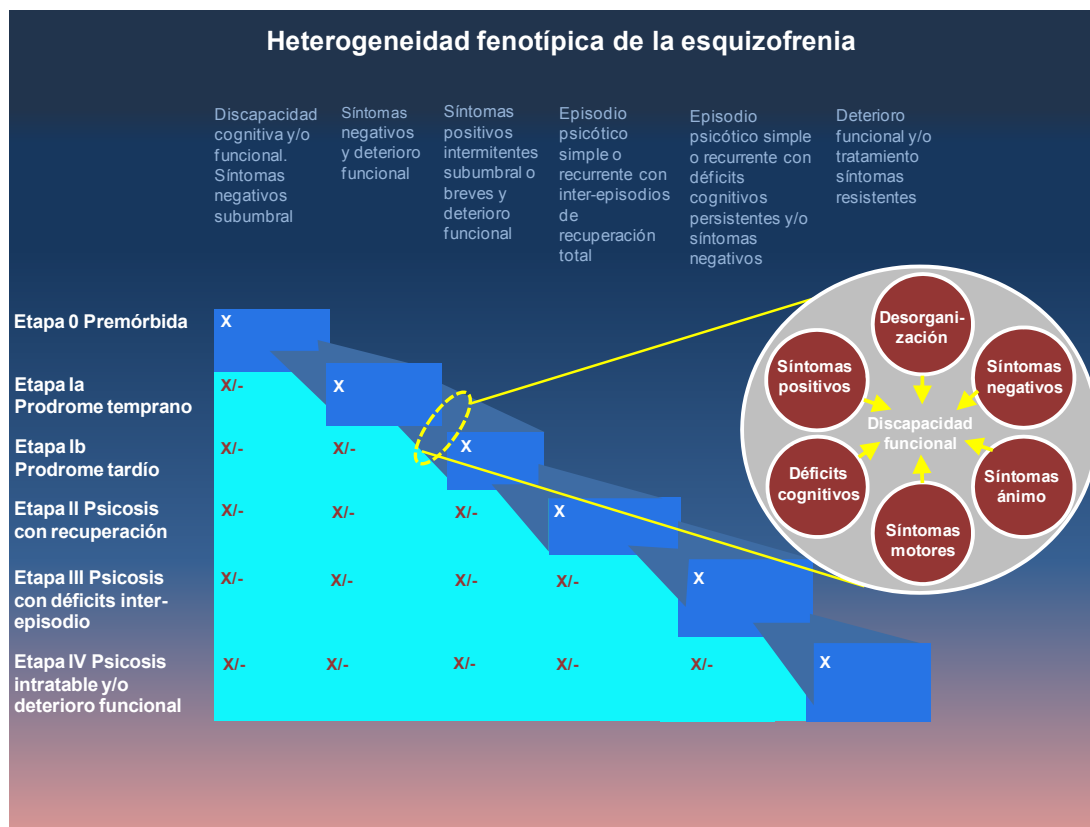


Figura 2: Heterogeneidad fenotípica de la esquizofrenia. Dimensiones y sistema de clasificación clínico-patológico en etapas discretas de la enfermedad. (Modificado de Tandon y cols., 2009).

Etiología

A pesar de la existencia de una gran cantidad de información respecto a las causas de la esquizofrenia el conocimiento actual de la etiología molecular es limitado y los factores de riesgo específicos y cómo causan la enfermedad son todavía desconocidos.

Estudios de familia, gemelos y adopción han confirmado la contribución de los factores genéticos y ambientales como determinantes de la esquizofrenia (Tsuang, 2000), actuando ambos conjuntamente en la etiología de la enfermedad (Sullivan y cols., 2003; Tsuang y cols., 2004).

La vulnerabilidad de padecer o desarrollar la esquizofrenia está claramente relacionada con factores genéticos (Lewis y Lieberman, 2000). Es bien conocido que se agrega en familias y el riesgo a desarrollar la enfermedad está directamente

asociado con el grado de parentesco o carga biológica compartida (Obiols y Vicens-Vilanova, 2003). Los estudios de gemelos han mostrado que en los gemelos dicigóticos si uno de los gemelos tiene esquizofrenia el riesgo del otro de desarrollar la enfermedad es del 10-15 %, mientras que en los gemelos monocigóticos el riesgo es del 40-50 % (Tandon y cols., 2008a). En el caso de hijos biológicos de individuos con esquizofrenia que son adoptados el riesgo a desarrollar la enfermedad aunque es menor sigue siendo más elevado que en la población general (Ingraham y Kety, 2000). Por tanto, el riesgo de desarrollar la esquizofrenia se relaciona con la presencia de la enfermedad en los padres biológicos pero no en los padres adoptivos (Lewis y Lieberman, 2000).

Los estudios de asociación, ligamiento y expresión génica han identificado muchas regiones cromosómicas y cientos de genes que podrían estar asociados a la esquizofrenia. Algunos de los genes que son de interés etio-patogénico en la esquizofrenia incluyen los de: neuroregulina 1 (NRG1), disbindina (DTNBP1), receptores de dopamina (D1-D4), DISC1 (*disrupted in schizophrenia 1*), catecol-O-metiltransferasa (COMT), el receptor metabotrópico de glutamato 3 (GRM3) y reelina (*Reln*) entre otros (Carpenter y Koenig, 2008; Chen y cols., 2006; Fatemi y Folsom, 2009; Harrison y Weinberger, 2005; Tandon y cols., 2008a). Muchos de los genes identificados parecen actuar en algunos de los procesos más básicos del desarrollo cerebral, como la diferenciación neuronal, la biología de las sinapsis y varios procesos implicados en la plasticidad neuronal (Straub y Weinberger, 2006) y en los sistemas de neurotransmisión (Maki y cols., 2005; Owen y cols., 2005b). Sin embargo, los resultados no apoyan un patrón de transmisión mendeliana e incluso en el caso de los genes candidatos más prometedores existen fallos en la replicación de exactamente los mismos marcadores y haplotipos entre los distintos estudios y existe una pérdida de consistencia en implicar alelos particulares en la susceptibilidad a la esquizofrenia (Sun y cols., 2010; Tandon y cols., 2008a).

La heredabilidad de la esquizofrenia es alta y los factores genéticos junto con sus interacciones con los factores ambientales contribuyen al 80 % de la susceptibilidad a la esquizofrenia (Owen y cols., 2005a; Sullivan y cols., 2003; Tandon y cols., 2008a). Ningún gen parece ser suficiente o necesario para el desarrollo de la esquizofrenia y no existe un gen principal que pueda explicar una

porción sustancial de la heredabilidad. Por ello, desde un punto de vista genético se considera a la esquizofrenia como una enfermedad compleja, heterogénea, poligénica y multifactorial (Lichtermann y cols., 2000) con múltiples polimorfismos genéticos comunes, cada uno de los cuales contribuye a un pequeño efecto de susceptibilidad a la enfermedad (Harrison y Weinberger, 2005; Owen y cols., 2005a; Ross y cols., 2006).

Aunque los factores de riesgo genético claramente juegan un papel importante en la etiología de la esquizofrenia, hay abundantes evidencias de la importancia de factores ambientales (Miyamoto y cols., 2003). Se han descrito múltiples factores ambientales (complicaciones obstétricas, estrés maternal, malnutrición prenatal, urbanicidad, migración, infecciones virales, mes de nacimiento, abuso de cannabis) asociados al riesgo de desarrollar esquizofrenia (Maki y cols., 2005; Miyamoto y cols., 2003), sin embargo su relevancia exacta no está clara y ninguno de ellos parece ser suficiente o necesario para el desarrollo de la enfermedad.

Así, aunque se han implicado los factores de riesgo genético y ambiental en la etiología de la esquizofrenia, actualmente se desconoce como interactúan estos factores para originar la esquizofrenia así como los procesos neurobiológicos que podrían mediar la interacción gen-gen, gen-ambiente y ambiente-ambiente (Tandon y cols., 2008a).

Tratamiento

La esquizofrenia es una enfermedad crónica que influye en todos los aspectos de la vida de las personas afectadas, por ello la planificación del tratamiento persigue tres objetivos fundamentales (American Psychiatric Association, 2004):

1. Reducir o eliminar los síntomas
2. Maximizar la calidad de vida y el funcionamiento adaptativo
3. Promover y mantener lo máximo posible la recuperación de los efectos debilitantes de la enfermedad.

El objetivo final y general del tratamiento es minimizar los efectos de la enfermedad y capacitar a los pacientes para vivir una vida completa, productiva y gratificante.

El abordaje terapéutico de la esquizofrenia es integral, es decir, se realiza de manera global, combinando diferentes tipos de componentes terapéuticos: el tratamiento farmacológico (antipsicóticos y otras medicaciones coadyuvantes) y las intervenciones psicosociales (psicológicas y de rehabilitación psicosocial). Las evidencias clínicas muestran que toda persona con esquizofrenia debería ser atendida con una combinación de tratamiento antipsicótico óptimo, estrategias educativas dirigidas al paciente y a su entorno, estrategias cognitivas conductuales para mejorar objetivos laborales y sociales, estrategias para reducir los síntomas residuales y atención asertiva domiciliaria (Falloon y cols., 2004).

Tratamiento farmacológico

Los tratamientos farmacológicos son un elemento habitualmente indispensable para el tratamiento de los episodios agudos, para la prevención de futuros episodios y para la mejoría de los síntomas entre episodios. Los fármacos antipsicóticos constituyen la base del tratamiento farmacológico de la esquizofrenia, sin embargo también resultan útiles otros fármacos como los estabilizantes del estado de ánimo y otras medicaciones coadyuvantes (antidepresivos, anticonvulsionantes, benzodiazepinas, sales de litio) (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre la Esquizofrenia y el Trastorno Psicótico Incipiente, 2009; Tandon y cols., 2010; Wolff-Menzler y cols., 2010).

Fármacos antipsicóticos

Los fármacos antipsicóticos se clasifican por sus características estructurales, por sus efectos sobre los síntomas psicóticos y por sus reacciones adversas en dos grandes grupos:

1. Antipsicóticos *típicos* o de primera generación
2. Antipsicóticos *atípicos* o de segunda generación

Los **antipsicóticos típicos** o de primera generación son eficaces para reducir la mayor parte de los síntomas positivos de la esquizofrenia (alucinaciones, delirios, conductas extrañas). Reducen en menor medida los síntomas negativos (apatía, embotamiento afectivo, alogia), frente a los que son relativamente ineficaces. El descubrimiento de forma accidental de los efectos antipsicóticos de la clorpromazina en 1950 revolucionó las estrategias de cuidado de las enfermedades mentales, y permitió la salida de gran número de pacientes esquizofrénicos de los hospitales para ser atendidos en la comunidad (Miyamoto y cols., 2002).

El conocimiento de que el mecanismo de acción de la clorpromazina era debido al bloqueo de los receptores de dopamina promovió la búsqueda y descubrimiento de un gran número de antagonistas de estos receptores (Freedman 2003). Entre los antipsicóticos típicos más comunes se incluyen el haloperidol, perfenazina, tifuloperazina y flufenazina (Wong y Van Tol, 2003).

Aunque sus estructuras químicas varían, la característica común a todos los antipsicóticos de primera generación es su alta afinidad por los receptores D₂ de dopamina (Miyamoto y cols., 2005) en base a la cual se pueden clasificar en: alta potencia (como haloperidol), potencia intermedia (como perfenazina) y baja potencia (como la clorpromazina) (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre la Esquizofrenia y el Trastorno Psicótico Incipiente, 2009). Estudios de imagen *in vivo* han mostrado que los efectos antipsicóticos se asocian con una ocupación de los receptores D₂ en los ganglios basales del 60-80 % y ocupaciones superiores al 80 % se asocian con los síntomas extrapiramidales (Farde y cols., 1992).

A pesar de que los antipsicóticos típicos son efectivos en el tratamiento de los síntomas positivos de la esquizofrenia y en la prevención de las recaídas psicóticas, su utilización presenta varias limitaciones. Entre un 25-60 % de los pacientes presentan síntomas psicóticos persistentes (debido a resistencia al tratamiento o respuestas parciales), y además sólo se observan mejoras modestas de los síntomas negativos y cognitivos (De Oliveira y Juruena, 2006; Miyamoto y cols., 2002). Además, presentan varios efectos adversos entre los que se incluyen los síntomas extrapiramidales que comprenden: parkinsonismo (rigidez, temblores, acinesia y bradicinesia), distonía aguda, acatisia, síndrome neuroléptico maligno (caracterizado

por rigidez, hipertermia e inestabilidad autónoma, incluidas la hipertensión y la taquicardia), discinesia tardía y distonía tardía (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre la Esquizofrenia y el Trastorno Psicótico Incipiente, 2009). Otros efectos adversos incluyen sedación, sequedad bucal y visión borrosa, aumento de peso, hipotensión ortostática, taquicardia, prolongación del intervalo QT, disfunción eréctil y orgásmica y aumento de los niveles de prolactina en suero (Freedman, 2003; Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre la Esquizofrenia y el Trastorno Psicótico Incipiente, 2009; Wong y Van Tol, 2003).

Los **antipsicóticos atípicos** o de segunda generación representan una nueva generación de antipsicóticos con una incidencia significativamente más baja de efectos extrapiramidales además de poco o ningún efecto en el aumento de prolactina (Kapur y Remington, 2001a). La clozapina, prototipo de los antipsicóticos atípicos, fue introducida en clínica en 1970, sin embargo el riesgo asociado a la producción de agranulocitosis hizo que se retirara del mercado. En 1989 se volvió a reintroducir para tratar a pacientes que no respondían a otros antipsicóticos y siempre acompañada de monitorización hematológica. La clozapina se considera el estándar de oro (*gold standard*) de los antipsicóticos ya que es muy eficaz en el tratamiento de la esquizofrenia resistente debido a la ausencia de los debilitantes efectos extrapiramidales (Elizondo Armendáriz, 2008) y en la reducción del índice de suicidio (Meltzer y cols., 2003a). Desde la introducción de la clozapina se desarrollaron una serie de antipsicóticos atípicos también conocidos como clozapina-like.

Las propiedades farmacológicas que confieren las propiedades terapéuticas de los antipsicóticos atípicos son poco claras a pesar de que existen numerosas teorías que intentan explicarlo, quizás podrían ser debidas a más de un mecanismo (Kapur y Remington, 2001a). Una de las teorías más relevantes propone que los efectos atípicos se deben a una mayor afinidad por el receptor 5-HT_{2A} que por el receptor D₂ (Kapur y Remington, 2001a; Meltzer y cols., 1989), característica común a la clozapina, olanzapina, risperidona, sertindol, quetiapina y ziprasidona. Sin embargo, el aripiprazol que manifiesta propiedades antipsicóticas atípicas actúa como agonista parcial del receptor D₂ aunque tiene alta afinidad como antagonista del receptor

5-HT_{2A} (Shapiro y cols., 2003) y la amisulpirida también con un perfil clínico de antipsicótico atípico es un antagonista de los receptores D₂/D₃ presinápticos sin mostrar antagonismo del receptor 5-HT_{2A} (Moller, 2003). De este modo, aunque la mayoría de los antipsicóticos atípicos presentan una afinidad mayor por los receptores 5-HT_{2A} que por los receptores D₂, las evidencias sugieren que esta afinidad no es ni necesaria ni suficiente para conferir las propiedades atípicas (Kapur y Remington, 2001a).

Otra teoría sugiere que la base de las propiedades de los antipsicóticos atípicos se debe a su rápida disociación de los receptores D₂ de dopamina (Kapur y Seeman, 2001). Aunque este podría ser el caso de la clozapina y de la quetiapina, otros antipsicóticos como la olanzapina, risperidona, sertindol y ziprasidona se disocian muy lentamente del receptor D₂ indicando que la teoría de la rápida disociación no es un mecanismo general a todos los antipsicóticos atípicos (Meltzer y cols., 2003b).

La teoría de la selectividad mesolímbica plantea que los antipsicóticos atípicos bloquean principalmente los receptores D₂ de dopamina en la vía dopaminérgica mesolímbica (asociada a los síntomas psicóticos) más que los receptores D₂ de la vía nigroestriatal (relacionada con los síntomas extrapiramidales). Sin embargo no está bien establecido si estos efectos selectivos en la vía mesolímbica observados con bajas dosis en los animales son relevantes para las dosis utilizadas clínicamente que también se unen de forma significativa a los receptores D₂ en el estriado (Abi-Dargham y Laruelle, 2005). Lo que sí parece una característica común a los antipsicóticos atípicos que los distingue de los típicos, es el mayor aumento (en roedores) de la liberación de dopamina en la corteza prefrontal comparado al núcleo accumbens (De Oliveira y Juruena, 2006; Meltzer, 2004). Esta diferencia se debe en gran parte al antagonismo en el receptor 5-HT_{2A} presináptico, al agonismo directo o indirecto en el receptor 5-HT_{1A} y al débil antagonismo del receptor D₂ (Ichikawa y cols., 2001; Liegeois y cols., 2002; Meltzer, 2004).

Aunque los antipsicóticos atípicos presentan un menor riesgo de síntomas extrapiramidales su superioridad clínica sobre los antipsicóticos típicos ha sido puesta en duda (Lewis y Lieberman, 2008; Meyer, 2007). Además estos fármacos no

están desprovistos de efectos adversos entre los que se incluyen: sedación, hipotensión, sequedad bucal, algunos tipos de disfunción sexual, ganancia de peso (Miyamoto y cols., 2002), diabetes mellitus tipo II, alteraciones del metabolismo de la glucosa, hipercolesterolemia e hiperlipidemia (Allison y cols., 1999; Wirshing y cols., 1998).

Descubrimiento de nuevos fármacos antipsicóticos

El descubrimiento de nuevos fármacos antipsicóticos es un proceso largo y complejo que se ha centrado básicamente en la búsqueda de fármacos selectivos para una diana molecular concreta. Al tratarse de una enfermedad compleja los intentos de buscar el receptor mágico han tenido poco o ningún éxito y no se han conseguido fármacos que mejoren significativamente las características de la clozapina (Gray y Roth, 2007). Las acciones excepcionalmente beneficiosas de la clozapina en el tratamiento de la esquizofrenia son probablemente debidas a su perfil farmacológico complejo que incluye afinidades por receptores serotoninérgicos (5-HT_{2A}, 5-HT_{1A}, 5-HT_{2C}, 5-HT₇ y 5-HT₆), adrenérgicos (α_1 y α_2), dopaminérgicos (D₁, D₂, D₃ y D₄), colinérgicos (M₁, M₂, M₃ y M₄) e histaminérgicos (H₁) (Roth y cols., 2004; Wong y Van Tol, 2003).

Así, aunque el descubrimiento de fármacos en la esquizofrenia ha estado centrado fundamentalmente en la búsqueda de antagonistas de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} cada vez son más los estudios centrados en la búsqueda de nuevos fármacos para tratar la esquizofrenia con afinidad por otras dianas (Tandon y cols., 2010). Un mejor conocimiento de los mecanismos implicados en la acción de los antipsicóticos disponibles y de los procesos biológicos implicados en la fisiopatología de la esquizofrenia facilitará el desarrollo y descubrimiento de nuevos fármacos dirigidos a los receptores de interés que conlleven mayor efectividad y menos efectos adversos asociados. Sin embargo parece que el paradigma de una enfermedad una diana podría no ser adecuado en las enfermedades complejas como la esquizofrenia.

El estudio de la porción del proteoma que comprende a los receptores (“receptoroma”), ha permitido observar conjuntamente las afinidades de los fármacos antipsicóticos por los receptores para neurotransmisores, establecer los perfiles de actividad farmacológica específicos de cada antipsicótico y relacionar estos perfiles

con su eficacia y seguridad (Figura 3; Roth y cols., 2004). Se ha propuesto que el diseño de fármacos selectivamente no selectivos que interactúen con varias dianas (perdigonadas mágicas) (Roth y cols., 2004) posibilitaría un tratamiento más efectivo que los fármacos selectivos de una única diana molecular (balas mágicas) (Gray y Roth, 2007). Por otra parte, el tratamiento óptimo de la esquizofrenia probablemente continuará con el uso de una polifarmacia dirigida a tratar los múltiples dominios sintomáticos de la enfermedad (Carpenter y Koenig, 2008; Gray y Roth, 2007; Hyman y Fenton, 2003) y adecuada a la fase específica de la enfermedad en que se encuentra el paciente (Tandon y cols., 2010). Asimismo, los avances en la farmacogenómica podrían facilitar la identificación de productos génicos implicados en la fisiopatología de la esquizofrenia permitiendo el desarrollo de agentes terapéuticos dirigidos específicamente a la dianas de interés así como de marcadores predictivos de respuesta o de efectos adversos individualizados y de diagnóstico (Arranz y Kapur, 2008; de Leon J., 2009; Tandon y cols., 2010).

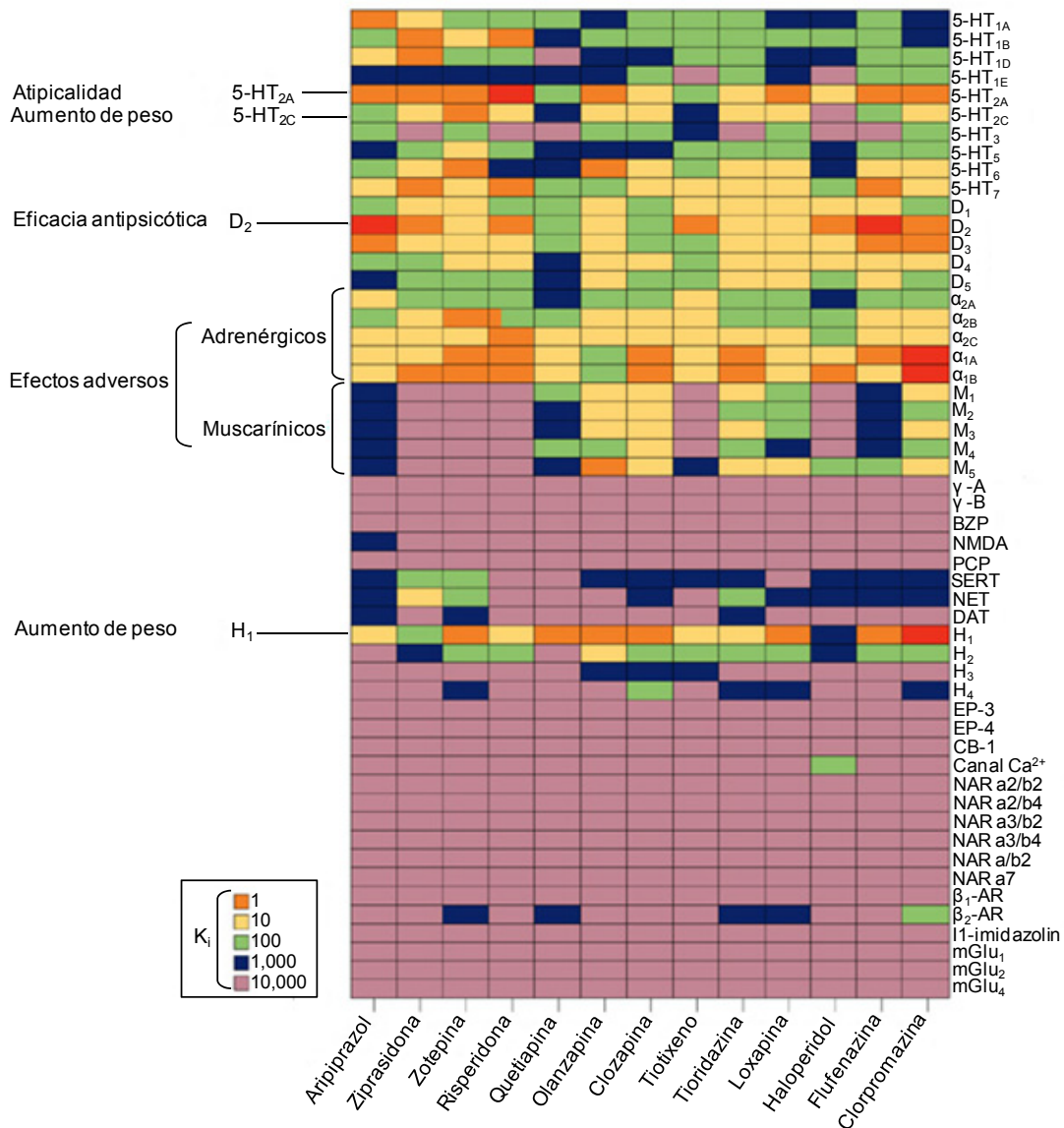


Figura 3: Receptoroma de los antipsicóticos. Constantes de afinidad (K_i) de los fármacos antipsicóticos sobre los receptores para neurotransmisores conocidos del sistema nervioso central (SNC). (Modificado de Roth y cols., 2004).

Intervenciones psicosociales

Las intervenciones psicosociales engloban una serie de medidas encaminadas a minimizar la vulnerabilidad del paciente ante las situaciones de estrés, facilitar los procesos de recuperación, reforzar su adaptación y funcionamiento familiar, social y formativo-laboral, así como a aumentar sus recursos para hacer frente a los conflictos, problemas y tensiones interpersonales o biográficas (Grupo de trabajo de

la Guía de Práctica Clínica sobre la Esquizofrenia y el Trastorno Psicótico Incipiente, 2009; Kern y cols., 2009).

El espectro de las intervenciones psicosociales es muy amplio y abarca diversos tipos de intervenciones, a veces difíciles de delimitar entre ellas, entre las que se incluyen: tratamientos psicoterapéuticos específicos (terapia cognitivo-conductual, psicoterapia de apoyo, psicoterapia psicodinámica), psicoeducación, intervenciones familiares y diversas intervenciones rehabilitadoras y recursos de apoyo a la integración social (rehabilitación cognitiva, entrenamiento en habilidades sociales y en actividades de la vida diaria, actividades expresivas como arteterapia y musicoterapia, apoyo a la inserción laboral y recursos de vivienda) (Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre la Esquizofrenia y el Trastorno Psicótico Incipiente, 2009; Tandon y cols., 2010). A pesar de la ausencia de un método de categorización de los tratamientos psicosociales, cada vez son más las evidencias de la eficacia de estas intervenciones sociales por lo que son recomendadas en la aplicación clínica (Dixon y cols., 2010).

Neurobiología

A pesar de que no se ha identificado ningún diagnóstico neuropatológico para la esquizofrenia, se han descrito varias alteraciones neurobiológicas en la estructura, función, fisiología y neuroquímica cerebral.

En la esquizofrenia existe una reducción del volumen cerebral y un incremento del volumen ventricular (Shenton y cols., 2001; Wright y cols., 2000). Estas reducciones se observan fundamentalmente en estructuras del lóbulo temporal, en particular el hipocampo, la amígdala, y el giro dentado superior, la corteza prefrontal, el tálamo, el cíngulo anterior y el cuerpo calloso (Keshavan y cols., 2008). Se ha descrito una reducción de la sustancia gris (Lawrie y Abukmeil, 1998) y en estructuras de la sustancia blanca como el cuerpo calloso (Arnone y cols., 2008). Existen evidencias macroscópicas de una disminución del peso y de la longitud cerebral (Harrison, 1999b). Las asimetrías normales del cerebro están reducidas o incluso son revertidas, y los cambios patológicos parecen afectar de modo más pronunciado al hemisferio cerebral izquierdo que al derecho (Harrison, 1999b).

Las alteraciones neuropatológicas observadas en los estudios postmortem son sutiles. Se observa una ausencia de gliosis (Arnold y cols., 1998; Harrison, 1999b), y aunque hay poca evidencia de pérdida neuronal en algunos estudios se observa una reducción de interneuronas en ciertas regiones cerebrales (Benes y cols., 1991). Existe una disminución del neuropilo interneuronal en la corteza prefrontal (Selemon y Goldman-Rakic, 1999), con una densidad neuronal normal o aumentada (Cullen y cols., 2006), un volumen del soma de las células piramidales normal (Highley y cols., 2003) o disminuido (Pierri y cols., 2001) y una reducción del número de espinas dendríticas de las células piramidales (Glantz y Lewis, 2000). Se sugiere que podría existir una desorganización neuronal en la corteza y en las estructuras límbicas que se relaciona con alteraciones en la migración neuronal, aunque se necesitan más estudios para confirmar estos hallazgos (Keshavan y cols., 2008).

Los estudios funcionales de imagen muestran una pérdida de activación de la corteza prefrontal dorsolateral tanto en el reposo como cuando se realizan tareas cognitivas mediadas por esta estructura cerebral (hipofrontalidad) (Berman y Meyer-Lindenberg, 2004; Hill y cols., 2004). Además se observa una alteración en la conectividad funcional recíproca entre la corteza prefrontal dorsolateral y el hipocampo (Meyer-Lindenberg y cols., 2005).

Las técnicas neurofisiológicas, que implican el estudio de la actividad eléctrica cerebral en el descanso o mientras los individuos participan en un paradigma experimental, han permitido observar varias alteraciones neurofisiológicas. Se ha observado una reducción de la *Mismatch negativity* (MNN) (Umbricht y Krljes, 2005), una reducción de la respuesta auditiva P300 (Jeon y Polich, 2003), un déficit en la capacidad del cerebro para atenuar la respuesta P50 (Clementz y cols., 1998) y una reducción de la inhibición del prepulso (PPI) (Braff y Light, 2005). Además también se relaciona a la esquizofrenia con alteraciones en el movimiento de los ojos y en la estructura del sueño (Keshavan y cols., 2008).

En relación a las alteraciones neuroquímicas, las técnicas de imagen *in vivo* y los estudios *postmortem* han permitido observar cambios en el metabolismo, en los sistemas de neurotransmisión y cambios neuroendocrinos. En relación a los cambios metabólicos, mediante estudios de espectroscopía de resonancia magnética se han observado reducciones en los niveles del N-acetil-aspartato (considerado un

marcador del funcionamiento del tejido neuroaxonal) en varias regiones cerebrales (Abbott y Bustillo, 2006) así como disminuciones de los niveles de fosfoesteres en la región prefrontal, lo que sugiere una disminución de la síntesis de fosfolípidos de membrana (Smesny y cols., 2007). Estos estudios revelan reducciones en la integridad neuronal y en la de sus membranas (Keshavan y cols., 2008). Con respecto a los sistemas de neurotransmisión se han descrito alteraciones en prácticamente todos los sistemas cerebrales de neurotransmisión estudiados. Se han descrito aumentos de la densidad del receptor D₂ en el estriado (Laruelle, 1998), disminuciones de la densidad del receptor 5-HT_{2A} en la corteza (Harrison, 1999a), disminución de la expresión de los receptores de glutamato especialmente de la subunidad del receptor NMDA principalmente en la corteza prefrontal y el hipocampo (Harrison y cols., 2003) y reducciones de los niveles de expresión de GABA en la corteza prefrontal (Lewis y cols., 2005) entre otros. Además en la esquizofrenia se han observado alteraciones neuroendocrinas, como disregulación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal observándose una elevación de la secreción de cortisol en los pacientes psicóticos (Keshavan y cols., 2008).

A partir de estas alteraciones cerebrales se puede establecer la conclusión de que la esquizofrenia es una enfermedad no circunscrita a una única región cerebral, con cambios microscópicos sutiles que originan una gran variedad de manifestaciones clínicas. Uno de los retos actuales persigue establecer los mecanismos fisiopatológicos por los cuales estos cambios cerebrales no específicos originan los síntomas de la esquizofrenia (Wong y Van Tol, 2003).

II. RECEPTORES ACOPLADOS A PROTEÍNAS G (GPCRs)

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), también conocidos como receptores de siete dominios transmembrana, constituyen la familia más grande, más ubicua y más versátil de receptores de membrana (Pierce y cols., 2002), responsables de la transducción de la mayoría de señales a través de la membrana plasmática (Weis y Kobilka, 2008). En el genoma humano se han identificado aproximadamente 1000 genes de GPCRs diferentes (Takeda y cols., 2002; Tikhonova y Costanzi, 2009) que se corresponden con más del 1% del genoma humano (Venter y cols., 2001;

Luttrell, 2008). A los GPCRs se unen una gran variedad de estímulos extracelulares como neurotransmisores, hormonas, odorantes, iones y fotones de luz y regulan múltiples vías de señalización. Debido a esta gran diversidad están implicados en la regulación de distintos procesos fisiológicos como neurotransmisión, metabolismo, proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Las mutaciones en los genes que codifican estos receptores se asocian con enfermedades neurológicas, neurodegenerativas, cardiovasculares y metabólicas, además del cáncer (Figura 5) (Lundstrom, 2005). La distribución ubicua en la membrana celular junto con su implicación en multitud de procesos fisiológicos y patológicos, explica su gran importancia como dianas terapéuticas. Aproximadamente un 50 % de los fármacos disponibles actualmente actúan en estos receptores (Heitzler y cols., 2009), por lo que despiertan un gran interés para el desarrollo de nuevos candidatos a fármacos en estas dianas (Panetta y Greenwood, 2008).

Existen varios sistemas de clasificación que han sido utilizados para agrupar a los GPCRs en base a sus ligandos o similitudes fisiológicas y estructurales. Uno de los sistemas más ampliamente utilizados divide a los GPCRs, tanto de vertebrados como de invertebrados, en seis familias (Familias A-F) de las cuales tres (Familias A, B y C) contienen la mayoría de los receptores humanos conocidos (Kolakowski, Jr., 1994). Posteriormente, en base a la secuencia y a la similitud estructural los GPCRs de humanos han sido divididos en cinco familias: rodopsina (familia A), secretina (familia B), glutamato (familia C), adhesión y frizzled/taste2 (Fredriksson y cols., 2003). La familia A es la más grande y mejor caracterizada desde el punto de vista estructural y funcional e incluye muchos de los receptores para aminas biogénicas y péptidos pequeños (Gether, 2000; Jacoby y cols., 2006; Kroeze y cols., 2003).

Estructura y vías de señalización

La estructura prototípica de los GPCRs se basó durante años en la de la rodopsina, para la cual existen datos bioquímicos y biofísicos, incluyendo la estructura cristalina de alta resolución (Palczewski y cols., 2000; Palczewski, 2006). El conocimiento posterior de las estructuras de los receptores adrenérgico β_2 , β_1 , adenosina A_{2A} y opsina (con y sin la asociación de la subunidad G_α), aportaron

información tanto de la estructura como de los mecanismos moleculares implicados en la activación de los GPCRs (Kenakin y Miller, 2010; Millar y Newton, 2010; Mustafi y Palczewski, 2009; Nygaard y cols., 2009).

A pesar de la enorme diversidad estructural de sus ligandos y de sus secuencias aminoacídicas, esencialmente, todos los GPCRs comparten una estructura formada de una única cadena polipeptídica plegada en siete α -hélices transmembrana (TMI-VII), unidas por tres lazos extracelulares (e1, e2 y e3) y tres lazos intracelulares (i1, i2 e i3). El extremo N-terminal se localiza en el espacio extracelular mientras que el extremo C-terminal está en el citoplasma (Figura 4). Los dominios transmembrana presentan un amplio grado de conservación de la secuencia, mientras que los dominios intracelulares y extracelulares varían ampliamente en tamaño y complejidad. Las regiones transmembrana y extracelular del receptor están implicadas en la unión del ligando mientras que los dominios intracelulares son importantes para la transducción de la señal y la modulación de la función del receptor (Kobilka, 2007; Luttrell, 2008; Tikhonova y Costanzi, 2009).

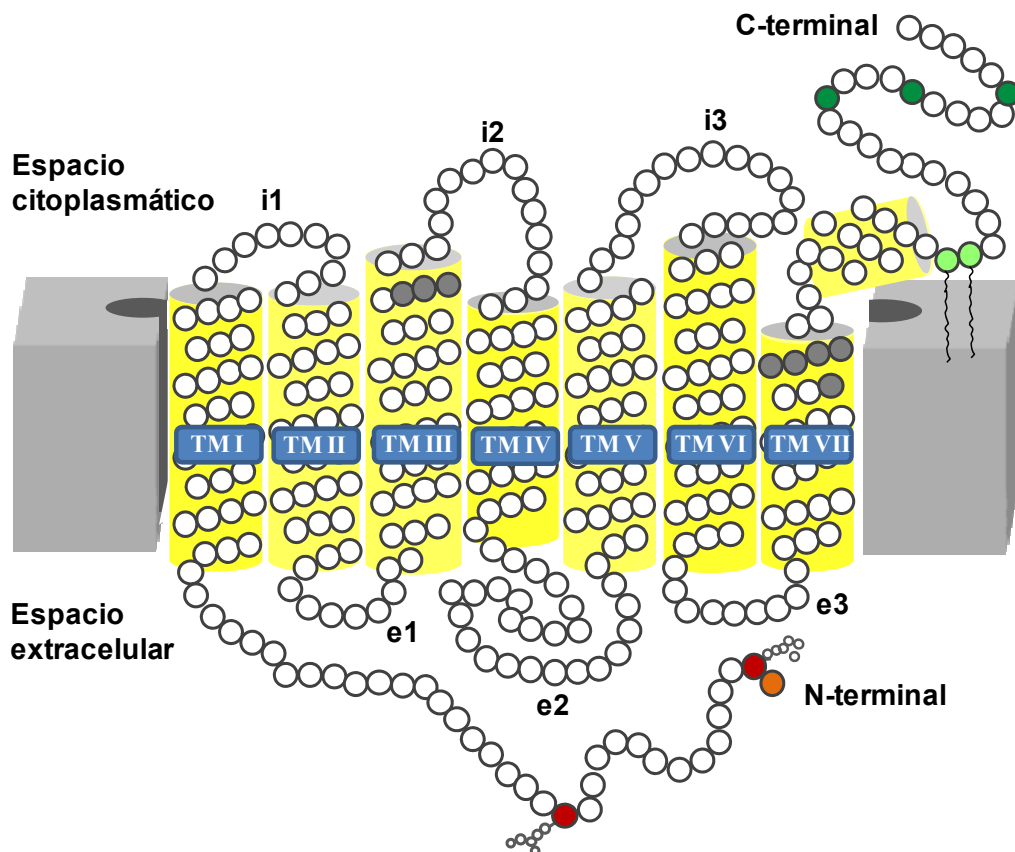


Figura 4: Representación de la estructura de la rodopsina. Se muestran los sitios de glicosilación (rojo), de acetilación (naranja), de palmitoilación (verde claro), de fosforilación (verde) y los sitios importantes (gris) en la transformación de la conformación inactiva a la acoplada a proteína G. (Modificado de Palczewski, 2006).

El modelo básico de señalización por GPCRs deriva de la capacidad de estos receptores de actuar como factores de intercambio de nucleótidos de guanina activados por ligando (GEFs) para las proteínas de unión de nucleótidos de guanina heterotriméricas (proteínas G) (Luttrell, 2008). Las proteínas G son GTPasas que en estado inactivo están formadas de una subunidad $G\alpha$ unida a GDP con actividad GTPasa intrínseca y unida no covalentemente a la subunidad heterodimérica $G\beta\gamma$.

El receptor activado, vía actividad constitutiva o en respuesta a la unión de un agonista, se acopla a la proteína G y la activa promoviendo el intercambio de GDP por GTP en la subunidad $G\alpha$. La unión del GTP induce un cambio conformacional en la subunidad $G\alpha$ originando la disociación de la subunidad $G\alpha$ del complejo β/γ . Tanto la subunidad $G\alpha$ activada como el complejo β/γ interactúan y regulan diversos

sistemas efectores incluyendo enzimas que generan segundos mensajeros y una variedad de canales iónicos.

Los sistemas efectores movilizados por un receptor determinado dependen del tipo de proteína G que active dicho receptor. Se han identificado 21 subunidades $G\alpha$ codificadas por 16 genes, 6 $G\beta$ codificadas por 5 genes y 12 $G\gamma$ que permiten la formación de muchas combinaciones diferentes (Oldham y Hamm, 2006). En base a la similitud de la secuencia primaria de las subunidades $G\alpha$ las proteínas G se dividen en cuatro clases principales: $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ y $G\alpha_{12}$ (Kristiansen, 2004; Oldham y Hamm, 2006). Aunque esta clasificación es bastante arbitraria, existe un mecanismo general entre los miembros de cada clase. Las proteínas $G\alpha_s$ y $G\alpha_i$ se caracterizan por ejercer un efecto positivo o negativo, respectivamente, en la adenilato ciclasa y AMPc. Las $G\alpha_q$ se asocian con un efecto positivo en la fosfolipasa C- β (PLC β) y los subsiguientes niveles de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y Ca^{+2} . Las proteínas $G\alpha_{12}$ están implicadas en la regulación de pequeñas proteínas de unión a GTP como las proteínas Rho (Figura 5). Los GPCRs tiene la capacidad de acoplarse selectivamente a los miembros de una o más de estas subfamilias de proteínas G permitiendo la modulación selectiva de las vías de señalización.

La desactivación de estas vías de señalización dependientes de proteínas G ocurre por medio de la hidrólisis de GTP a GDP por la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad $G\alpha$, un proceso aumentado por las proteínas acelerantes de GTPasa (GAPs) como las proteínas de señalización de reguladores de proteínas G (RGS). La subunidad $G\alpha$ en su forma inactiva unida a GDP se reasocia con el complejo $\beta\gamma$ completándose el ciclo (Hur y Kim, 2002; Johnston y Siderovski, 2007; Kristiansen, 2004; McCudden y cols., 2005; Milligan y Kostenis, 2006; Pierce y cols., 2002; Williams y Hill, 2009). Adicionalmente, los GPCRs participan en vías de señalización independientes de proteínas G a través de la interacción con otras proteínas accesorias entre las que se incluyen β -arrestinas, tirosinas cinasas y proteínas con dominio PDZ (Bockaert y cols., 2004; Heitzler y cols., 2009; Sun y cols., 2007).

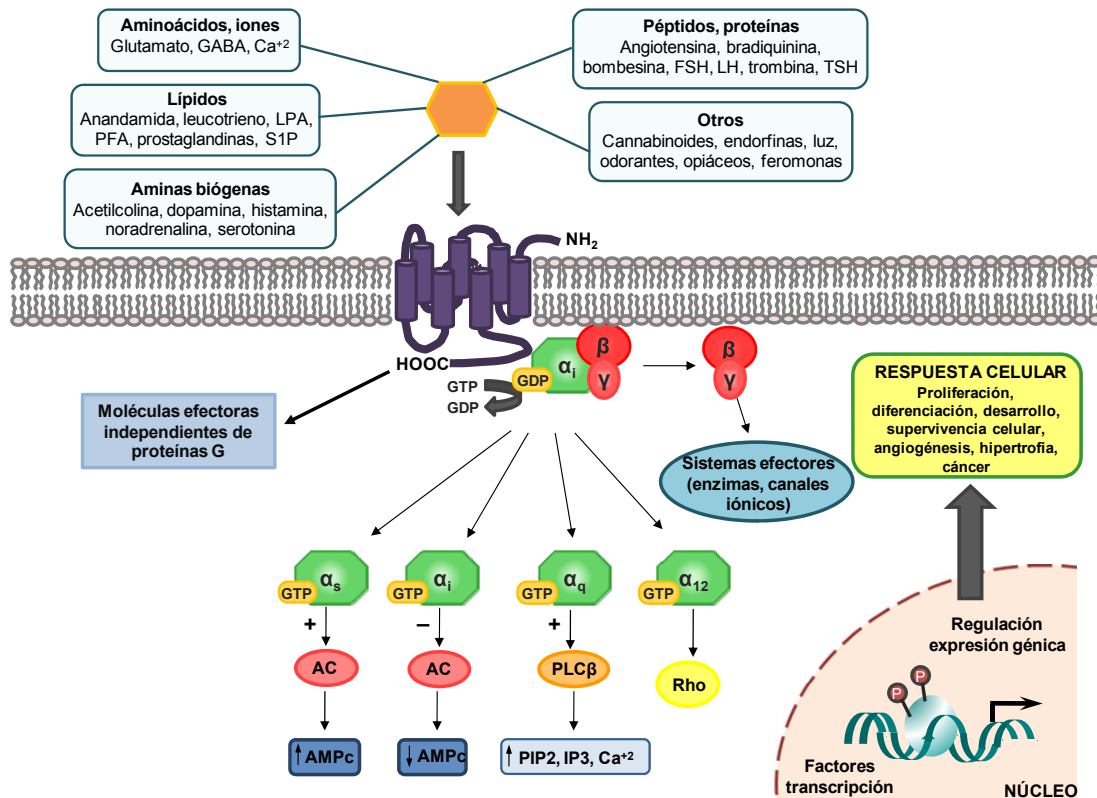


Figura 5: Representación esquemática de los diversos mecanismos de señalización de los GPCRs. (Esquema basado en Lundstrom, 2005; Marinissen y Gutkind, 2001)

Las vías de señalización de los GPCRs son reguladas negativamente a nivel del receptor por mecanismos de desensibilización, internalización y *down-regulation*. Estos mecanismos implican que el receptor se desacople de la proteína G, la endocitosis del receptor, el reciclaje o la degradación del receptor y la reducción de la síntesis de nuevos receptores (Luttrell, 2008).

Modelos de activación como desplazamientos de equilibrios conformacionales

A partir de la información derivada de medidas indirectas de la conformación del receptor, como afinidad de la unión de ligandos y activación de proteínas G o enzimas efectoras, se han desarrollado diversos modelos cinéticos para explicar la activación de los GPCRs (Figura 6) (Bridges y Lindsley, 2008; Casado y cols., 2007; Kenakin, 2002b; Kobilka, 2007; Maudsley y cols., 2005; Park y cols., 2008). En el más simple de estos modelos, la activación del receptor se describe a partir de la

unión de una agonista al receptor en estado inactivo (R) para formar un complejo AR, el agonista provoca la isomerización del receptor al estado activo (AR^{*}). A partir del conocimiento progresivo de las interacciones ligando-receptor más complejas se desarrollaron otros modelos más sofisticados. El modelo del complejo ternario surge como una expansión del modelo de unión simple y considera no solo la interacción entre el agonista y el receptor sino también entre el receptor activado y la proteína G, siendo por tanto el complejo AR^{*}G el responsable de mediar la respuesta (De Lean y cols., 1980; Kenakin, 2002b). La observación de que los receptores presentan actividad constitutiva, es decir son capaces de isomerizar de un estado inactivo a un estado activo independientemente de un agonista, dio lugar a la idea de que el estado activo de los receptores es una propiedad intrínseca de los mismos más que del complejo receptor-proteína G (Kenakin, 2001; Milligan, 2003a; Park y cols., 2008; Seifert y Wenzel-Seifert, 2002). El hecho de que los agonistas se pueden unir con alta afinidad a receptores activos constitutivamente independiente de proteínas G, no puede ser explicado por el modelo del complejo ternario y por lo tanto fue necesaria la formulación del modelo del complejo ternario extendido (Park y cols., 2008; Samama y cols., 1993). Según este modelo, el receptor existe en dos estados interconvertibles que son una propiedad intrínseca del receptor: un estado inactivo (R) que une al agonista con baja afinidad y un estado activo (R^{*}) que une al agonista con alta afinidad. Este modelo implica por tanto que este estado activo del receptor generado de forma espontánea puede interaccionar con la proteína G incluso en ausencia de unión del agonista. Una versión simplificada de este modelo, es el modelo de dos estados, que postula la existencia de un equilibrio entre dos formas conformacionales del receptor, inactiva (R) y activa (R^{*}) pero no considera la interacción con la proteína G (Leff, 1995). Por extensión al modelo del complejo ternario extendido se desarrolló el modelo del complejo ternario cúbico que permite la interacción del receptor en estado inactivo con la proteína G para formar un complejo RG que no produce una respuesta sino que es requerido termodinámicamente como una característica del sistema pero que, probablemente, no es fisiológicamente relevante (Bridges y Lindsley, 2008; Casado y cols., 2007; Kenakin, 2002b).

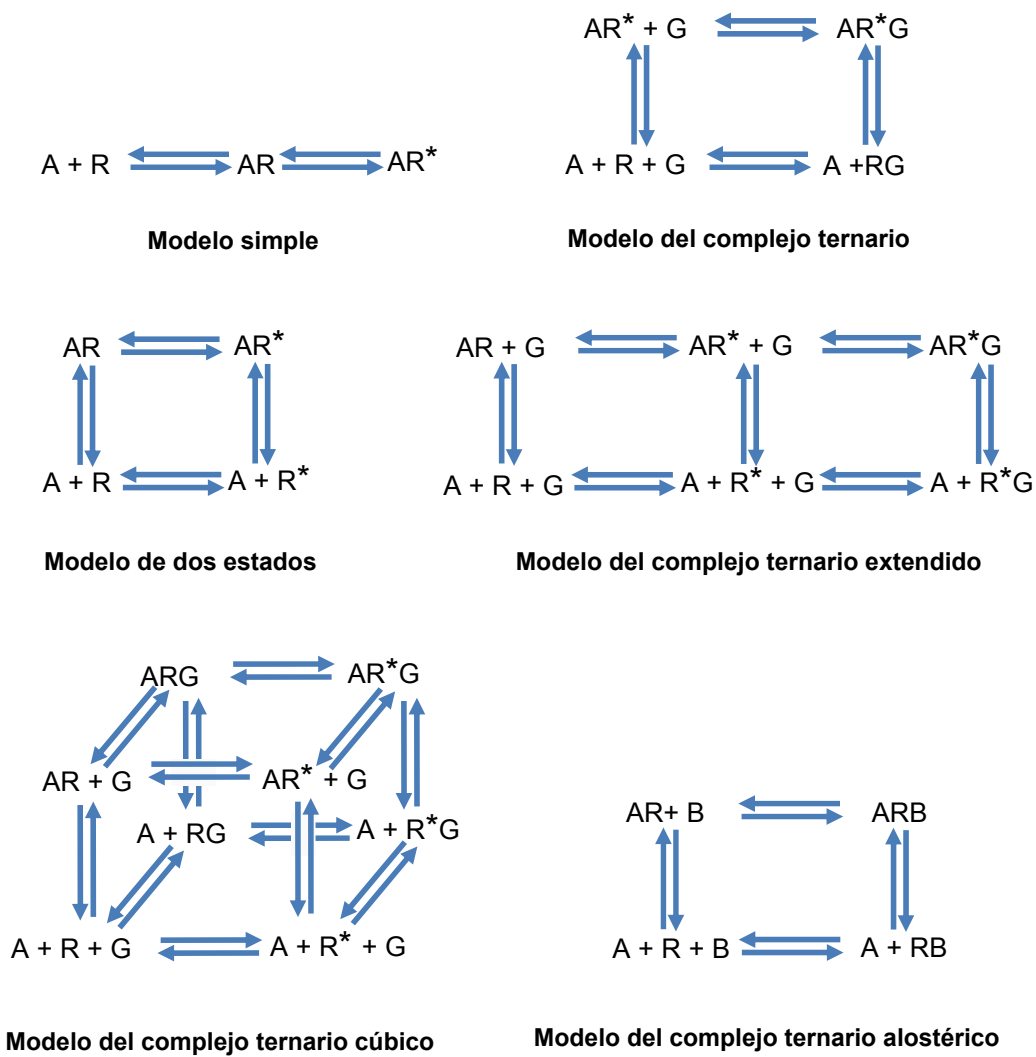


Figura 6: Modelos cinéticos de activación de GPCRs. (Modificado de Bridges y Lindsley, 2008).

Los ligandos que se unen al receptor pueden ser clasificados por la naturaleza de los efectos funcionales que producen debido a su interacción con el sitio de unión ortostérico (sitio de unión del ligando endógeno) del receptor. Las propiedades moleculares que gobiernan estos efectos son la afinidad, entendida como la fuerza que causa la unión del ligando al receptor y la eficacia definida como la propiedad de una molécula que causa el cambio de comportamiento del receptor hacia la célula (Kenakin, 2007). En base a estos conceptos los ligandos que se unen al receptor pueden ser ampliamente clasificados como agonistas y antagonistas. Los agonistas se unen al receptor para promover una respuesta celular y son clasificados como

agonistas totales o parciales. Los agonistas totales producen una activación total del receptor dando lugar a la producción de una respuesta máxima del sistema, mientras que los agonistas parciales activan al receptor en distintos grados dando lugar a una respuesta no total del sistema. Los antagonistas no producen una respuesta fisiológica pero bloquean la unión de un agonista endógeno o exógeno al receptor impidiendo la respuesta celular. En contraste a los agonistas totales o parciales, los agonistas inversos se unen preferentemente a los estados inactivos del receptor desplazando el equilibrio hacia esos estados y disminuyendo la actividad constitutiva del sistema, aunque también pueden comportarse como antagonistas en sistemas no activados constitutivamente (Kenakin, 2001; Maudsley y cols., 2005; Park y cols., 2008). Según este sistema de clasificación la eficacia ha sido descrita como un parámetro que es constante para cada ligando en un receptor determinado y sólo permite observar variaciones en la cantidad del estímulo inducido a la célula pero no en la cualidad (Urban y cols., 2007).

Sin embargo, aunque los modelos basados en la existencia de dos estados conformacionales pueden describir gran parte del comportamiento funcional de los receptores, así como explicar el espectro de repuestas a ligandos de eficacia diferente, existen evidencias experimentales crecientes que apuntan a la existencia de múltiples estados conformacionales del receptor (Kenakin, 2003; Kenakin y Miller, 2010; Kobilka, 2007; Park y cols., 2008). De este modo, los GPCRs pueden ser entendidos como estructuras altamente dinámicas que existen en un equilibrio dinámico entre distintas conformaciones, algunas de las cuales son capaces de producir un efecto (“conformaciones activas”) mientras otras son inactivas (Kenakin, 2002b; Kenakin, 2003; Kenakin y Miller, 2010). Entendiendo el concepto de eficacia como la propiedad de una molécula capaz de provocar un cambio en el comportamiento del receptor, se pueden describir numerosas formas de eficacia (unión de ligando, acoplamiento a proteínas G, interacción con proteínas accesorias, oligomerización, fosforilación, internalización, etc.) que se pueden relacionar con diferentes conformaciones del receptor (Kenakin, 2002b; Kenakin, 2003; Kenakin, 2007; May y cols., 2007). En este contexto, se puede introducir el concepto de selectividad funcional por la que un ligando es capaz de estabilizar un estado conformacional determinado del receptor dando lugar a un comportamiento

específico, así diferentes ligandos podrían afectar un tipo de comportamiento respecto a otro por medio de la estabilización diferencial de las conformaciones (Gilchrist, 2007; Kenakin, 2002b; Kenakin, 2003; Kenakin, 2007; Kenakin, 2010; Urban y cols., 2007). En este sentido, la existencia de múltiples conformaciones activas del receptor hace plausible que los agonistas puedan cambiar no solo el grado, sino también la cualidad de la activación del receptor presentando la oportunidad de desarrollar fármacos que cambien la cualidad además de la cantidad de la eficacia (Kenakin, 2002a; Maudsley y cols., 2005). Además, habría que tener en cuenta que tal selectividad funcional puede manifestarse de modo diferente en el mismo receptor expresado en los distintos entornos celulares que están presentes, no solo en células distintas y en órganos distintos, sino incluso en la misma célula en un único órgano donde podría ser afectado diferencialmente por su entorno local (Kenakin y Miller, 2010).

Alosterismo

El alosterismo es un mecanismo bioquímico extremadamente importante, definido como el “segundo secreto de la vida”. Se relaciona con un cambio en la forma y en la actividad de una proteína originado por la combinación con otra sustancia en un punto distinto al del sitio activo (Fenton, 2008; Kenakin y Miller, 2010). Una interacción alostérica se define como una interacción que ocurre en un mismo receptor entre dos (o más) sitios de unión topográficamente distintos (Christopoulos y Kenakin, 2002). En este sentido, se puede definir a los moduladores alostéricos como ligandos que se unen a dominios del receptor topográficamente distintos del sitio ortostérico alterando la actividad biológica del ligando ortostérico por medio de cambios en su afinidad de unión, su eficacia funcional o ambos (Gilchrist, 2007; May y cols., 2007; Wang y cols., 2009).

La modulación alostérica de la función de los GPCRs puede surgir de la interacción del ligando alostérico en la superficie extracelular del receptor (alosterismo clásico), en el plano de la bicapa lipídica incluyendo interacciones con otros GPCRs y otras proteínas de membrana (alosterismo lateral: oligomerización) o en la superficie citoplasmática debido a interacciones con las proteínas G u otras

proteínas citoplasmáticas (selectividad funcional) (Kenakin y Miller, 2010). Así, aunque las interacciones alostéricas pueden manifestarse en una variedad de modos, la unión de un modulador alostérico podría causar un cambio conformacional en el receptor que se transmite al sitio ortostérico (y viceversa), originando un estado del receptor con propiedades de unión y de función características y añadiendo así otra capa de complejidad a la regulación de la señalización por GPCRs (Christopoulos y Kenakin, 2002; Conn y cols., 2009; May y cols., 2007; Wang y cols., 2009).

Para explicar estos fenómenos de regulación alostérica se han desarrollado los modelos alostéricos de activación (Casado y cols., 2007; Christopoulos y Kenakin, 2002; May y cols., 2007). El más simple de estos modelos es el modelo alostérico del complejo ternario, que es una generalización del modelo del complejo ternario en el que la modulación alostérica no se limita a las proteínas G (Figura 6) (Casado y cols., 2007). Una extensión de este modelo es el modelo alostérico de dos estados que describe la interacción de un ligando alostérico en un receptor que es capaz de isomerizar entre un estado inactivo (R) y un estado activo (R*) (Hall, 2000). Adicionalmente, se desarrollaron modelos más complejos entre los que se incluyen: el modelo de múltiples sitios alostéricos, el modelo del complejo cuaternario de interacciones alostéricas, que incorpora las proteínas G al modelo alostérico de dos estados, así como los modelos que consideran la modulación alostérica que ocurre en los receptores diméricos (Casado y cols., 2007; Christopoulos y Kenakin, 2002; Durroux, 2005; May y cols., 2005).

Oligomerización

La generación de complejos funcionales vía dimerización u oligomerización es común entre las proteínas, incluyendo las proteínas de membrana. Sin embargo durante muchos años se asumió que los GPCRs existían y funcionaban como especies monoméricas (Milligan, 2004). Aunque la existencia de monómeros y su posible función fisiológica no puede ser excluida (Chabre y le, 2005; Franco y cols., 2008a; Whorton y cols., 2007), existen evidencias crecientes que indican que los GPCRs pueden formar y funcionar como dímeros u oligómeros de mayor orden (Angers y cols., 2002; Franco y cols., 2008a; Milligan y Smith, 2007; Milligan,

2008; Milligan, 2009; Terrillon y Bouvier, 2004) que podrían tener relevancia terapéutica (Franco y cols., 2008b; Kenakin y Miller, 2010).

La organización de los GPCRs en estructuras diméricas u oligoméricas ha sido propuesta a partir de distintos métodos entre los que se incluyen: estudios de unión de ligandos, de coimmunoprecipitación, de transferencia de energía de fluorescencia (FRET), de transferencia de energía de bioluminiscencia (BRET), estudios de co-internalización y de microscopía de fuerza atómica (AFM) (Milligan, 2004; Milligan, 2008; Park y cols., 2008). La detección de dímeros a partir de estudios de unión de ligandos se basa en la existencia de fenómenos de cooperatividad entre los protómeros del dímero. Estos fenómenos de cooperatividad se pueden explicar asumiendo que la unión del primer ligando al dímero modifica (positivamente o negativamente) los parámetros de unión del segundo ligando. Así los ligandos se pueden unir a los dímeros induciendo fenómenos de cooperatividad positiva o negativa que resultan en modificaciones en los perfiles de las curvas de saturación y competición obtenidas en los ensayos de unión de ligandos (Albizu y cols., 2006; Durroux, 2005). En este contexto, las curvas de competición bifásica se pueden explicar por la existencia de fenómenos de cooperatividad negativa entre los protómeros del dímero (Albizu y cols., 2006; Casado y cols., 2007).

Considerando la unión de los ligandos a un receptor dimérico se han desarrollado nuevos modelos matemáticos (Durroux, 2005; Franco y cols., 2005; Franco y cols., 2006). El modelo dimérico de dos estados (Franco y cols., 2005; Franco y cols., 2006) es una extensión que considera la existencia de dos estados de los receptores diméricos, uno inactivo (RR) y otro activo (RR*), y se basa en la posibilidad de que los cambios conformacionales en una molécula del dímero se transmitan a la segunda molécula. El ajuste de los datos de los ensayos de unión de ligandos utilizando estos modelos permite obtener parámetros más relevantes como el “índice de cooperatividad” que refleja la comunicación molecular dentro del dímero (Casado y cols., 2007). Adicionalmente, para explicar los fenómenos de selectividad funcional asociados a los receptores diméricos se ha propuesto el modelo del receptor dimérico de tres estados que considera la existencia del receptor en un estado inactivo (RR) y dos activos, (RR*) y (RR**), uno de ellos asociado a una vía de señalización y otro de los estados activos asociado a otra vía de

señalización distinta (Brea y cols., 2009). En una extensión de este modelo se propone la existencia de estados diméricos asimétricos en los que existen diferencias entre los protómeros dentro de un estado particular, proponiéndose la existencia de tres estados: uno inactivo (RR) y dos activos, uno con asimetría de los protómeros (R*R) y otro con una disposición simétrica de los protómeros (R*R*) (Rovira y cols., 2010).

Receptor D₂

La dopamina es el neurotransmisor catecolaminérgico predominante en el Sistema Nervioso Central (SNC) de los mamíferos, donde controla una variedad de funciones incluyendo la actividad locomotora, la cognición, la emoción, el reforzamiento positivo, la ingesta de comida y la regulación endocrina (Missale y cols., 1998). Las alteraciones del sistema dopaminérgico han sido implicadas en la fisiopatología de varios desordenes psiquiátricos y neurológicos entre los que se incluye la esquizofrenia (Goto y Grace, 2007; Howes y cols., 2009).

La dopamina es sintetizada por las neuronas mesencéfalicas de la sustancia negra y del área tegmental ventral (VTA) y por las neuronas del núcleo arcuato y periventricular del hipotálamo (Cooper y cols., 2003). Estas neuronas proyectan sus axones a otras áreas cerebrales originando cuatro vías dopaminérgicas principales: nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical y tuberoinfundibular. La neuronas de la vía nigroestriatal proyectan sus axones desde la sustancia negra al estriado dorsal y esta vía está implicada fundamentalmente en la integración cognitiva, la habituación y el control de la actividad motora. La vía mesolímbica proyecta desde el VTA a estructuras límbicas como el estriado ventral, el hipocampo y la amígdala. La vía mesocortical se origina en el VTA y proyecta a regiones corticales, principalmente a la corteza orbitofrontal, prefrontal medial y cingulada, pero también a la corteza dorsolateral prefrontal (DLPFC) y a la corteza temporal y parietal. El sistema dopaminérgico mesocorticolímbico juega un papel importante en la regulación de la función emocional y cognitiva. La vía tuberoinfundibular proyecta desde los núcleos arcuato y periventricular del hipotálamo a la glándula pituitaria e interviene en la

regulación de la secreción de prolactina (Bozzi y Borrelli, 2006; Dziedzicka-Wasylewska, 2004; Guillin y cols., 2007; Wilson y cols., 1998).

Una de las hipótesis fisiopatológicas más importantes de la esquizofrenia es la hipótesis dopaminérgica que postula la existencia de un exceso de dopamina (hiperdopaminergia) a nivel subcortical asociado con los síntomas positivos y una deficiencia a nivel cortical (hipodopaminergia) asociada con los síntomas negativos y el deterioro cognitivo característicos de la esquizofrenia (Abi-Dargham, 2004; Guillin y cols., 2007; Lieberman y cols., 2008). En una revisión reciente basada en distintas evidencias se ha propuesto una modificación de esta hipótesis que implica la interacción entre múltiples factores ambientales y genéticos que darían lugar a una vía final común de hiperdopaminergia mesoestriatal presináptica asociada con la psicosis. Adicionalmente, la interacción de estos factores diversos influiría en otros sistemas de neurotransmisión afectando así otros aspectos de la función cerebral y originando los síntomas negativos y el deterioro cognitivo que en muchos casos preceden a la psicosis. Esta nueva hipótesis permitiría establecer una conexión entre las alteraciones neuroquímicas y los síntomas y proporcionaría una explicación al hecho de que diversos factores de riesgo así como distintas alteraciones funcionales y estructurales se asocien con la esquizofrenia pero no sean específicos de la enfermedad (Howes y Kapur, 2009).

Las diversas acciones fisiológicas de la dopamina son mediadas a través de su interacción con al menos cinco subtipos distintos de GPCRs que de acuerdo a sus similitudes estructurales y farmacológicas se pueden dividir en dos subfamilias, la D₁ que comprende los receptores D₁ y D₅ y la subfamilia D₂ que incluye los receptores D₂, D₃ y D₄. Los receptores de la subfamilia D₁ se acoplan a proteínas G_{as} y activan la adenilato ciclasa incrementando la concentración intracelular del segundo mensajero adenosín monofosfato cíclico (AMPC). Los de la subfamilia D₂ se acoplan a proteínas G_{ai/o} inhibiendo la formación de AMPC mediante la inhibición de la adenilato ciclasa y además activan canales K⁺ (Dziedzicka-Wasylewska, 2004; Guillin y cols., 2007; Missale y cols., 1998; Nicola y cols., 2000).

De todos los receptores de dopamina el receptor D₂ ha sido de gran interés en la fisiopatología de la esquizofrenia y es la diana común de los fármacos antipsicóticos (Seeman, 2001). El bloqueo de estos receptores en las distintas vías

dopaminérgicas se asocia con distintos efectos, así el bloqueo a nivel límbico se relaciona con la capacidad de los antipsicóticos de aliviar los síntomas positivos, mientras que el bloqueo en el estriado se asocia con los efectos extrapiramidales y el bloqueo en la glándula pituitaria se relaciona con la hiperprolactinemia (Wilson y cols., 1998). La característica fundamental de los antipsicóticos atípicos es su capacidad para producir un efecto antipsicótico en ausencia de efectos extrapiramidales o elevación de la prolactina. Esta característica se ha atribuido a distintas causas como su interacción con otros receptores y sistemas de neurotransmisores. Sin embargo fármacos dirigidos a estos receptores no han mostrado actividad antipsicótica a menos que vayan acompañados por algún grado de bloqueo del receptor D₂. De este modo, la modulación de los receptores D₂ es una condición necesaria y suficiente para la acción de los fármacos antipsicóticos (Kapur y Mamo, 2003).

Los receptores D₂ se expresan a niveles elevados en el estriado, a baja expresión en el hipocampo, corteza entorrinal, tálamo y a muy baja expresión en la corteza prefrontal (Guillin y cols., 2007). Las investigaciones del receptor D₂ en la esquizofrenia se han centrado fundamentalmente en el estriado debido a la densidad más elevada de este receptor en esta área cerebral (Takahashi y cols., 2006). La descripción de una elevada densidad de los receptores D₂ en el estriado de los pacientes con esquizofrenia ha sido consistente en una gran cantidad de estudios postmortem (Guillin y cols., 2007; Joyce y cols., 1988; Mita y cols., 1986; Soares y Innis, 1999). Sin embargo, la interpretación de los resultados de estos estudios postmortem ha sido muy discutida debido a que la mayoría de los estudios utilizaban tejidos postmortem de pacientes que habían recibido tratamiento antipsicótico, surgiendo la posibilidad de que este incremento en la densidad de los receptores se debiera al tratamiento antipsicótico (Seeman y Kapur, 2000). Los estudios de la densidad de estos receptores mediante métodos de imagen *in vivo* como la tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía computarizada por emisión de fotones individuales (SPECT) han aportado resultados poco consistentes con algunos estudios describiendo un incremento en la densidad de los receptores D₂ en la esquizofrenia (Tune y cols., 1993; Wong y cols., 1986; Wong y cols., 1997) y otros mostrando ausencia de diferencias con respecto a los controles (Farde y cols.,

1990; Hietala y cols., 1994; Martinot y cols., 1990). Se han propuesto distintas explicaciones de estas discrepancias de los resultados como: la selectividad del ligando hacia los subtipos del receptor D₂, las diferencias de la capacidad del ligando para competir con la dopamina endógena y la utilización de distintos métodos de análisis (Lomena y cols., 2004; Soares y Innis, 1999). Adicionalmente, estas discrepancias podrían reflejar una heterogeneidad en la densidad de los receptores D₂ en los pacientes esquizofrénicos (Soares y Innis, 1999). En este sentido, los resultados de tres metaanálisis han descrito que existe al menos un aumento modesto en la densidad de los receptores D₂ en el estriado de los pacientes esquizofrénicos independientemente de los efectos de los fármacos antipsicóticos, existiendo una variabilidad mayor de estas medidas en los pacientes comparado a los controles (Kestler y cols., 2001; Laruelle, 1998; Zakzanis y Hansen, 1998). Asimismo, la observación de que los niveles de este receptor son mayores en gemelos monocigóticos sanos comparados con gemelos dicigóticos sanos de pacientes con esquizofrenia condujo a la conclusión de que el aumento de estos receptores en el núcleo caudado se relaciona con un factor de riesgo para la esquizofrenia (Hirvonen y cols., 2005).

Receptor 5-HT_{2A}

La serotonina es una amina biogénica conocida por su papel como neurotransmisor (Mohammad-Zadeh y cols., 2008) que interviene en distintas funciones cerebrales entre las que se incluyen el humor, cognición, sueño, dolor, función motora y secreción endocrina (Millan y cols., 2008). Las neuronas serotoninérgicas se localizan en el núcleo del rafe y desde ahí envían proyecciones a casi cualquier estructura del cerebro y a la médula espinal (Cools y cols., 2008; Nichols y Sanders-Bush, 2001; Sanders-Bush y cols., 2003). Las alteraciones en el sistema serotoninérgico han sido implicadas en una gran variedad de enfermedades humanas como depresión, ansiedad, dolor crónico y esquizofrenia (Millan y cols., 2008).

Las diversas acciones de la serotonina son mediadas por su interacción con distintos receptores de membrana (Hoyer y cols., 2002). Hay siete tipos principales

de receptores de serotonina (5-HT₁-5-HT₇) con subtipos de la mayoría dando lugar al menos a catorce receptores distintos. Con excepción del receptor 5-HT₃ que es ionotrópico, todos los otros tipos de receptores de serotonina son GPCRs y actúan a través de vías intracelulares para hiperpolarizar (receptores 5-HT₁) o despolarizar (receptores 5-HT_{2/4/5/6/7}) a sus células (Alex y Pehek, 2007; Di Matteo y cols., 2008).

El tipo 5-HT₂ está formado por tres subtipos: 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C} (Hoyer y cols., 2002; Leysen, 2004). El receptor 5-HT_{2A} ha sido ampliamente implicado en la fisiopatología y tratamiento de la esquizofrenia en base a distintas observaciones (Eastwood y cols., 2001; Meltzer y cols., 2003b). Entre estas observaciones se incluye el hecho de que algunos agonistas de los receptores 5-HT_{2A} como el ácido lisérgico (LSD) y la psilocibina producen síntomas similares a los estados psicóticos de la esquizofrenia (Geyer y Vollenweider, 2008; Gonzalez-Maeso y Sealfon, 2009). Adicionalmente, la hipótesis de la serotonina-dopamina postula que la mayor afinidad relativa por el receptor 5-HT_{2A} comparado al receptor D₂ es la característica que diferencia los antipsicóticos atípicos de los típicos (Meltzer y cols., 1989; Meltzer, 1999; Meltzer y cols., 2003b). Actualmente las evidencias sugieren que la interacción con los receptores 5-HT_{2A} no es ni única ni necesaria o suficiente para obtener los efectos atípicos de los antipsicóticos, aunque no se puede descartar la posibilidad de que el antagonismo de los receptores 5-HT_{2A} tenga un papel en las características atípicas de los antipsicóticos en ciertos dominios como el humor y la cognición (Kapur y Remington, 2001b; Kapur y Mamo, 2003).

Los receptores 5-HT_{2A} se expresan abundantemente en varias regiones corticales, núcleo caudado, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio e hipocampo, además de a nivel periférico en el músculo liso y en las plaquetas (Enguix y cols., 2003). El receptor 5-HT_{2A} se acopla fundamentalmente a proteínas G_{αq} y activa varias isoformas de la fosfolipasa C (PLC) que cataliza la degradación de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) a inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y a diacilglicerol (DAG) (Nichols y Sanders-Bush, 2001). Además de esta vía de señalización se ha descrito el acoplamiento a otras proteínas G y a otros sistemas efectores como la fosfolipasa A₂ (Berg y cols., 1998; Gonzalez-Maeso y Sealfon, 2009; Leysen, 2004).

La mayoría de los estudios postmortem han mostrado una disminución de la densidad del receptor 5-HT_{2A} en la corteza de pacientes esquizofrénicos (Arora y

Meltzer, 1991; Burnet y cols., 1996; Dean, 2003; Gurevich y Joyce, 1997; Matsumoto y cols., 2005). En contraste a los estudios postmortem, los resultados de los estudios de imagen *in vivo* han sido más heterogéneos, con estudios describiendo un descenso en la densidad del receptor 5-HT_{2A} en la corteza (Hurlemann y cols., 2008; Ngan y cols., 2000) mientras que otros no han detectado diferencias (Erritzoe y cols., 2008; Okubo y cols., 2000; Verhoeff y cols., 2000). Entre las posibles razones para estas discrepancias en los resultados se incluye las características del radioligando, el parámetro de unión medido, la edad de los individuos o la medicación (Eastwood y cols., 2001; Gonzalez-Maeso y Sealfon, 2009).

III. REELINA

La reelina es una glicoproteína secretada a la matriz extracelular con actividad serina proteasa (D'Arcangelo y cols., 1997; Quattrocchi y cols., 2002). Esta proteína se expresa ampliamente en el sistema nervioso central de todos los vertebrados, tanto durante el desarrollo embrionario como en la etapa adulta (Roberts y Perez-Costas, 2008). Durante el desarrollo embrionario, la reelina es sintetizada fundamentalmente por las células Cajal-Retzius en la zona marginal de la corteza y el hipocampo, en las células granulares del cerebelo y en las células del bulbo olfatorio y de la médula espinal (Alcantara y cols., 1998; D'Arcangelo, 2005; Ikeda y Terashima, 1997; Kubasak y cols., 2004; Schiffmann y cols., 1997). En la etapa adulta, la reelina es sintetizada predominantemente por las neuronas gabaérgicas de la corteza e hipocampo y por las células granulares glutamatérgicas del cerebelo. También se observa expresión en el bulbo olfatorio, en la médula espinal y en menor medida en el estriado y el tálamo (Alcantara y cols., 1998; Ikeda y Terashima, 1997; Pesold y cols., 1998; Pesold y cols., 1999; Ramos-Moreno y cols., 2006).

La expresión de la reelina no se limita al sistema nervioso central, también se expresa en la sangre, en la pituitaria, en las células cromafines de la médula adrenal y en órganos periféricos como el hígado, riñón, bazo, testículos y ovarios (Ikeda y Terashima, 1997; Smalheiser y cols., 2000).

Estructura del gen y de la proteína reelina

El gen de la reelina (*Reln*) fue identificado por primera vez a partir de una mutación autosómica recesiva presente en el ratón reeler (Bar y cols., 1995; D'Arcangelo y cols., 1995). Este ratón surgió de forma espontánea en una colonia de ratones en Edimburgo (Falconer, 1951). La mutación original (*Reln^{rl}*), también referida como mutación Edimburgo o Jackson, se caracteriza por una delección de 150 kb que elimina una gran parte de la porción 3' del gen de la reelina (Bar y cols., 1995; D'Arcangelo y cols., 1995). Adicionalmente, se han identificado otros cuatro alelos reeler: el alelo Orleans (*Reln^{rl-Orl}*) debido a una inserción de un elemento L1 en un exón del extremo 3' del gen (de Bergeyck y cols., 1997; Takahara y cols., 1996), el alelo transgénico (*Reln^{rl-Tg}*) se asocia con una delección genética que elimina una gran parte interna del gen de la reelina y los alelos Albany 1 y 2 (*Reln^{rl-Alb1}* y *Reln^{rl-Alb2}*) generados por mutagénesis inducida (Flaherty y cols., 1992; Royaux y cols., 1997; Takahara y cols., 1996). Todos estos alelos reeler cuando se producen en homocigosis conducen a ausencia de la reelina en el medio extracelular originando el fenotipo reeler, que es muy similar excepto por ligeras discrepancias cuantitativas que se pueden atribuir a diferencias en el background genético (Andersen y cols., 2002; D'Arcangelo y Curran, 1998).

El gen de la reelina es conservado entre los vertebrados pero está ausente en invertebrados y plantas (D'Arcangelo, 2006). La proteína que se predice a partir del gen de la reelina en el ratón (*Reln*) y en el humano (*RELN*) es muy similar en tamaño (388 kD) y la secuencia aminoacídica y nucleotídica es idéntica en un 94.2 % y 87.2 % respectivamente (DeSilva y cols., 1997). El gen, localizado en el cromosoma 5 en ratones y en el 7q22 en humanos, es grande (aproximadamente 450 kb) debido fundamentalmente a la presencia de algunos intrones muy largos. Está formado de 65 exones, de los cuales 51 codifican las ocho repeticiones de la proteína (DeSilva y cols., 1997; Meyer G, 2008; Royaux y cols., 1997).

El gen de la reelina codifica una proteína de 3,461 aminoácidos de una masa molecular relativa de aproximadamente 388 kDa (D'Arcangelo y cols., 1995). En el extremo N-terminal la reelina contiene un péptido señal de rotura de 27 aminoácidos, una pequeña región de similitud con la F-espondina de aproximadamente

163 aminoácidos y una secuencia única de 310 aminoácidos. La región central contiene una serie de ocho repeticiones internas (I-VIII) de 350-390 aminoácidos. Cada una de estas repeticiones está formada de dos subdominios relacionados, A y B, separados por una región de 30 aminoácidos con residuos de cisteína conservados, relacionada con el motivo del factor de crecimiento epidérmico (EGF). El extremo C-terminal es altamente básico y está formado de 33 aminoácidos (Figura 7) (D'Arcangelo y cols., 1995; D'Arcangelo y Curran, 1998; Rice y Curran, 2001; Royaux y cols., 1997).

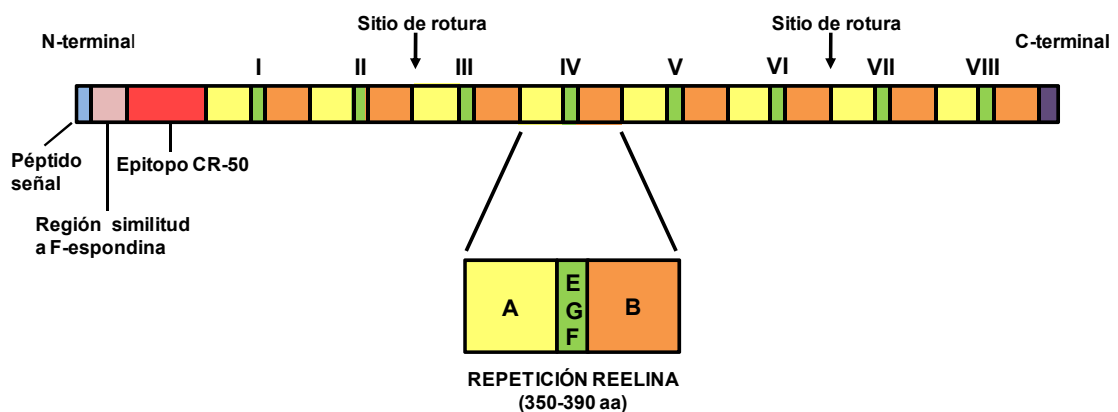


Figura 7: Esquema de la proteína reelina. (Tomado y modificado de Tissir y Goffinet, 2003).

La reelina se glicosila post-traduccionalmente aumentando su peso molecular a 400 kDa (D'Arcangelo y cols., 1997) y se secreta al medio extracelular a través de una vía constitutiva (Lacor y cols., 2000). En condiciones fisiológicas, la reelina se procesa proteolíticamente después de su secreción o en un compartimento post-retículo endoplásmico en dos sitios localizados entre las repeticiones 2 y 3 y entre la 6 y la 7 por una metaloproteinasas (Kohno y cols., 2009; Lambert De Rouvroit y cols., 1999). A partir de este procesamiento se originan tres fragmentos principales: un fragmento N-terminal de aproximadamente 180 kDa (extremo N-terminal a repeticiones 1 y 2), un fragmento central de aproximadamente 120 kDa (repeticiones 3 a 6) y un fragmento C-terminal de aproximadamente 100 kDa (repeticiones 7 y 8 a extremo C-terminal). Utilizando anticuerpos dirigidos contra el extremo N-terminal se detecta un producto intermedio de rotura de aproximadamente 300 kDa

correspondiente al fragmento N-terminal y al central (D'Arcangelo, 2006; Jossin y cols., 2003). El fragmento central de la reelina es suficiente para que manifieste actividad biológica y bioquímica, aunque la proteína completa parece ser más activa que el fragmento central aislado (Jossin y cols., 2004).

La reelina se secreta in vivo como un homodímero (Kubo y cols., 2002) que es capaz de inducir la dimerización o agrupamiento de sus receptores en la superficie de las neuronas diana facilitando la transmisión de la señal (Strasser y cols., 2004). La delección de una región de 230-346 aminoácidos localizada cerca del extremo N-terminal y denominada epitopo CR-50 impide la oligomerización y la transducción de la señal mediada por la reelina (Utsunomiya-Tate y cols., 2000). Estos datos concuerdan con resultados obtenidos con el anticuerpo CR-50 que antagoniza la función de la reelina tanto in vitro (Miyata y cols., 1997) como in vivo (Nakajima y cols., 1997) sugiriendo la intervención de esta región en la oligomerización de la reelina y en su función biológica.

Vías de señalización de la reelina

La vía de señalización de la reelina ha sido parcialmente clarificada por medio de ratones con mutaciones en distintos genes que originan un fenotipo similar al del ratón reeler. Los ratones que presentan una mutación simultánea en el gen del receptor de lipoproteína de muy baja densidad (VLDLR) y del receptor de apolipoproteína E 2 (ApoER2) presentan las mismas características que los ratones que pierden la reelina. Sin embargo, los ratones que pierden el VLDLR o el ApoER2 muestran un fenotipo menos severo que los ratones que pierden ambos receptores de lipoproteína. Además presentan especificidad regional, con alteraciones leves en el cerebelo si pierden el VLDLR o con alteraciones en la corteza e hipocampo en el caso de la pérdida del receptor ApoER2 (Trommsdorff y cols., 1999). Adicionalmente, la inactivación por mutagénesis dirigida o por mutaciones espontáneas en el gen que codifica la proteína adaptadora *disabled 1 (Dab1)*, como en los ratones mutantes *scrambler* y *yotari*, genera un fenotipo idéntico al del ratón reeler (Howell y cols., 1997; Sheldon y cols., 1997). El hecho de que mutaciones en

genes distintos causen el mismo fenotipo, se puede explicar debido a que las proteínas que codifican actúen en la misma vía de señalización.

A partir de esta información se estableció una vía de señalización en la que la reelina se une al dominio extracelular de los receptores de lipoproteína ApoER2 y VLDLR (D'Arcangelo y cols., 1999; Hiesberger y cols., 1999; Trommsdorff y cols., 1999) induciendo el agrupamiento de estos receptores (Strasser y cols., 2004) (Figura 8). Como consecuencia de esta unión la proteína Dab1, una proteína adaptadora intracelular se une a través de un dominio PI/PTB a la secuencia citoplasmática NPxY presente en ambos receptores (Jossin, 2008) y se dimeriza u oligomeriza (Strasser y cols., 2004). Dab1 es fosforilada en residuos tirosina específicos por tirosina cinasas de la familia Src (SFKs), concretamente la Src y la Fyn (Arnaud y cols., 2003b; Bock y Herz, 2003; Keshvara y cols., 2001; Kuo y cols., 2005). La proteína Dab1 fosforilada se une a la subunidad p85 de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K) y la activa. La PI3K activada fosforila y activa la proteína cinasa B (PKB ó Akt) que fosforila la glucógeno sintasa cinasa 3 beta (GSK3 β) inhibiendo su actividad. Esto afecta la capacidad de la GSK3 β de fosforilar la proteína asociada a microtúbulos tau (τ). Como resultado de la reducción de la fosforilación de la τ se promueve la organización y estabilidad de los microtúbulos (Beffert y cols., 2002; Beffert y cols., 2004; Bock y cols., 2003; Herz y Chen, 2006; May y cols., 2005). Por otra parte, Akt fosforilada activa la vía mTORC1-S6K1 que estimula la síntesis de proteínas y el complejo mTORC2 que modula la organización de la actina, promoviendo de este modo el crecimiento y arborización de las dendritas. Se ha observado que la activación de la vía PI3K/Akt por reelina es necesaria para la separación del preplato y la formación de capas del plato cortical y este efecto es independiente de GSK3 β y de mTOR. Esto sugiere que diferentes dianas de Akt son las responsables de mediar los efectos de la reelina en el desarrollo del plato cortical y en el crecimiento dendrítico, implicando, probablemente, varias redes complejas de mecanismos de señalización bioquímicos, de los cuales muchos aún no han sido identificados (Jossin y Goffinet, 2007). Alternativamente, la activación de PI3K también provoca, por medio de unos efectores desconocidos, la fosforilación de LIM cinasa 1 (LIMK) que a su vez fosforila e inhibe la n-cofilina contribuyendo a la

estabilización del citoesqueleto de actina en los procesos de migración de las neuronas (Chai y cols., 2009).

Por otra parte, la vía de señalización de la reelina se ha relacionado con la modulación de la función del receptor N-metil-D-aspartato (NMDAR). Las proteínas SFKs activadas debido a la unión de reelina fosforilan la subunidad NR2 del receptor de NMDA favoreciendo la entrada de calcio. La elevación del calcio intracelular puede activar la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) que potencia la expresión de genes que son importantes en la plasticidad sináptica, crecimiento de neuritas y desarrollo de espinas dendríticas (Chen y cols., 2005; Herz y Chen, 2006).

Además de unirse a los receptores VLDLR y ApoER2, la reelina también se une a los receptores de integrinas aunque el significado funcional de la unión a estos receptores es poco conocido (Qiu y Weeber, 2011). La unión de la reelina a los receptores de integrina puede estabilizar la densidad postsináptica de las espinas dendríticas e inducir la traducción de ARNm presentes en las espinas dendríticas contribuyendo por ello a la plasticidad sináptica (Dong y cols., 2003). Existen estudios que muestran que la reelina se une a la integrina $\alpha3\beta1$ y transmite una señal de parada a las neuronas en migración (Dulabon y cols., 2000; Schmid y cols., 2005). Sin embargo, otros estudios muestran que la integrina $\alpha3\beta1$ no es un componente esencial en la vía de señalización de la reelina (Belvindrah y cols., 2007; Magdaleno y Curran, 2001).

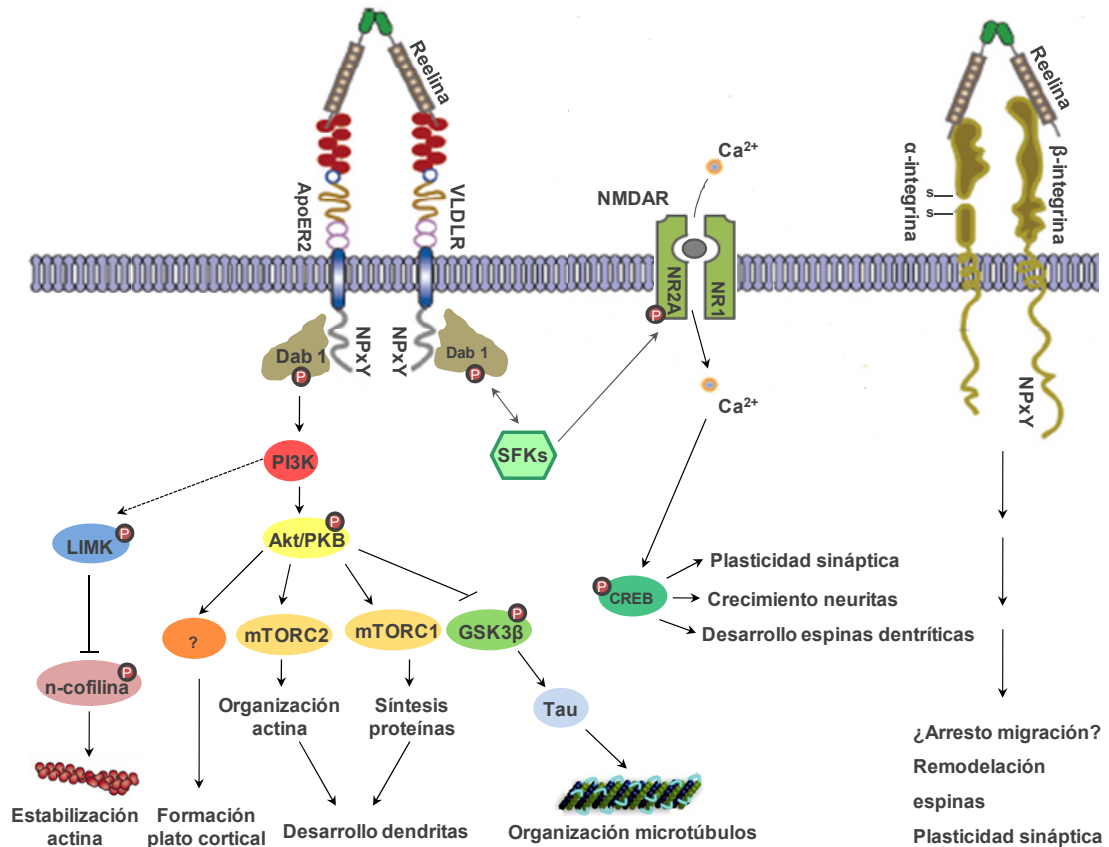


Figura 8: Representación esquemática de las vías de señalización de la reelina y sus posibles efectos. (Esquema basado en Qiu y Weeber, 2008; Herz y Chen, 2006; Chai, 2009; Jossin y Goffinet, 2007).

Se han identificado otras moléculas de la vía de señalización de la reelina, entre las que se incluyen Lis1 (Assadi y cols., 2003), la Nck β (Pramatarova y cols., 2003) y Crk (Huang y cols., 2004), aunque la mayoría de los eventos que median no están completamente caracterizados o no han sido completamente integrados.

El mecanismo de *down-regulation* de la vía de la reelina implica la poliubiquitinación de la proteína Dab1 fosforilada y su degradación vía proteosoma. Este mecanismo de degradación es dependiente de los receptores VLDLR y ApoER2, de Dab1 fosforilada y de la actividad de las SFKs (Arnaud y cols., 2003a; Kerjan y Gleeson, 2007).

Función

La reelina controla múltiples aspectos del desarrollo cerebral de los organismos, actuando tanto en la etapa embrionaria como en la etapa postnatal y en el adulto. El ratón reeler y los mutantes con fenotipo reeler han sido ampliamente utilizados para estudiar los mecanismos moleculares que median las funciones de la reelina.

Una de las funciones mejor caracterizadas de la reelina es el control de la migración neuronal radial y la formación de las capas celulares durante el desarrollo cerebral embrionario. La formación de capas o láminas es una característica de todas las estructuras corticales, incluyendo la corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo (Huang y D'Arcangelo, 2008; Rice y Curran, 2001). El papel de la reelina en la migración neuronal ha sido estudiado extensamente utilizando el desarrollo de la corteza cerebral como sistema modelo (Herz y Chen, 2006).

Durante el desarrollo embrionario de la corteza, las primeras neuronas post-mitóticas forman una estructura transitoria denominada preplato. Esta estructura está formada de dos poblaciones neuronales transitorias que degeneran después del nacimiento, las células Cajal-Retzius localizadas superficialmente y las células del subplato. El desarrollo continúa con la migración radial de las neuronas que formarán el plato cortical desde la zona ventricular hacia la pia. Estas neuronas escinden el preplato y se sitúan entre las células Cajal-Retzius y las del subplato. Cada nueva generación de neuronas migra sistemáticamente, pasa a sus predecesoras y se sitúan justo debajo de las células Cajal-Retzius de acuerdo a un patrón de desarrollo de "dentro-fuera". De este modo se desarrolla el característico plato cortical del adulto, dividido en seis capas (I-VI) numeradas desde fuera (superficie pial) hacia dentro (superficie ventricular). Cada una de estas capas está formada de neuronas de morfología, propiedades funcionales, conexiones, tiempo y lugar de origen similares. Así, la capa I y la región justo debajo del plato cortical contienen las neuritas, las capas II/III contienen las últimas generaciones de neuronas mientras que la VI contiene la primera generación de neuronas. En la corteza del ratón reeler este modo de desarrollo está alterado. El preplato se desarrolla de modo normal, pero la primera generación de neuronas a pesar de generarse en el tiempo correcto es incapaz de

escindir el preplato y se coloca en una capa debajo del preplato. Las siguientes generaciones de neuronas son incapaces de pasar a sus predecesoras y se acumulan sucesivamente debajo, como consecuencia el plato cortical se desarrolla en un modo invertido de “fuera a dentro” (Figura 9).

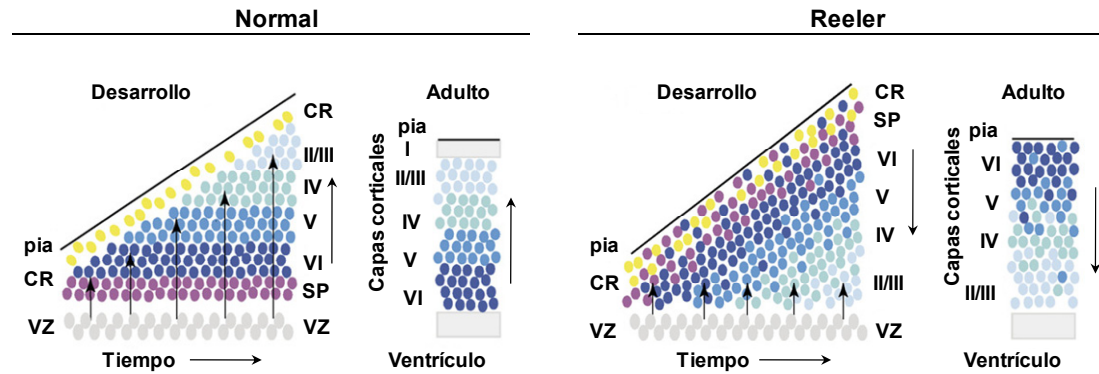


Figura 9: Desarrollo del plato cortical normal y en el reeler. En el desarrollo normal del plato cortical en el ratón *wild type* las neuronas que forman el plato cortical migran desde la zona ventricular (VZ) a la pia y se sitúan de acuerdo a un patrón de desarrollo de “dentro-fuera” entre las células Cajal-Retzius (CR) y las del subplato (SP) las cuales degeneran después del nacimiento. En el desarrollo del plato cortical del ratón reeler las generaciones de neuronas son incapaces de escindir el preplato y se colocan debajo en un orden de desarrollo invertido. (Modificado de Cooper, 2008).

De estas observaciones, se estableció que la vía de señalización de la reelina es esencial para la correcta migración radial de las neuronas y la correcta formación de las capas corticales, aunque el mecanismo exacto que induce esta formación laminar no está completamente establecido. Mecanismos similares operan en el desarrollo del cerebelo y del hipocampo. En el cerebelo, las células de Purkinje completan la primera fase de la migración pero fallan para formar el plato de las células de Purkinje. En el hipocampo, las neuronas piramidales no se alinean correctamente y las células granulares del giro dentado están dispersas (Bar y cols., 2000; Cooper, 2008; D’Arcangelo, 2005; Frotscher y cols., 2009; Gilmore y Herrup, 2000; Huang y D’Arcangelo, 2008; Huang, 2009; Rice y Curran, 2001; Tissir y Goffinet, 2003). Aunque los defectos más severos se observan en la corteza cerebral, el cerebelo y el hipocampo también se detectan alteraciones en la oliva inferior, bulbo olfatorio, núcleo coclear, núcleo del nervio facial, tálamo, tectum, neuronas

dopaminérgicas de la sustancia negra, retina y médula espinal (D'Arcangelo, 2005; Lambert De Rouvroit y Goffinet, 1998; Tissir y Goffinet, 2003).

A pesar de que la mayoría de la información respecto a la función de la reelina procede de investigaciones sobre el desarrollo embrionario del cerebro, estudios recientes indican que la vía de señalización mediada por esta proteína también juega un importante papel en la función sináptica en el cerebro postnatal y en el adulto (Herz y Chen, 2006; Levenson y cols., 2008; Rogers y Weeber, 2008). Se ha observado que la reelina promueve el crecimiento y la arborización de las dendritas (Jossin y Goffinet, 2007; Niu y cols., 2004) e interviene en la formación o estabilización de las espinas dendríticas (Niu y cols., 2008). Las espinas dendríticas son pequeñas protusiones que cubren las dendritas, reguladas dinámicamente y que forman el componente post-sináptico de la mayoría de las conexiones sinápticas excitatorias del cerebro. La reelina se une a receptores presentes en las densidades post-sinápticas de las espinas dendríticas y regula la translación de ARNm residentes en las espinas dendríticas y en las dendritas y de este modo podría participar en la modulación de la estructura y la estabilidad sináptica (Dong y cols., 2003). Por tanto, se requiere un nivel constitutivo de la vía de señalización de esta proteína tanto para la maduración neuronal como para el desarrollo de las estructuras sinápticas necesarias para el correcto procesamiento de la información por las neuronas (Levenson y cols., 2008; Rogers y Weeber, 2008). En este sentido, la reelina interviene también en la estabilización del citoesqueleto de actina y en la formación de la potenciación a largo plazo (LTP) aumentando la plasticidad sináptica y regulando la transmisión sináptica, la memoria y el aprendizaje (Beffert y cols., 2005; Frotscher, 2010; Herz y Chen, 2006; Weeber y cols., 2002).

La reelina en la esquizofrenia

Además de la función conocida de la reelina durante el desarrollo cerebral, existen varios estudios que indican un posible papel del gen y de la proteína reelina en trastornos neuropsiquiátricos como la esquizofrenia, el autismo, el desorden bipolar, la depresión mayor, la lisencefalia y el Alzheimer (Fatemi y cols., 2008).

En la esquizofrenia se ha descrito que los niveles del ARNm y de la proteína reelina están disminuidos en un 50 % en varias estructuras cerebrales como la corteza prefrontal y temporal, hipocampo, cerebelo y núcleo caudado, y este descenso ha sido propuesto como un factor de vulnerabilidad para el desarrollo de esta enfermedad (Impagnatiello y cols., 1998). En un estudio posterior en cerebros postmortem de pacientes esquizofrénicos también se observó una disminución de la expresión de reelina en la corteza prefrontal y en el cerebelo sin que se apreciase una pérdida detectable de neuronas (Guidotti y cols., 2000). Esta reducción de los niveles de reelina se asocia con una disminución del ARNm y de la proteína de la descarboxilasa del ácido glutámico de 67 kDa (GAD₆₇) en los mismos cerebros postmortem (Guidotti y cols., 2000).

La disminución en la expresión de reelina fue posteriormente confirmada con otros estudios en el hipocampo (Fatemi y cols., 2000; Knable y cols., 2004), en el cerebelo (Eastwood y cols., 2003; Fatemi y cols., 2005), en la corteza temporal superior (Eastwood y Harrison, 2003) y en la corteza prefrontal (Eastwood y Harrison, 2006; Knable y cols., 2001). Aunque los estudios iniciales mostraron además de la disminución en la expresión de reelina una reducción en la expresión de GAD₆₇, estudios posteriores mostraron una reducción tanto de GAD₆₇ como de la descarboxilasa del ácido glutámico de 65 kDa (GAD₆₅) en el cerebelo de pacientes esquizofrénicos proporcionando evidencias de disfunción gabaérgica en la esquizofrenia (Bullock y cols., 2006; Fatemi y cols., 2005). En un estudio con 100 marcadores biológicos que parecen estar alterados en cerebros postmortem de pacientes con esquizofrenia se observó que la reelina y la GAD₆₇ son las más anómalas y la disminución de su expresión en la corteza ha sido uno de los hallazgos más consistentes observado en los cerebros postmortem de estos pacientes (Grayson y cols., 2005; Torrey y cols., 2005).

A pesar de la consistente reducción que se observa en los niveles de la reelina en la esquizofrenia, los estudios de asociación genética no han sido capaces de mostrar una asociación significativa entre los polimorfismos de la reelina y la enfermedad (Akahane y cols., 2002; Chen y cols., 2002; Goldberger y cols., 2005; Huang y Chen, 2006). De este modo, ciertos alelos de la reelina se asocian como factores de riesgo para el desarrollo de la esquizofrenia sólo cuando se consideran en

combinación con uno de los genes implicados en esta enfermedad (Hall y cols., 2007). La falta de resultados concluyentes en los estudios de asociación condujo al estudio de endofenotipos, que están más relacionados con la biología subyacente y son herramientas más potentes en los estudios de asociación. Así, en un estudio se ha observado una asociación entre la reelina y un número de tareas cognitivas que están alteradas en la esquizofrenia como son la memoria temporal y de atención, el aprendizaje verbal, la memoria y la función ejecutiva (Wedenoja y cols., 2010).

En línea con estos resultados, distintas evidencias indican que algunos mecanismos epigenéticos como la hipermetilación del gen de la reelina podrían ser los responsables de la disminución de la expresión de la reelina en el cerebro de sujetos con esquizofrenia (Abdolmaleky y cols., 2005; Costa y cols., 2002a; Costa y cols., 2003), de hecho existen estudios que muestran un aumento de la hipermetilación de islas CpG del promotor de la reelina en los pacientes esquizofrénicos (Abdolmaleky y cols., 2005; Grayson y cols., 2005). Además la ADN *metiltransferasa* 1 (DNMT1), que es la enzima que cataliza la metilación del ADN en regiones de los promotores ricas en islas CpG, está sobreexpresada en las mismas neuronas gabaérgicas de la corteza prefrontal de pacientes esquizofrénicos que presentan reducción de la expresión de reelina y de GAD₆₇ (Ruzicka y cols., 2007; Veldic y cols., 2004; Veldic y cols., 2005). Estos datos sugieren que la sobreexpresión de la DNMT1 podría mediar la inducción epigenética de la hipermetilación del promotor de la reelina y de la GAD₆₇ dando lugar a la disminución de su expresión en la esquizofrenia. A su vez, la reducción de la vía de señalización de estas proteínas probablemente sea la causa de la disminución del número de espinas dendríticas observada en la corteza prefrontal de los pacientes esquizofrénicos (Figura 10) (Guidotti y cols., 2009).

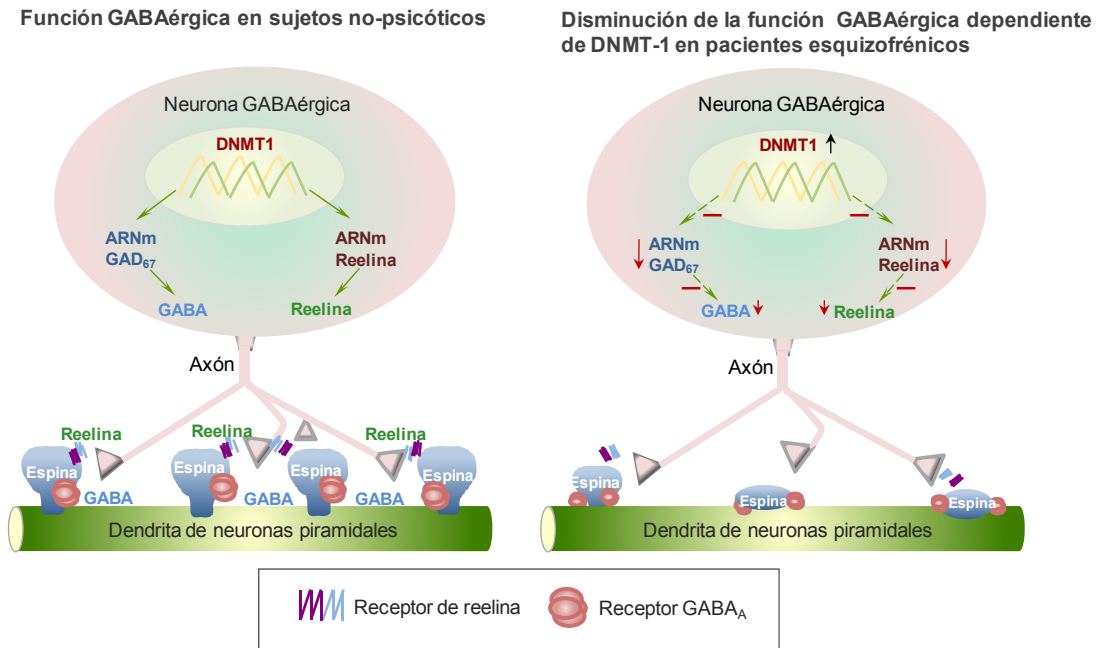


Figura 10: Distintas poblaciones de interneuronas GABAérgicas expresan reelina que actúa en las espinas dendríticas de las neuronas piramidales. En sujetos normales la reelina secretada por las interneuronas GABAérgicas se une a los receptores presentes en las espinas dendríticas promoviendo su desarrollo y maduración. En los pacientes esquizofrénicos la DNMT1 es sobreexpresada, induciendo la hipermetilación de los promotores de reelina y GAD₆₇ originando así la disminución de su transcripción. La reducción de reelina y GABA unido a las espinas dendríticas causa probablemente la disminución del número de espinas dendríticas. (Tomado de Guidotti, 2009).

A diferencia de la existencia de distintos estudios sobre la expresión de reelina en el cerebro, el estudio de los niveles de esta proteína en sangre y en líquido cefalorraquídeo ha sido limitado. Se ha comprobado que los niveles sanguíneos de la reelina y sus isoformas están alterados en los pacientes esquizofrénicos (Fatemi y cols., 2001). En relación a los niveles de reelina en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con esquizofrenia, en un estudio con un número limitado de muestra no se han observado diferencias cuantitativas o cualitativas. Sin embargo, debido al tamaño reducido de la muestra y al desconocimiento del origen de la reelina y de la vida media de sus isoformas en el líquido cefalorraquídeo la interpretación de este dato es difícil y se necesitarían más estudios para confirmarlo (Ignatova y cols., 2004).

IV. MODELOS ANIMALES DE ESQUIZOFRENIA

Un modelo se define como cualquier preparación experimental desarrollada para estudiar una condición o fenómeno particular en la misma o diferentes especies (Geyer y Moghaddam, 2002). Los modelos son normalmente preparaciones animales que manifiestan alteraciones que intentan imitar o se pueden relacionar con una condición humana.

A diferencia de otros desórdenes, en los que los modelos animales han sido importantes herramientas para discernir los mecanismos fisiopatológicos y diseñar terapias más efectivas, el conocimiento de la psicopatología de la esquizofrenia aportado por el estudio de los modelos animales ha sido limitado (Kilts, 2001; Lipska y Weinberger, 2000). Esto es debido a la existencia de varios factores que dificultan el desarrollo de un modelo animal de la esquizofrenia entre los que se incluyen la etiología heterogénea de la enfermedad que implica interacciones complejas entre factores genéticos y ambientales, la ausencia de un marcador definido de la enfermedad junto con un curso clínico variable con síntomas cognitivos difíciles de reproducir en animales.

La validez de los modelos animales de los desórdenes mentales se mide en función de tres criterios (Tordjman y cols., 2007):

- 1) Similitud del comportamiento (“*face validity*”), se refiere a la similitud del comportamiento del modelo animal y los síntomas específicos de la condición humana.
- 2) Validez del constructo, entendida como la capacidad del modelo para ensayar la hipótesis etiopatogénica en base al estudio de los factores de riesgo y de los mecanismos implicados en la patogénesis y validez etiológica referida a la similitud de la etiología existente entre el modelo animal y la condición humana.
- 3) Validez predictiva, entendida como la capacidad del modelo para identificar correctamente fármacos con potencial valor terapéutico en humanos.

La necesidad de una investigación básica que genere hipótesis relevantes a humanos que posibiliten un mejor conocimiento de la neurobiología de la

esquizofrenia junto con una mejora del tratamiento, ha proporcionado varios modelos animales. Si bien estos modelos de la esquizofrenia sirven para evaluar una causa específica o una hipótesis mecanística más que para imitar completamente la enfermedad en humanos (Marcotte y cols., 2001). Se han descrito varios modelos animales que podrían ser informativos de algún aspecto del fenotipo o de la etiología de la esquizofrenia (Carpenter y Koenig, 2008) y que se pueden dividir en tres categorías fundamentales: modelos farmacológicos, modelos del neurodesarrollo y modelos genéticos (Geyer y Moghaddam, 2002).

Los **modelos farmacológicos** se basan en las alteraciones observadas en varios sistemas de neurotransmisores (dopamina, serotonina y glutamato fundamentalmente) y en el uso de tratamientos farmacológicos que produzcan síntomas similares a los observados en la esquizofrenia. Entre estos modelos se puede citar los modelos que se basan en el uso de psicoestimulantes como la amfetamina o el 3,4-metilendioximetamfetamina (MDMA) que inducen un exceso de liberación de dopamina a la hendidura sináptica provocando aumentos de la actividad locomotora y estereotipias. Los modelos basados en la utilización de agonistas de los receptores 5-HT_{2A} de serotonina, como la dietilamina de ácido lisérgico (LSD) y la mescalina, que originan alucinaciones y respuestas exageradas a estímulos sensoriales y cognitivos (Marcotte y cols., 2001). El desarrollo de tolerancia a los efectos de las sustancias alucinógenas junto con el desarrollo de alucinaciones visuales en vez de auditivas como es característico de la esquizofrenia limitan la utilidad de estos modelos (Tordjman y cols., 2007). Otros modelos se basan en la utilización de antagonistas de los receptores de glutamato del subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA) como la fenciclidina y la ketamina que originan síntomas similares a los observados en esquizofrenia y que precipitan la psicosis en pacientes con esquizofrenia (Geyer y Moghaddam, 2002; Marcotte y cols., 2001).

Los **modelos del neurodesarrollo** se basan en la inducción experimental de alteraciones en el desarrollo cerebral que se manifiestan en forma de alteraciones neuroquímicas en el cerebro y comportamientos aberrantes en el adulto. Uno de los modelos mejor caracterizados de esta categoría implica la lesión neonatal del hipocampo ventral que origina alteraciones en los circuitos corticales y subcorticales en los que participa dando lugar a alteraciones en la adolescencia o en la edad adulta

temprana de relevancia en la esquizofrenia. También se han considerado modelos animales a los que se le han realizado lesiones del desarrollo de otras estructuras implicadas en la esquizofrenia como la corteza prefrontal y el tálamo (Lipska y Weinberger, 2000; Marcotte y cols., 2001). Otras estrategias que han sido utilizadas para alterar el desarrollo incluyen: la malnutrición gestacional, la exposición prenatal al virus de la gripe, la irradiación gestacional con rayos X, la exposición a la toxina mitótica en el útero y administración sistémica de inhibidores de la óxido nítrico sintasa (NOS). Estos modelos originan cambios morfológicos importantes como alteración de la neurogénesis y reducción del volumen cortical que imitan ciertos aspectos de la esquizofrenia (Geyer y Moghaddam, 2002; Lipska y Weinberger, 2000). Otros modelos incluidos dentro de esta categoría se basan en la exposición a experiencias estresantes al principio de la vida, como la separación materna y el aislamiento social, que originan numerosas alteraciones algunas de las cuales surgen en la vida adulta (Lipska y Weinberger, 2000; Tordjman y cols., 2007).

Los **modelos genéticos** se basan en modificaciones mediante estrategias genéticas o mutaciones espontáneas de genes implicados en los sistemas de neurotransmisión relevantes en la esquizofrenia, en el neurodesarrollo o considerados factores de riesgo para la susceptibilidad a la esquizofrenia (Carpenter y Koenig, 2008; Chen y cols., 2006; Lipska y Weinberger, 2000). Entre los genes más ampliamente aceptados por estar implicados en la esquizofrenia de los que existen modelos animales disponibles se incluyen: catecol-O-metiltransferasa (COMT), DISC1 (“disrupted in schizophrenia 1), neuroregulina y reelina entre otros (Carpenter y Koenig, 2008). A pesar de que los modelos animales basados en modificaciones genéticas no abarcan la amplitud del perfil clínico de la esquizofrenia, la utilización de estos modelos para estudiar el papel de los genes de susceptibilidad en el proceso cognitivo, función neuronal y transducción de señales durante el desarrollo así como sus interacciones con factores ambientales aportará información de los mecanismos moleculares de la fisiopatología de la esquizofrenia y favorecerá el desarrollo de nuevas terapias antipsicóticas (Chen y cols., 2006).

La validez de estos modelos se debe establecer especificando tanto la manipulación utilizada para inducir la alteración, como las medidas utilizadas para caracterizarla (Geyer, 2008). Las medidas del comportamiento como la actividad

locomotora o las deficiencias en la cognición o en el procesamiento de la información como la inhibición del prepulso (PPI), han sido ampliamente utilizadas. Además de los estudios del comportamiento, los marcadores celulares y moleculares que se basan en cambios descritos en muestras postmortem de humanos y en estudios de imagen también están siendo utilizados como medidas útiles para establecer la validez de los modelos animales (Geyer y Moghaddam, 2002). En este sentido, está ganando importancia el desarrollo de tests de comportamiento objetivos que valoren respuestas similares tanto en ratones como en humanos. La PPI y los potenciales evocados auditivos son ejemplos de medidas que pueden ser utilizadas de modo equivalente en ratones y en humanos y que están alteradas tanto en los desordenes psiquiátricos como en los modelos animales adecuados (Geyer, 2008).

A pesar de que no existe un modelo animal perfecto que reproduzca completamente el fenotipo de la esquizofrenia y que los distintos modelos tienen sus ventajas y sus limitaciones, cada uno de estos modelos puede ser útil para clarificar las causas y los mecanismos de la esquizofrenia, así como para comprender mejor las relaciones entre las variables biológicas y bioquímicas y sus interacciones con los factores ambientales (Tordjman y cols., 2007). El desarrollo futuro de modelos animales de la esquizofrenia dependerá de un conocimiento más completo de la enfermedad, del desarrollo de modelos endofenotípicos más que modelos que intenten imitar completamente la enfermedad, de la integración de los hallazgos de los distintos modelos animales así como del refinamiento de los criterios utilizados para validar dichos modelos (Kilts, 2001).

El ratón heterocigoto reeler como modelo animal de esquizofrenia

El ratón heterocigoto reeler haploinsuficiente para la reelina, expresa aproximadamente el 50 % de la cantidad de proteína y ARNm de reelina presente en el ratón *wild type* (Costa y cols., 2001; Tueting y cols., 1999). Esta disminución en la expresión de reelina fue similar a la observada en pacientes esquizofrénicos (Impagnatiello y cols., 1998), lo que convirtió al ratón heterocigoto reeler de interés como un posible modelo animal de psicosis (Tueting y cols., 1999). A diferencia del

ratón reeler (homocigoto para reelina) que muestra alteraciones estructurales obvias como ectopia neuronal en las estructuras cerebrales laminadas y alteraciones del comportamiento como ataxia, temblores, desequilibrio y un movimiento de tambaleo característico, el fenotipo del ratón heterocigoto reeler pareció similar al del ratón *wild type* al principio (D'Arcangelo y Curran, 1998; Katsuyama y Terashima, 2009). Sin embargo, estudios más profundos revelaron alteraciones neuroanatómicas, neuroquímicas y del comportamiento similares a las observadas en la esquizofrenia (Costa y cols., 2001; Tueting y cols., 2006).

Al igual que sucede en los cerebros postmortem de pacientes esquizofrénicos, en el cerebro del ratón heterocigoto reeler la disminución de la reelina se asocia con una disminución en los niveles del ARNm y de la proteína GAD₆₇ (Costa y cols., 2001; Liu y cols., 2001). Por otra parte, tanto en los pacientes no-psicóticos como en el ratón *wild type* existe una correlación positiva entre la expresión de reelina y GAD₆₇, sin embargo esta correlación se pierde en los pacientes esquizofrénicos y en el ratón heterocigoto reeler (Costa y cols., 2001; Guidotti y cols., 2000). En conclusión, la reducción de la reelina y GAD₆₇ presente en el ratón heterocigoto reeler es consistente con el déficit GABAérgico asociado a la esquizofrenia (Tueting y cols., 2006).

Asimismo existen otras numerosas alteraciones neurobiológicas observadas en el ratón heterocigoto reeler similares a las presentes en los cerebros postmortem de pacientes esquizofrénicos entre las que se incluyen: disminución del espesor cortical, hipoplasia del neuropilo, aumento de la densidad de empaquetamiento neuronal, disminución de las espinas dendríticas en las dendritas de las neuronas piramidales de la capa III de la corteza frontal, reducción de la ramificación dendrítica en el hipocampo, evidencias indirectas de disregulación de la función glutamatérgica, dopaminérgica y neuroendocrina y alteraciones electrofisiológicas como déficits en la potenciación a largo plazo (LTP) y en la depresión a largo plazo (LTD) (Figura 11) (Costa y cols., 2001; Liu y cols., 2001; Niu y cols., 2004; Qiu y cols., 2006; Tueting y cols., 2006). Basado en estos hallazgos, el ratón heterocigoto reeler fue propuesto como un modelo animal adecuado de las alteraciones neuroanatómicas y neuroquímicas descritas en la esquizofrenia y para el desarrollo de nuevos fármacos antipsicóticos (Costa y cols., 2002b).



Figura 11: Microfotografías de dendritas de neuronas piramidales de ratón homocigoto reeler (A), heterocigoto (B) y *wild type* (C). La densidad de espinas dendríticas está disminuída significativamente en ratón homocigoto y heterocigoto reeler comparado con el *wild type*. Barra de calibrado: 5 μ m. (Tomado de Niu, 2008).

Por otra parte, este ratón presenta múltiples alteraciones del comportamiento entre las que se incluyen déficits en: la inhibición de prepulso (PPI) (Costa y cols., 2002b; Qiu y cols., 2006; Tueting y cols., 1999), interacción y reconocimiento social (Tueting y cols., 2006), condicionamiento del miedo contextual (Qiu y cols., 2006), aprendizaje de discriminación olfatoria (Larson y cols., 2003), función ejecutiva (Brigman y cols., 2006) y aprendizaje (Krueger y cols., 2006) además de diferencias en ansiedad, evaluación de riesgo e impulsividad (Ognibene y cols., 2007). Sin embargo, a pesar de las múltiples evidencias de la existencia de alteraciones comportamentales existe una enorme controversia en relación a la utilidad del ratón heterocigoto reeler como un modelo de psicosis. Existen estudios en los que no se observan diferencias comportamentales del ratón heterocigoto reeler en una batería estándar de tests de comportamiento entre los que se incluye el PPI (Podhorna y Didriksen, 2004; Salinger y cols., 2003). Tampoco se observaron déficits en la PPI con un estímulo acústico aunque sí con la combinación de dos estímulos distintos (Barr y cols., 2008). Esta diferencia con los estudios que mostraron déficits en la PPI (Qiu y cols., 2006; Tueting y cols., 1999) es especialmente importante, porque los pacientes esquizofrénicos y sus familiares cercanos que no desarrollan la enfermedad presentan déficits de la PPI y además es uno de los pocos marcadores endofenotípicos que puede ser estudiado en un modo comparable en humanos y animales (Barr y cols., 2008; Tueting y cols., 2006). No se conoce a qué se deben estas discrepancias entre los resultados, aunque podrían ser debidas a diferencias en la edad de los ratones, protocolos, ambiente social y *background* genético (Krueger y cols., 2006; Tueting y cols., 2006).

En conclusión, existen evidencias crecientes de que los ratones heterocigoto reeler difieren de los ratones *wild type* en el comportamiento y en la neurobiología

subyacente en un modo consistente con el uso de este ratón como un modelo de esquizofrenia y otros desórdenes relacionados (Laviola y cols., 2009; Tueting y cols., 2008). Aunque sería importante considerar también tanto la contribución de las influencias genéticas como epigenéticas, así como sus posibles interacciones (Tueting y cols., 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

I. ANIMALES

En este trabajo se utilizaron ratones Swiss macho procedentes del Animalario Central de la Universidad de Santiago de Compostela. Los animales se mantuvieron en una habitación con una temperatura constante (22 ± 1 °C) y un ciclo de 12 horas de luz (08:00-20:00 h) con libre acceso a comida y agua hasta su utilización en los ensayos correspondientes.

Además, se utilizaron ratones reeler procedentes de nuestra propia colonia establecida a partir de ratones B6C3Fe (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA). Estos ratones son portadores de una mutación autosómica recesiva que origina una delección de ~ 150 kb en el gen de la reelina (Andersen y cols., 2002). Después del período de destete se determinó el genotipo de los ratones mediante PCR a partir de ADN extraído de la cola. A partir de la PCR se establecieron tres genotipos: ratones homocigoto reeler (RL), portadores de la delección en los dos alelos del gen de la reelina; ratones heterocigoto reeler (HZ), portadores de la delección en uno de los alelos del gen y ratones *wild type* (WT), portadores de dos alelos normales. Estos ratones se mantuvieron en una habitación con una temperatura constante (22 ± 1 °C) y un ciclo de 12 horas de luz (08:00-20:00 h) con libre acceso a comida y agua hasta su utilización en los ensayos correspondientes.

Los animales fueron manipulados respetando las normas internacionales y los acuerdos del Consejo de Europa sobre experimentación animal aplicada recogidos en la Directiva del 24 de noviembre de 1986 (86/609/CEE) y regulados en España por el Real Decreto del 10 de octubre de 2005 (1201/2005/BOE) y en la Comunidad Autónoma de Galicia por el Decreto del 30 de diciembre de 2008 (296/2008/DOG) sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Los protocolos experimentales utilizados fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Santiago de Compostela.

II. DETERMINACIÓN DEL GENOTIPO

La determinación del genotipo se realizó a partir de ADN extraído de la cola de los ratones mediante PCR.

Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico se realizó a partir de un trozo de cola de ratón (~0.5 cm). Se añadieron 300 µl de solución de lisis (SDS 0.5%, NaCl 0.1 M, Tris-HCl 50 mM pH=8, EDTA 2.5 mM y proteinasa K 2mg/ml (*Invitrogen*)) a cada muestra y se incubaron a 55-65 °C durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron 1.5 µl de ARNasa 4 mg/ml (*Roche*) por cada 10 mg de tejido y se incubaron 60 min a 37 °C. Transcurridos los 60 min de incubación se adicionaron 300 µl de fenol/cloroformo/isoamil (25:24:1 v/v) (*Sigma Aldrich*), se dejaron 10 min a temperatura ambiente después de mezclar manualmente y se centrifugaron a 1500 g 5 min a 18-20 °C. Posteriormente se recogió la capa superficial a un tubo limpio, se añadieron 300 µl de cloroformo 100% (*Sigma Aldrich*) y se centrifugaron a 18400 g 5 min a 4 °C. La capa superior resultante de esta centrifugación se recogió y se añadieron 300 µl de etanol 100% (*Panreac*), se agitaron las muestras hasta que se observó el ADN y se centrifugaron a 18400 g 30 min a 4 °C. Al pellet obtenido se le añadieron 500 µl de etanol 70 % y se centrifugaron a 18400 g 10 min a 4 °C. A los pellets finales se le añadieron 45 µl de agua milliQ y se incubaron 15 min a 55 °C. Las muestras se guardaron a -20 °C hasta su utilización.

PCR (“polymerase chain reaction”)

La determinación del genotipo de los ratones *reeler* se realizó mediante PCR a partir de 1.5 µl (1-1.5 µg/µl) de muestra de ADN de cola de ratón utilizando simultáneamente tres cebadores específicos: 5' W TAATTCTGTCCTCACTCTGCC; 3' W ACAGTTGACATACCTTAATC; 3' R TGCATTAATGTGCAGTGTTGT (*Thermo Fisher Scientific*) (Modificado de D'Arcangelo y cols, 1996). Los cebadores fueron diseñados en base al lugar de la mutación espontánea que origina la delección:

el cebador 5' W se localiza ~ 187 pb corriente arriba, el cebador 3'W ~79 pb corriente abajo y el cebador 3'R ~179 pb corriente abajo del lugar de delección. Esto permitió distinguir entre los tres genotipos a partir de los productos de amplificación: homocigoto *reeler* (RL) producto amplificado de ~ 363 pb del cebador 5'W al 3'R; *wild type* (WT) producto amplificado de ~ 266 pb del cebador 5'W al 3'W y heterocigoto (HZ) que originaria ambos productos de amplificación.

La mezcla de PCR se preparó utilizando el Biotaq PCR Kit (*Bioline*) en las siguientes proporciones de componentes:

- 12.5 µl 2x *Polymate Additive*
- 2.5 µl tampón de PCR (10x NH₄ buffer)
- 0.75 µl de MgCl₂ 50 mM
- 2.5 µl de mezcla de dNTPs 10 mM
- 0.2 µl de cebador 5'W (100 pmol/µl)
- 0.3 µl de cebador 3'W (50 pmol/µl)
- 0.15 µl de cebador 3'R (100 pmol/µl)
- 0.25 µl de Biotaq DNA polimerasa (5 U/µl)

La mezcla de reacción se ajustó a un volumen final de 25 µl con agua bidestilada autoclavada. En todas las PCR realizadas se añadió un control negativo que contenía 1.5 µl de agua bidestilada autoclavada en vez de muestra de ADN. Las distintas mezclas de PCR se incubaron en un termociclador (*Biometra*) en las siguientes condiciones: 1 ciclo de 5 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 65 °C, seguidos de una fase final de elongación de 7 min a 65 °C y mantenimiento a 4 °C.

Electroforesis de ADN

Los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% en TBE 1x (TBE 10x: Trizma base 0.89 M, ácido bórico 0.89 M y EDTA 0.02 M) teñidos con bromuro de etidio (*Bio-Rad*). A los productos amplificados en la PCR se le añadieron 5 µl de tampón de carga 6x (azul de bromofenol 0.25 %, glicerol 30 % en agua) y se cargaron 12 µl de esta mezcla en cada pocillo. Además se cargo 5 µl de marcador de peso molecular 100 pb (*Invitrogen*).

Los fragmentos amplificados se visualizaron en un transluminador de luz ultravioleta (*Gel Doc 2000, Bio-Rad*) acoplado a un sistema de adquisición de imagen digital utilizando el software *Quantity One*.

III. ENSAYOS DE UNIÓN DE RADIOLIGANDOS

Los ensayos de unión de radioligandos son una importante herramienta para la caracterización farmacológica de los receptores que permiten determinar el número de receptores así como la afinidad y selectividad que el radioligando u otros ligandos de interés tienen por el receptor en estudio. La unión de un ligando marcado radiactivamente y un receptor es una reacción química reversible basada en la ley de acción de masas que establece que en el equilibrio la ratio de asociación del complejo radioligando-receptor es igual a la ratio de disociación.

En este trabajo se realizaron dos tipos básicos de ensayos de unión de radioligandos: los ensayos de saturación y los ensayos de competición.

Ensayos de saturación

En los ensayos de saturación se determina la unión específica en el equilibrio a varias concentraciones de radioligando. La unión específica, definida como la propia del radioligando al receptor objeto de estudio, se determina a nivel experimental como la diferencia entre la unión total y la unión inespecífica. Los parámetros obtenidos de este tipo de ensayos son el número o la densidad de sitios de unión (B_{max}) y la afinidad del radioligando por el receptor, generalmente expresada por la constante de disociación en el equilibrio (K_D).

Ensayos de competición

En los ensayos de competición se mide la unión de una concentración de radioligando variando concentraciones de ligando competidor y se basan en la competición por la ocupación del receptor establecida entre el radioligando y el ligando competidor. Los parámetros obtenidos son la concentración inhibitoria 50 %

(CI_{50}) definida como la concentración del ligando competidor que inhibe el 50 % de la unión específica del radioligando y la constante de inhibición del ligando competidor (K_i) que indica la afinidad del ligando por el receptor.

En los ensayos de competición se utilizaron los fármacos haloperidol, clozapina y risperidona o ketanserina (Figura 12) y distintas herramientas farmacológicas sintetizadas por el grupo del los Dres. Raviña y Masaguer del departamento de Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela (QF1004B, QF0108B, QF0703B y QF2004B) cuyas estructuras químicas se muestran en la figura 13.

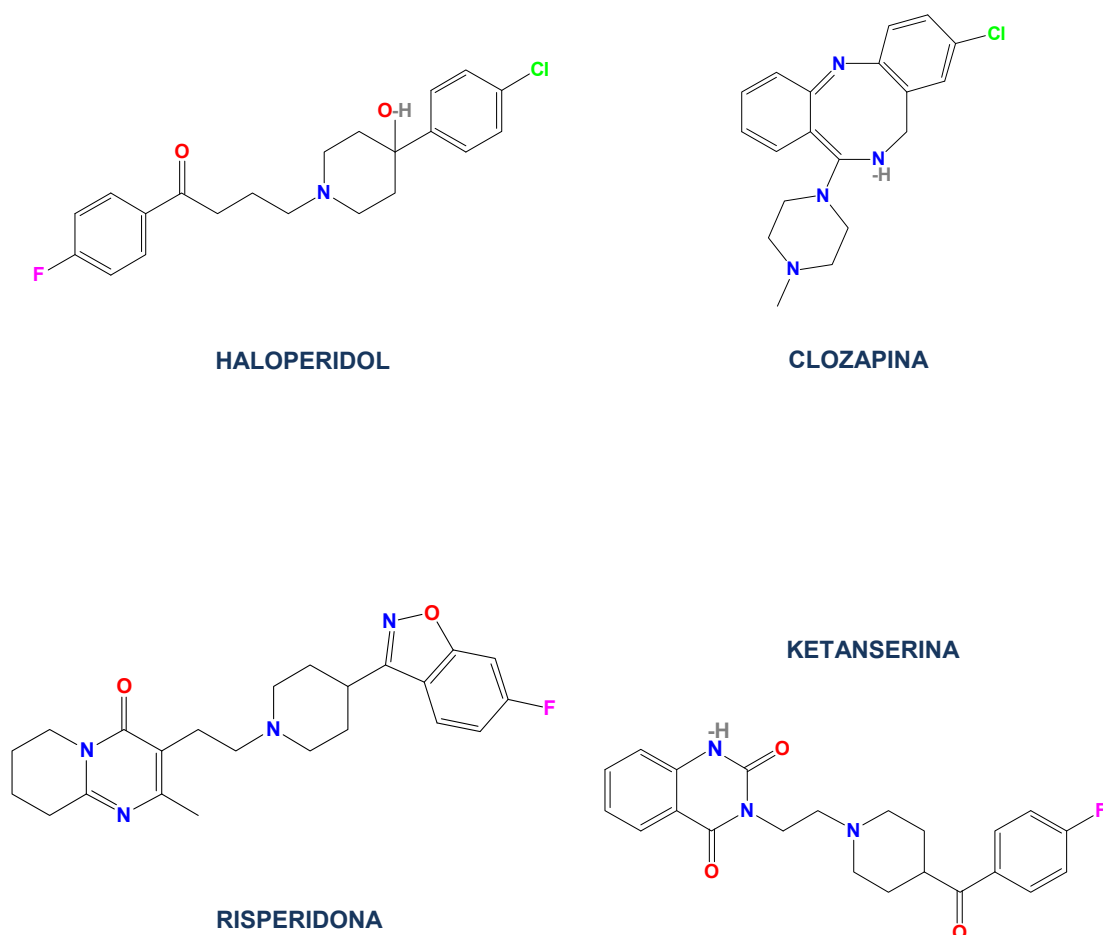


Figura 12: Estructura química de los fármacos utilizados en los ensayos de competición.

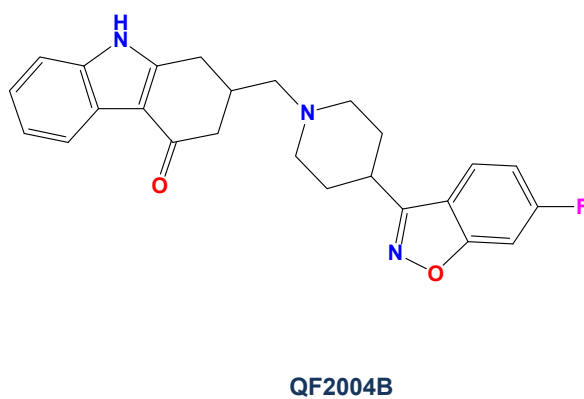
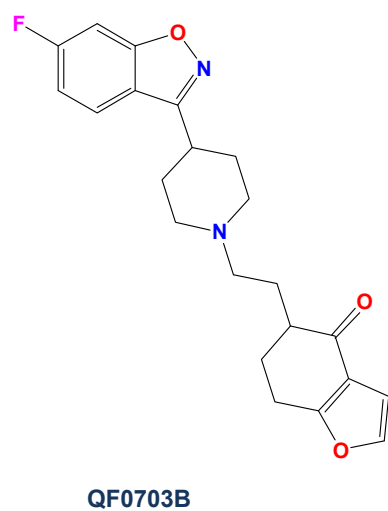
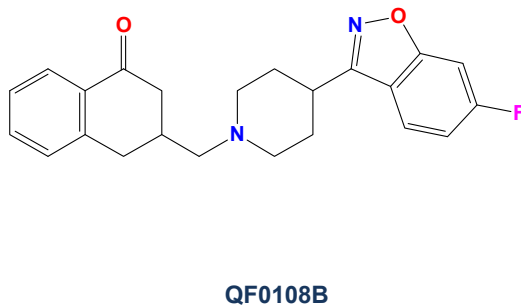
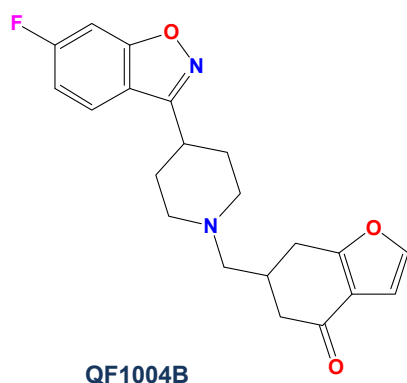


Figura 13: Estructura química de las herramientas farmacológicas sintetizadas por el grupo de los Dres. Raviña y Masaguer.

Análisis de los resultados

El ajuste de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software Inc.), seleccionando dicho programa el mejor ajuste de regresión no lineal.

En los ensayos de saturación la ecuación estándar que define la unión específica del radioligando al receptor describe una hipérbola rectangular:

$$Y = \frac{B_{\max} \cdot X}{K_d + X}$$

Donde X es la concentración de radioligando libre, B_{\max} es la máxima densidad de sitios de unión y K_d es la constante de disociación en el equilibrio del radioligando. Si la K_d es baja, la afinidad del radioligando por el receptor será alta.

En los ensayos de competición la ecuación que define la competición establecida entre radioligando y ligando competidor por la unión a un solo sitio de unión describe una curva sigmoidea:

$$Y = NSB + \frac{(BT - NSB)}{1 + 10^{(X - \text{LogIC}_{50})}}$$

Donde Y es la unión medida en presencia de varias concentraciones de ligando competidor, X es la concentración del ligando competidor, IC_{50} es la concentración del ligando competidor necesaria para inhibir el 50 % de la unión específica del radioligando, BT es la unión total en ausencia de ligando competidor y NSB es la unión no específica.

En el caso de ensayos de competición por la unión a dos sitios de unión el ajuste viene dado por la ecuación:

$$Y = NSB + (BT - NSB) \cdot \left[\frac{\text{fracción1}}{1 + 10^{(X - \text{LogIC}_{501})}} + \frac{1 - \text{fracción1}}{1 + 10^{(X - \text{LogIC}_{502})}} \right]$$

Donde la fracción 1 representa la fracción de receptores que tienen una afinidad descrita por IC_{501} y el resto de receptores (1-fracción 1) tienen una afinidad descrita por IC_{502} . Si la IC_{501} es menor que la IC_{502} , la fracción 1 es la fracción de alta afinidad.

A partir de la IC_{50} se calcula la K_i utilizando la ecuación de Cheng and Prusoff (Cheng y Prusoff, 1973):

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{X}{K_d}}$$

Donde IC_{50} es la concentración de ligando competidor requerida para inhibir el 50 % de la unión específica, X es la concentración del ligando competidor, K_d es la constante de disociación del radioligando y K_i es la concentración de ligando competidor que se unirá a la mitad de sitios de unión en el equilibrio en ausencia de radioligando u otros ligandos competidores. Si la K_i es baja, la afinidad del receptor por el ligando competidor será alta.

Estudios de caracterización de receptores D_2 Y $5-HT_{2A}$ en membranas de estriado y de corteza frontal

Preparación de las membranas de corteza frontal y estriado

Las muestras de corteza frontal o estriado se homogenizaron en 0.32 M de sacarosa con un politron y se centrifugaron a 850 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante resultante se centrifugó a 37800 g durante 39 min a 4 °C. El pellet obtenido de esta centrifugación se resuspendió en tampón de incubación (HEPES 50 mM, $MgCl_2$ 2.5 mM, EGTA 2mM, ácido ascórbico 0.1%, pH7.5), se mezcló bien con ayuda de un homogenizador manual y se incubó durante 15 min a 37 °C para eliminar la serotonina y la dopamina endógena. Después de la incubación se centrifugó a 37800 g 39 min a 4 °C. El pellet final se homogenizó en tampón de incubación con ayuda de un potter manual y se guardó a -80 °C hasta su utilización.

Ensayos de saturación por la unión a receptor D_2 en estriado

Las membranas de estriado se incubaron con 9 concentraciones diferentes de 3H -espiperona (0.005-1.2 nM) (68-141 Ci/mmol, *PerkinElmer*) durante 30 min a 37 °C en un volumen final de 200 μ l con tampón de incubación (HEPES 50 mM, $MgCl_2$ 2.5 mM, EGTA 2mM, ácido ascórbico 0.1 %, pH=7.5) suplementado con ketanserina 50 nM. La unión no específica se determinó con sulpiride 10 μ M. Las

reacciones se realizaron con puntos por duplicado y se iniciaron con la adición de la suspensión de membranas de estriado (30 µg proteína/tubo) (Tabla 3).

Transcurrido el tiempo de incubación, las reacciones se filtraron a través de filtros Whatman GF/C, pretratados con una solución de polietilenimina al 0.5 % (*Sigma Aldrich*), utilizando un Brandel Cell Harvester para separar el radioligando unido del libre. Se realizaron tres lavados consecutivos con 1.5 ml de tampón de lavado (HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, EGTA 2 mM, pH=6.6) en hielo. Los filtros se secaron en una estufa 1 hora a 60 °C. Posteriormente, se colocaron en viales de centelleo y se añadieron 4 ml de líquido de centelleo (Universol) dejándolos como mínimo 2 horas a temperatura ambiente antes de su contaje. Transcurrido este período, se detectó la radioactividad (dpm) en los viales durante 5 min en un contador beta (Beckman, LS-6000LL).

Tabla 3: Tabla resumen del ensayo de saturación por la unión a receptor D₂ en membranas de estriado.

TUBO	TAMPÓN INCUBACIÓN	SULPIRIDE (10 µM)	³ H-ESPIPERONA (0.005-1.2 nM)	MEMBRANAS (30 µg)
UNIÓN TOTAL	140 µl	---	20 µl	40 µl
UNIÓN NO ESPECÍFICA	120 µl	20 µl	20 µl	40 µl

Ensayos de saturación por la unión a receptor 5-HT_{2A} en corteza frontal

Las membranas de corteza frontal se incubaron con 9 concentraciones diferentes de ³H-LSD (0.06-16 nM) (68-141 Ci/mmol, *PerkinElmer*) en un volumen final de 200 µl con tampón de incubación (HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, EGTA 2mM, ácido ascórbico 0.1 %, pH=7.5). La unión no específica se determinó en presencia de 60 µM de mianserina. Las reacciones, llevadas a cabo con puntos por duplicado, se incubaron 30 min a 37 °C y se iniciaron con la adición de las membranas de corteza frontal (30 µg proteína/tubo) (Tabla 4).

Después de la incubación, las reacciones se filtraron de igual modo que en los ensayos de saturación por la unión a receptor D₂ en estriado, p.77.

Tabla 4: Tabla resumen del ensayo de saturación por la unión a receptor 5-HT_{2A} en corteza frontal.

TUBO	TAMPÓN INCUBACIÓN	MIANSERINA (60 µM)	³ H-LSD (0.06-16 nM)	MEMBRANAS (30 µg)
UNIÓN TOTAL	140 µl	---	20 µl	40 µl
UNIÓN NO ESPECÍFICA	120 µl	20 µl	20 µl	40 µl

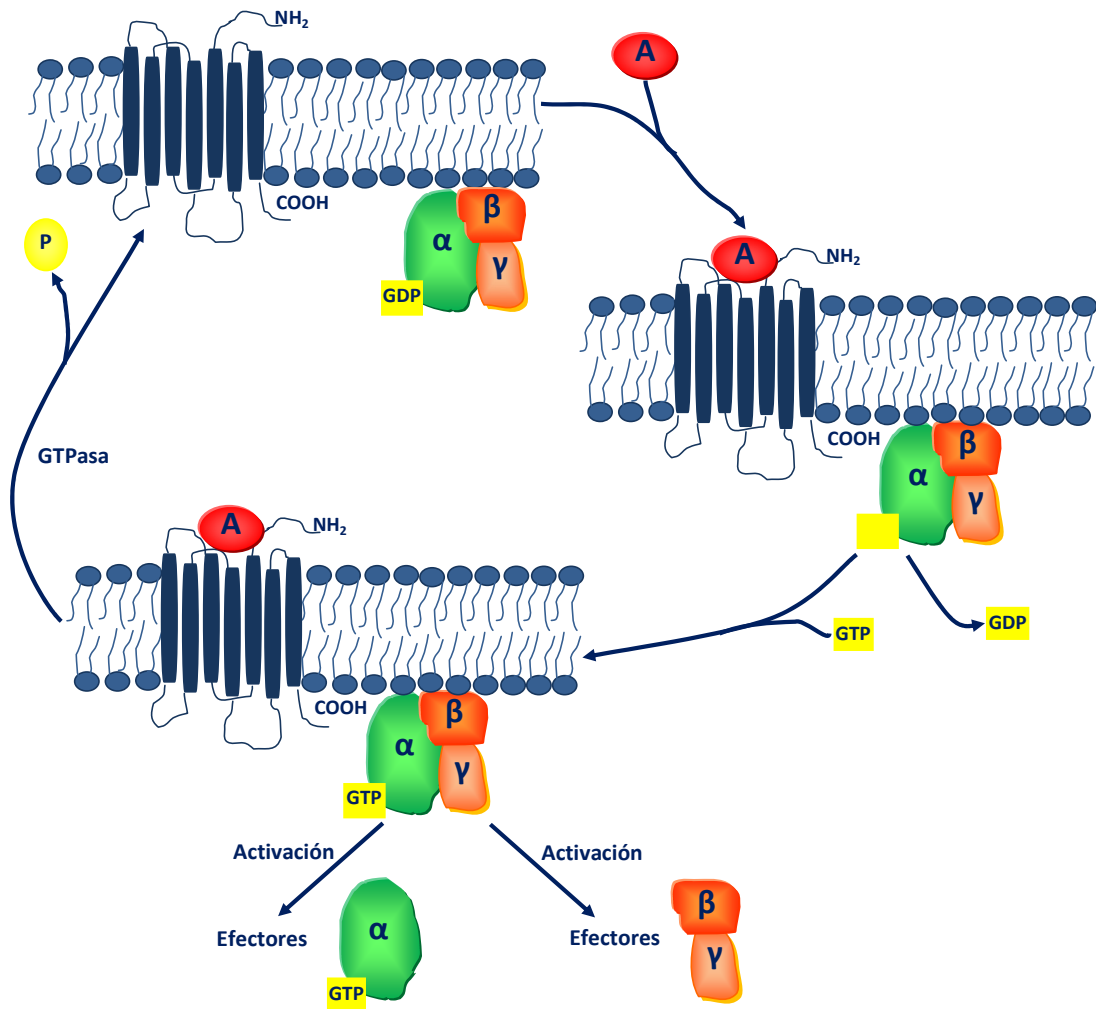
IV. ENSAYOS FUNCIONALES DE [³⁵S]GTPγS

Los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) interactúan con las proteínas G para la transducción de las señales. Las proteínas G son heterotrímeros formados por la subunidad Gα y el dímero formado por las subunidades Gβ y Gγ. Hay distintas subunidades Gα divididas en cuatro familias principales con diferentes perfiles de interacción con efectores: Gα_s activan adenilato ciclasa, Gα_{i/o} inhiben la adenilato ciclasa, Gα_{q/11} activan la fosfolipasa C-β (PLC-β) y Gα_{12/13} que podrían regular pequeñas proteínas de unión a GTP. En el estado inactivo la proteína G existe como el heterotrímero Gα(GDP)βγ con el GDP unido a la subunidad Gα. La activación del receptor por agonista conduce al cambio de GDP por GTP en la subunidad Gα originando la disociación de las subunidades Gα-GTP y Gβγ que interactúan con los sistemas efectores. La hidrólisis del GTP por la actividad GTPasa de la subunidad Gα permite la reasociación de la subunidad Gα-GDP con las subunidades Gβγ (Figura 14 A).

Los ensayos de unión de [³⁵S]GTPγS permiten evaluar la activación de un GPCR a nivel de interacción con la proteína G. El [³⁵S]GTPγS es un análogo radiactivo del GTP con elevada afinidad por la subunidad Gα de las proteínas G y altamente resistente a la actividad GTPasa de esta subunidad. La activación del

receptor conlleva la sustitución del GDP por [³⁵S]GTPγS originando el complejo Gα[³⁵S]GTPγS, que se acumula y permite la determinación de la radiactividad acumulada por medio de la detección del [³⁵S] incorporado (Figura 14 B). De este modo, el ensayo mide una consecuencia funcional de la ocupación del receptor en la fase subsiguiente a su activación (Harrison y Traynor, 2003).

A



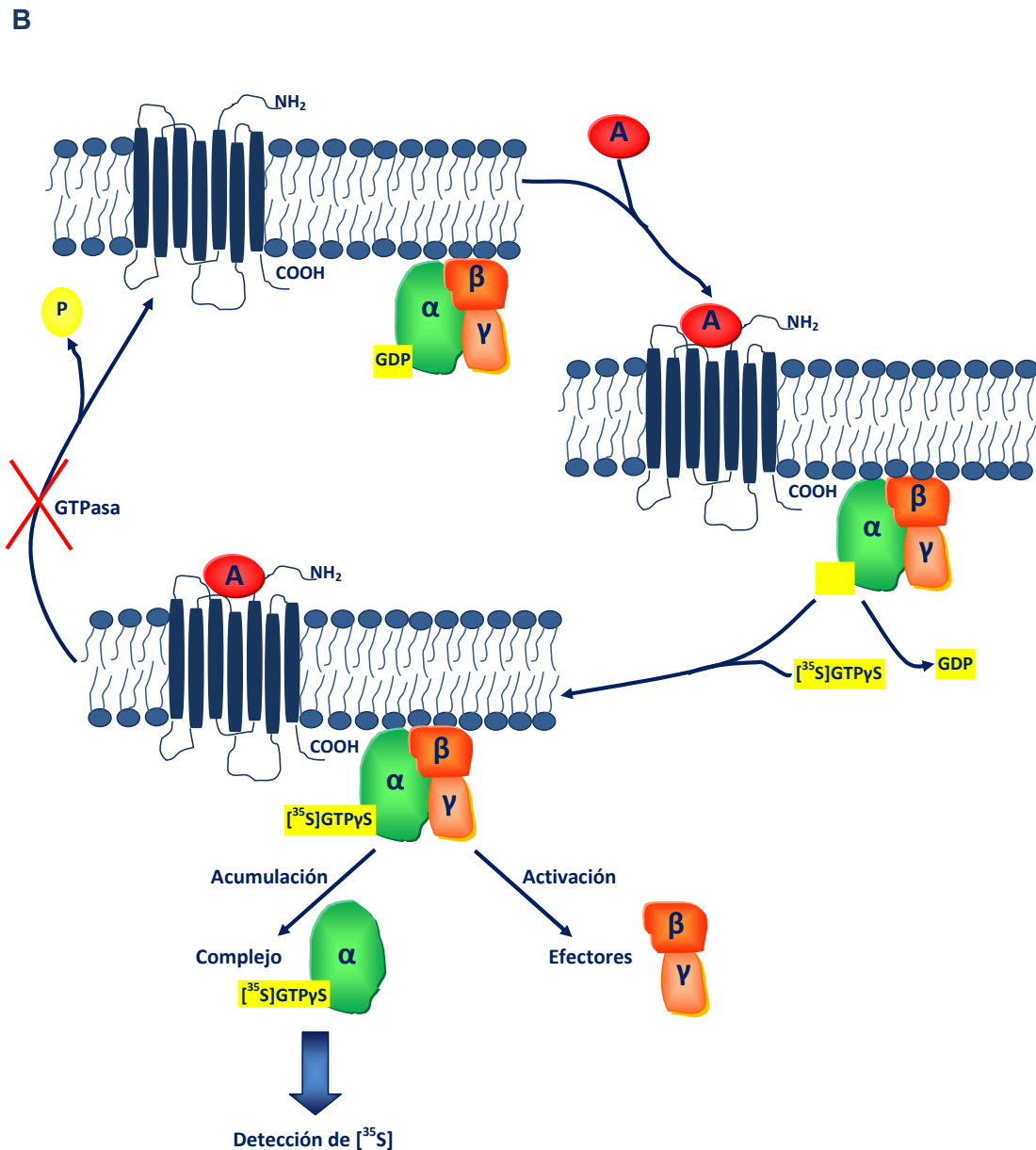


Figura 14: Ciclo de activación-desactivación de las proteínas G heterotriméricas tras la interacción de un agonista con el GPCR en condiciones normales (A) y en un ensayo de $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ (B).

La principal limitación de este método reside en la dificultad de la determinación de la activación de GPCRs acoplados a proteínas $G\alpha_s$ y $G\alpha_{q/11}$. Esto es debido a que las proteínas $G\alpha_i$ se expresan a niveles más elevados y tienen un nivel basal de intercambio de nucleótidos de guanina mayor en relación a otras proteínas G

por lo que la estimulación de la unión de [³⁵S]GTPγS a las subunidades Gα_s o Gα_{q/11} en respuesta a un agonista es muy pequeña o incluso insignificante en relación a los niveles basales, lo que dificulta la obtención de un nivel de señal adecuado (Milligan, 2003b). Esta limitación se puede evitar utilizando sistemas de expresión artificiales en los que se determina la unión del [³⁵S]GTPγS en membranas preparadas a partir de células sobreexpresando el receptor de interés o mediante ensayos de coimmunoprecipitación con un anticuerpo específico contra la proteína G de interés.

En el presente trabajo los ensayos funcionales de [³⁵S]GTPγS se utilizaron para determinar la actividad del receptor 5-HT_{2A} de serotonina (acoplado a proteínas G formadas por subunidades Gα_{q/11}) en la corteza frontal y del receptor D₂ de dopamina (acoplado a proteínas G formadas por las subunidades Gα_{i/o}) en estriado de ratón heterocigoto reeler (HZ), *wild type* (WT) y ratón Swiss.

Preparación de las membranas de corteza frontal y estriado

Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el cerebro que se lavó con NaCl 0.9% frío y se diseccionó la corteza frontal y el estriado que se guardaron a -80 °C.

Las muestras de corteza frontal o estriado se homogenizaron con un homogenizador manual en tampón de incubación (HEPES 20 mM, MgCl₂ 3mM, NaCl 100 mM, 0.2 mM ácido ascórbico, pH=7.4 e inhibidores de proteasas (complete EDTA-free protease inhibitor cocktail, *Roche*)) suplementado con sacarosa 0.25 M y DTT 1mM y se centrifugaron a 1000 g 5 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 40000 g 10 min a 4 °C. El pellet resultante se lavó dos veces en tampón de incubación suplementado con DTT 1mM realizando centrifugaciones de 40000 g 10 min a 4 °C entre cada lavado. El pellet final se resuspendió en tampón de incubación y se pasó por una aguja de calibre 27G1/2 para homogenizar la muestra. Se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad*) (Bradford, 1976) y se guardó la muestra a -80 °C hasta su utilización en el ensayo de unión.

Ensayo de unión de [³⁵S]GTPγS

Los ensayos se realizaron en un volumen total de 200 μl en tubos eppendorf conteniendo 50 μl de mezcla de ensayo (tampón de incubación con [³⁵S]GTPγS 0.5 nM (1250 Ci/mmol, *Perkin Elmer*) y 0.1 μM de GDP (Guanosine 5'-diphosphate sodium salt, *Sigma Aldrich*) en el caso de proteínas Gα_{q/11} y 10 μM de GDP en el caso de Gα_i, 25 μl de agonista (100 μM de DOI ((±)-2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine, *Sigma Aldrich*) para la determinación del receptor 5-HT_{2A} o 100 μM de dopamina (*Sigma Aldrich*) para la determinación del receptor D₂) y 100 μl de membranas de corteza frontal o estriado (30 μg proteína/punto) completando hasta el volumen total con tampón de incubación. La actividad basal se determinó incubando las membranas en las mismas condiciones pero en ausencia de agonista y completando igualmente el volumen hasta 200 μl con tampón de incubación (Tabla 5). Inmediatamente después de incorporar las membranas, se incubaron los tubos eppendorf en agitación durante 60 min a 30 °C. Tras este tiempo se añadieron 500 μl de tampón de incubación a 4 °C a cada tubo para detener la reacción y se centrifugaron las muestras a 16000 g 15 min a 4 °C. El pellet resultante se resuspendió con 90 μl de tampón de solubilización (Tris 100 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1mM, Nonidet P-40, pH=7.4 e inhibidores de proteasas (complete EDTA-free protease inhibitor cocktail, *Roche*)) suplementado con SDS 0.2% y se mantuvo en rotación durante 2 horas a 4 °C. Posteriormente se añadieron 20 μl de pansorbina (*Calbiochem*) y se mantuvieron las muestras en rotación 1 hora más a 4 °C. A continuación se centrifugaron a 16000 g 2 min a 4°C y se traspasaron 100 μl de sobrenadante a un tubo eppendorf conteniendo 1.4 μl de anticuerpo anti-Gα (anti-Gα_{q/11} (C-19) (*Santa Cruz Biotechnology*) para la determinación de la activación del receptor 5-HT_{2A} y anti-Gα_{i3} (C-10) (*Santa Cruz Biotechnology*) para la determinación de la activación del receptor D₂) y 40 μl de Proteína A/G PLUS-Agarosa (*Santa Cruz Biotechnology*) y se incubaron rotando a 4 °C durante 14-16 h. Transcurrido este tiempo se recogieron los inmunocomplejos centrifugando a 16000 g 1 min a 4 °C y se lavaron dos veces con tampón de solubilización en las mismas condiciones. A los inmunocomplejos resultantes se le añadió 1 ml de líquido

de centelleo (Optiphase supermix, *Perkin Elmer*) y se detectó la radiactividad emitida por el [³⁵S] en un contador Microbeta Trilux Reader (*PerkinElmer*).

Los datos se representaron como porcentaje de estimulación calculado como: (valor agonista- valor basal) × 100/ valor basal, considerando el valor basal como 100 %.

Tabla 5: Tabla resumen del ensayo de unión de [³⁵S]GTPγS.

TUBO	TAMPÓN INCUBACIÓN	MEZCLA DE ENSAYO*	AGONISTA (100 μM)	MEMBRANAS (30 μg)
BASAL	50 μl	50 μl	25 μl	100 μl
DOI 100 μM	25 μl	50 μl	25 μl	100 μl
DOPAMINA 100 μM	25 μl	50 μl	25 μl	100 μl

*Mezcla de ensayo: tampón de incubación con [³⁵S]GTPγS 0.5 nM (1250 Ci/mmol) y 0.1 μM de GDP en el caso de proteínas Gα_{q/11} y 10 μM de GDP en el caso de Gα_i.

V. TRAMIENTO CON HALOPERIDOL EN RATONES REELER

Animales

Los animales utilizados procedían de nuestra propia colonia de ratones reeler establecida a partir de ratones B6C3Fe (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) portadores de una mutación autosómica recesiva que origina la eliminación de una porción del gen de la reelina. El genotipo de los ratones se determinó después del período de destete mediante PCR de ADN extraído de cola. En estos estudios se utilizaron ratones macho heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT) de una edad comprendida entre los 3 y los 4 meses. Los ratones se distribuyeron en función del genotipo en grupos de cuatro o cinco ratones por caja y se mantuvieron en una

habitación con una temperatura constante (22 ± 1 °C) y un ciclo de 12 horas de luz (08:00-20:00 h) con libre acceso a comida y agua a lo largo del tratamiento.

Tratamiento 24 horas

Con el objetivo de poner a punto la metodología necesaria para la realización de un tratamiento de 15 días con haloperidol en ratones reeler (HZ y WT), así como la tecnología necesaria para el procesado de muestras y los ensayos de unión de radioligandos se realizó un tratamiento previo de 24 horas.

Los ratones de cada genotipo (ratones heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT) respectivamente) se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos de tratamiento: haloperidol (n=5) y control (n=5). Los animales del grupo haloperidol recibieron una única inyección intraperitoneal del antipsicótico haloperidol (0.2 mg/kg) con NaCl 0.9% y ácido láctico como vehículo (pH~6) en un volumen de 0.1 ml/10 g entre las 08:30 y las 09:30 h. Los animales del grupo control recibieron una única administración intraperitoneal de la solución vehículo de NaCl 0.9 % y ácido láctico en un volumen de 0.1 ml/10g. La dosis de haloperidol fue seleccionada en base a valores obtenidos de la bibliografía que se corresponden a dosis equivalentes a humanos y clínicamente relevantes. Los animales se sacrificaron 24 horas después de la administración por dislocación cervical y se diseccionó la corteza frontal y el estriado que se guardaron a -80 °C hasta su procesamiento para la realización de los ensayos de unión de radioligandos.

Tratamiento 15 días

Los ratones de cada genotipo se distribuyeron aleatoriamente en los dos grupos de tratamiento: haloperidol (n=8) y control (n=8). Los animales del grupo haloperidol recibieron una administración intraperitoneal diaria (entre las 08:30 y las 09:30 h) de haloperidol (0.2 mg/kg) con NaCl 0.9% y ácido láctico como vehículo (pH~6) en un volumen de 0.1 ml/10 g durante 15 días. Los animales del grupo control recibieron una administración intraperitoneal diaria de la solución vehículo de NaCl 0.9 % y ácido láctico en un volumen de 0.1 ml/10 g durante 15 días. Los

animales se sacrificaron 24 horas después de la última administración por dislocación cervical y se diseccionó la corteza frontal y el estriado que se guardaron a -80 °C hasta su procesamiento para la realización de los ensayos de unión de radioligandos.

Preparación de las membranas de corteza frontal y estriado

La preparación de membranas de corteza frontal y estriado se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita en la p. 76.

Ensayos de saturación por la unión a receptor D₂ en estriado

Las membranas de estriado se incubaron con 9 concentraciones diferentes de ³H-espiperona (0.005-1.2 nM) (68-141 Ci/mmol, *PerkinElmer*) 30 min a 37 °C en un volumen final de 200 µl con tampón de incubación conteniendo HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, EGTA 2mM, ácido ascórbico 0.1 %, pH=7.5 y suplementado con ketanserina 50 nM. La unión no específica se determinó con sulpiride 10 µM. Las reacciones se realizaron con puntos por duplicado y se iniciaron con la adición de la suspensión de membranas de estriado (20-30 µg proteína/tubo) (Tabla 3).

Posteriormente, las reacciones se filtraron de igual modo que en los ensayos de saturación por la unión a receptor D₂ en estriado, p.77.

Ensayos de saturación por la unión a receptor 5-HT_{2A} en corteza frontal

Las membranas de corteza frontal se incubaron con 9 concentraciones diferentes de ³H-LSD (0.06-16 nM) (68-141 Ci/mmol, *PerkinElmer*) en un volumen final de 200 µl con tampón de incubación conteniendo HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, EGTA 2mM, ácido ascórbico 0.1 %, pH=7.5. La unión no específica se determinó en presencia de 60 µM de mianserina. Las reacciones, llevadas a cabo con puntos por duplicado, se incubaron 30 min a 37 °C y se iniciaron con la adición de las membranas de corteza frontal (30 µg proteína/tubo) (Tabla 4).

Transcurrido el periodo de incubación, las reacciones se filtraron de igual modo que en los ensayos de saturación por la unión a receptor D₂ en estriado, p. 77.

VI. ENSAYOS EN SINAPTOSOMAS

Los sinaptosomas son sinapsis aisladas producidas por fraccionamiento del tejido cerebral. Estas estructuras membranosas subcelulares están formadas por el terminal presináptico, incluyendo las mitocondrias y las vesículas sinápticas, y por porciones postsinápticas, incluyendo la membrana postsináptica y la densidad postsináptica (Schrimpf y cols., 2005).

Aislamiento y purificación de sinaptosomas

El aislamiento y purificación de los sinaptosomas se realizó a partir de una modificación del protocolo descrito por Schrimpf y cols. (Schrimpf y cols., 2005). Los animales se sacrificaron en una cámara de CO₂ y se extrajeron rápidamente los cerebros que se resuspendieron en 10 % w/v de solución A (HEPES 5 mM, sacarosa 320 mM, pH 7.4) y se homogenizaron en un Potter manual a 4 °C. El homogenado resultante se centrifugó dos veces a 1000 g 5 min a 4 °C. Los sobrenadantes combinados de ambas centrifugaciones se centrifugaron a 12000 g 20 min a 4 °C. El pellet resultante contenía una capa coloreada en el fondo del tubo de centrifuga, formada fundamentalmente de mitocondrias, mientras el resto del pellet era blanco y contenía la mayoría de sinaptosomas. La parte blanquecina que contenía los sinaptosomas se resuspendió en solución A y se centrifugó a 12000 g 20 min a 4 °C. Después de esta centrifugación se decantaron los sobrenadantes y el pellet blanquecino se resuspendió en solución A y se depositó cuidadosamente encima de un gradiente de Percoll (*Percoll*TM, Amersham) formado por 2 ml de densidad 1.06 g/ml y 2 ml de densidad 1.04 g/ml en tubos de centrifuga (*Tubos ultra-clear*TM, Beckman). Los gradientes se centrifugaron a 68000 g 1 hora a 4 °C. Después de esta centrifugación los sinaptosomas formaron una banda blanca entre ambas densidades que se resuspendió en solución de Krebs (NaCl 145 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 1.2 mM, MgCl₂ · 6 H₂O 1.3 mM, H₂NaPO₄ · 2 H₂O 1.2 mM, glucosa 10 mM, HEPES 20 mM, pH 7.5) y se centrifugó a 12000 g 20 min a 4 °C. El pellet resultante se resuspendió en solución A, se lisó utilizando el ultrasonidos y se congeló a -20 °C.

Preparación de las membranas de sinaptosomas

Los sinaptosomas se descongelaron y se determinó la concentración de proteína por el método de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad*) utilizando el albúmina de suero bovino (BSA) como estándar (Bradford, 1976).

Ensayos de unión de radioligandos en sinaptosomas de ratón Swiss

Ensayos de saturación por la unión a receptor D₂

Las membranas de sinaptosomas se incubaron con 9 concentraciones diferentes de ³H-espiperona (0.005-1.2 nM) (68-141 Ci/mmol, *PerkinElmer*) 30 min a 37 °C en un volumen final de 500 µl con tampón de incubación conteniendo HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, EGTA 2mM, ácido ascórbico 0.1 %, pH=7.5 y suplementado con ketanserina 50 nM. La unión no específica se determinó con sulpiride 10 µM. Las reacciones se realizaron con puntos por duplicado y se iniciaron con la adición de la suspensión de membranas de sinaptosomas (175 µg proteína/tubo) (Tabla 6).

Después de la incubación, las reacciones se filtraron de igual modo que en los ensayos de saturación por la unión a receptor D₂ en estriado, p.77.

Tabla 6: Tabla resumen del ensayo de saturación por la unión a receptor D₂ en sinaptosomas de ratón Swiss

TUBO	TAMPÓN INCUBACIÓN	SULPIRIDE (10 µM)	³ H-ESPIPERONA (0.005-1.2 nM)	MEMBRANAS (175 µg)
UNIÓN TOTAL	425 µl	---	50 µl	25 µl
UNIÓN NO ESPECÍFICA	375 µl	50 µl	50 µl	25 µl

Ensayos de competición por la unión a receptor D₂

Las membranas de sinaptosomas se incubaron con 0.1 nM de [³H]-espiperona (68-141 Ci/mmol, *PerkinElmer*) y con las distintas concentraciones de los fármacos (haloperidol, clozapina y risperidona) o las herramientas farmacológicas (QF1004B, QF0108B, QF0703B) a estudiar en un volumen final de 500 µl con tampón de incubación conteniendo HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, EGTA 2mM, ácido ascórbico 0.1 %, pH=7.5 y suplementado con ketanserina 50 nM. La concentración de radioligando utilizada se seleccionó en base al valor de la constante de disociación del radioligando (K_D) obtenida en los ensayos de saturación. Para estar seguros que las curvas de competición se encontraban dentro de los límites de la unión específica se pusieron dos tubos adicionales al principio y al final del ensayo conteniendo radioligando y membranas de sinaptosomas para la determinación de la unión total y otros dos conteniendo radioligando, sulpiride 10 µM y membranas de sinaptosomas para la determinación de la unión no específica. Las reacciones, realizadas con puntos por duplicado, se iniciaron con la adición de las membranas de sinaptosomas (175 µg proteína/tubo) y se incubaron 30 min a 37 °C (Tabla 7).

Posteriormente, las reacciones se filtraron de igual modo que en los ensayos de saturación por la unión a receptor D₂ en estriado, p.77.

Tabla 7: Tabla resumen del ensayo de competición por la unión a receptor D₂ en sinaptosomas de ratón Swiss.

TUBO	TAMPÓN INCUBACIÓN	SULPIRIDE (10 µM)	LIGANDO COMPETIDOR*	³ H-ESPIPERONA (0.1 nM)	MEMBRANAS (230 µg)
UNIÓN TOTAL	425 µl	---	---	50 µl	25 µl
UNIÓN NO ESPECÍFICA	375 µl	50 µl	---	50 µl	25 µl
LIGANDO COMPETIDOR	375 µl	---	50 µl	50 µl	25 µl

* Ligando competidor: distintas concentraciones de los fármacos (haloperidol, clozapina y risperidona) o las herramientas farmacológicas (QF1004B, QF0108B, QF0703B).

Ensayos de saturación por la unión a receptor 5-HT_{2A}

Las membranas de sinaptosomas se incubaron con 9 concentraciones diferentes de ³H-LSD (0.02-12 nM) (60-87 Ci/mmol, *PerkinElmer*) en un volumen final de 500 µl con tampón de incubación conteniendo HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, EGTA 2mM, ácido ascórbico 0.1 %, pH=7.5. La unión no específica se determinó en presencia de 10 µM de ketanserina. Las reacciones, llevadas a cabo con puntos por duplicado, se incubaron 30 min a 37 °C y se iniciaron con la adicción de las membranas de sinaptosomas (230 µg proteína/tubo) (Tabla 8).

Transcurridos los 30 min de incubación, las reacciones se filtraron de igual modo que en los ensayos de saturación por la unión a receptor D₂ en estriado, p.77.

Tabla 8: Tabla resumen del ensayo de saturación por la unión a receptor 5-HT_{2A} en sinaptosomas de ratón Swiss.

TUBO	TAMPÓN INCUBACIÓN	KETANSERINA (10 µM)	³ H-LSD (0.02-12 nM)	MEMBRANAS (230 µg)
UNIÓN TOTAL	425 µl	---	50 µl	25 µl
UNIÓN NO ESPECÍFICA	375 µl	50 µl	50 µl	25 µl

Ensayos de competición por la unión a receptor 5-HT_{2A}

Las membranas de sinaptosomas se incubaron con 1.5 nM de [³H]-LSD (60-87 Ci/mmol, *PerkinElmer*) y las distintas concentraciones de los fármacos (haloperidol, clozapina y ketanserina) o las herramientas farmacológicas (QF1004B, QF0108B y QF2004B) a estudiar en un volumen final de 500 µl con tampón de incubación conteniendo HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, EGTA 2mM, ácido ascórbico 0.1 %, pH=7.5. La concentración de radioligando utilizada se seleccionó en base al valor de la constante de disociación del radioligando (K_D) obtenida en los ensayos de saturación. Al principio y al final de las reacciones con el ligando competidor se pusieron dos tubos conteniendo radioligando y membranas de sinaptosomas para la determinación de la unión total y otros dos conteniendo

radioligando, ketanserina 10 μM y membranas de sinaptosomas para la determinación de la unión no específica. Las reacciones, realizadas con puntos por duplicado, se iniciaron con la adición de las membranas de sinaptosomas (230 μg proteína/tubo) y se incubaron 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ (Tabla 9).

Transcurrido el periodo de incubación, las reacciones se filtraron de igual modo que en los ensayos de saturación por la unión a receptor D_2 en estriado, p.77.

Tabla 9: Tabla resumen del ensayo de competición por la unión a receptor 5-HT_{2A} en sinaptosomas de ratón Swiss.

TUBO	TAMPÓN INCUBACIÓN	KETANSERINA (10 μM)	LIGANDO COMPETIDOR*	³ H-LSD (1.5 nM)	MEMBRANAS (230 μg)
UNIÓN TOTAL	425 μl	---	---	50 μl	25 μl
UNIÓN NO ESPECÍFICA	375 μl	50 μl	---	50 μl	25 μl
LIGANDO COMPETIDOR	375 μl	---	50 μl	50 μl	25 μl

* Ligando competidor: distintas concentraciones de los fármacos (haloperidol, clozapina y ketanserina) o las herramientas farmacológicas (QF1004B, QF0108B y QF2004B).

Ensayos en sinaptosomas de ratón reeler

Preparación de los sinaptosomas para microscopía electrónica

El pellet de sinaptosomas se resuspendió en solución A (HEPES 5 mM, sacarosa 320 mM, pH 7.4), se centrifugó a 12000 g 20 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ y se fijó con una mezcla de 4% paraformaldehído (*Sigma Aldrich*) y 1% glutaraldehído (*Sigma Aldrich*) durante 15 min. Después del periodo de fijación se centrifugó a 12000 g 20 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ y se lavó dos veces con tampón fosfato de sodio 0,1 M pH=7.4 filtrado. Se centrifugó a 12000 g 15 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ entre cada lavado. Posteriormente se post-fijó el tejido con tetróxido de osmio (*Sigma Aldrich*), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el periodo de post-fijación se centrifugó a 12000 g 10 min a 4 $^{\circ}\text{C}$ y se realizaron 3 lavados con agua milliQ. Para la deshidratación del tejido se incubó el pellet de sinaptosomas en acetona al 30% (*Sigma Aldrich*),

durante 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g 3 min a 4 °C. Este proceso de deshidratación se continuó con concentraciones crecientes de acetona al 50%, 70%, 90% y 100%. La incubación con acetona al 100% se realizó dos veces. Por último se procedió a la inclusión del tejido en la resina Spurr (*Sigma Aldrich*), para ello se incubó la muestra en una solución acetona/Spurr (3:1) durante 10 min y se centrifugó a 12000 g 3 min a 4 °C. Se volvió a incubar con solución acetona/Spurr (1:1) y luego en acetona/Spurr (1:3). Finalmente se añadió Spurr puro y se dejó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se centrifugó la muestra a 12000 g 5 min a 4 °C y se dejó polimerizar en Spurr puro a 65 °C durante 3 días. Transcurrido el periodo de polimerización las muestras se guardaron a temperatura ambiente hasta su utilización.

Preparación de los cortes de sinaptosomas para microscopía electrónica

Con la ayuda de una cuchilla se eliminó el exceso de Spurr y se realizó un bloque en forma piramidal. Se retalló el bloque en un ultramicrotomo *MZ6 (Leica)*, de los bloques se obtuvieron secciones ultrafinas (50-60 nm). Los cortes se recogieron en rejillas de cobre cubiertas con una membrana de Formvar (*Sigma Aldrich*). Algunos cortes se contrastaron con citrato de plomo (*Sigma Aldrich*), para ello se tiñó el corte con acetato de uranilo al 2% (*Sigma Aldrich*), durante 10 min. Posteriormente se lavaron los cortes con agua destilada y se tiñeron con citrato de plomo durante 10 min. Finalmente los cortes se lavaron con NaOH 0.02 M y con agua destilada. La observación y las fotomicrografías se realizaron con un microscopio electrónico de transmisión (*Philips CM-12*). El fotomontaje de las imágenes se realizó con los programas Corel Photo-Paint 13 y Corel-Draw 13.

Ensayos de unión de radioligandos en sinaptosomas de ratón reeler

Ensayos de saturación por la unión a receptor D₂

Las membranas de sinaptosomas se incubaron con 9 concentraciones diferentes de ³H-espiperona (0.005-1.2 nM) (68-141 Ci/mmol, *PerkinElmer*) 30 min a 37 °C en un volumen final de 500 µl con tampón de incubación conteniendo

HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, EGTA 2mM, ácido ascórbico 0.1 %, pH=7.5 y suplementado con ketanserina 50 nM. La unión no específica se determinó con sulpiride 10 µM. Las reacciones se realizaron con puntos por duplicado y se iniciaron con la adición de la suspensión de membranas de sinaptosomas (175 µg proteína/tubo) (Tabla 10).

Transcurrido el período de incubación, las reacciones se filtraron de igual modo que en los ensayos de saturación por la unión a receptor D₂ en estriado, p.77.

Tabla 10: Tabla resumen del ensayo de saturación por la unión a receptor D₂ en sinaptosomas de ratón reeler.

TUBO	TAMPÓN INCUBACIÓN	SULPIRIDE (10 µM)	³ H-ESPIPERONA (0.005-1.2 nM)	MEMBRANAS (175 µg)
UNIÓN TOTAL	425 µl	---	50 µl	25 µl
UNIÓN NO ESPECÍFICA	375 µl	50 µl	50 µl	25 µl

Ensayos de competición por la unión a receptor D₂

Las membranas de sinaptosomas se incubaron con 0.3 nM de [³H]-espiperona (68-141 Ci/mmol, *PerkinElmer*) y con las distintas concentraciones de los fármacos haloperidol, clozapina y risperidona en un volumen final de 500 µl con tampón de incubación conteniendo HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, EGTA 2mM, ácido ascórbico 0.1 %, pH=7.5 y suplementado con ketanserina 50 nM. La concentración de radioligando utilizada se seleccionó en base al valor de la constante de disociación del radioligando (K_D) obtenida en los ensayos de saturación. Se pusieron dos tubos adicionales al principio y al final del ensayo conteniendo radioligando y membranas de sinaptosomas para la determinación de la unión total y otros dos conteniendo radioligando, sulpiride 10 µM y membranas de sinaptosomas para la determinación de la unión no específica. Las reacciones, realizadas con puntos por duplicado, se iniciaron con la adición de las membranas de sinaptosomas (175 µg proteína/tubo) y se incubaron 30 min a 37 °C (Tabla 11).

Posteriormente, las reacciones de incubación se filtraron de igual modo que en los ensayos de saturación por la unión a receptor D₂ en estriado, p77.

Tabla 11: Tabla resumen del ensayo de competición por la unión a receptor D₂ en sinaptosomas de ratón reeler.

TUBO	TAMPÓN INCUBACIÓN	SULPIRIDE (10 µM)	LIGANDO COMPETIDOR*	³ H-ESPIPERONA (0.3 nM)	MEMBRANAS (230 µg)
UNIÓN TOTAL	425 µl	---	---	50 µl	25 µl
UNIÓN NO ESPECÍFICA	375 µl	50 µl	---	50 µl	25 µl
LIGANDO COMPETIDOR	375 µl	---	50 µl	50 µl	25 µl

* Ligando competidor: distintas concentraciones de los fármacos haloperidol, clozapina y risperidona.

Ensayos de saturación por la unión a receptor 5-HT_{2A}

Las membranas de sinaptosomas se incubaron con 8 concentraciones diferentes de ³H-ketanserina (0.06-8 nM) (60-90 Ci/mmol, *PerkinElmer*) o con 9 concentraciones diferentes de ³H-LSD (0.06-16 nM) (60-87 Ci/mmol, *PerkinElmer*) en un volumen final de 500 µl con tampón de incubación conteniendo HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, EGTA 2mM, ácido ascórbico 0.1 %, pH=7.5. La unión no específica se determinó en presencia de 60 µM de mianserina. Las reacciones, llevadas a cabo con puntos por duplicado, se incubaron 30 min a 37 °C y se iniciaron con la adición de las membranas de sinaptosomas (175 µg proteína/tubo) (Tabla 12).

Transcurridos los 30 min de incubación, las reacciones se filtraron de igual modo que en los ensayos de saturación por la unión a receptor D₂ en estriado, p.77.

Tabla 12: Tabla resumen del ensayo de saturación por la unión a receptor 5-HT_{2A} en sinaptosomas de ratón reeler.

TUBO	TAMPÓN INCUBACIÓN	MIANSERINA (60 µM)	³ H-KETANSERINA (0.06-8 nM) O ³ H-LSD (0.06-16 nM)	MEMBRANAS (175 µg)
UNIÓN TOTAL	425 µl	---	50 µl	25 µl
UNIÓN NO ESPECÍFICA	375 µl	50 µl	50 µl	25 µl

Ensayos de competición por la unión a receptor 5-HT_{2A}

Las membranas de sinaptosomas se incubaron con 1.7 nM de [³H]-LSD (60-87 Ci/mmol, *PerkinElmer*) y las distintas concentraciones de los fármacos haloperidol, clozapina y risperidona en un volumen final de 500 µl con tampón de incubación conteniendo HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, EGTA 2mM, ácido ascórbico 0.1 %, pH=7.5. La concentración de radioligando utilizada se seleccionó en base al valor de la constante de disociación del radioligando (K_D) obtenida en los ensayos de saturación. Al principio y al final de las reacciones con el ligando competidor se pusieron dos tubos conteniendo radioligando y membranas de sinaptosomas para la determinación de la unión total y otros dos conteniendo radioligando, mianserina 60µM y membranas de sinaptosomas para la determinación de la unión no específica. Las reacciones, realizadas con puntos por duplicado, se iniciaron con la adición de las membranas de sinaptosomas (175 µg proteína/tubo) y se incubaron 30 min a 37 °C (Tabla 13).

Transcurrido el periodo de incubación, las reacciones se filtraron de igual modo que en los ensayos de saturación por la unión a receptor D₂ en estriado, p.77.

Tabla 13: Tabla resumen del ensayo de competición por la unión a receptor 5-HT_{2A} en sinaptosomas de ratón reeler.

TUBO	TAMPÓN INCUBACIÓN	MIANSERINA (60 μM)	LIGANDO COMPETIDOR*	³ H-LSD (1.7 nM)	MEMBRANAS (175 μg)
UNIÓN TOTAL	425 μl	---	---	50 μl	25 μl
UNIÓN NO ESPECÍFICA	375 μl	50 μl	---	50 μl	25 μl
LIGANDO COMPETIDOR	375 μl	---	50 μl	50 μl	25 μl

* Ligando competidor: distintas concentraciones de los fármacos haloperidol, clozapina y risperidona.

Ensayos de competición por la unión a receptor 5-HT_{2A} en presencia de Gpp(NH)p

Se realizaron ensayos de competición en presencia de Gpp(NH)p (guanosina-5'-(β,γ-imido)trifosfato), un análogo no hidrolizable del GTP que desacopla las proteínas G del receptor, para estudiar si las curvas de competición bifásicas obtenidas en los ensayos de competición con los fármacos haloperidol y risperidona se debían al grado de acoplamiento de las proteínas G al receptor marcado.

Las membranas de sinaptosomas se incubaron con 1.7 nM de [³H]-LSD (60-87 Ci/mmol, *PerkinElmer*) y las distintas concentraciones de los fármacos haloperidol y risperidona en un volumen final de 500 μl con tampón de incubación conteniendo HEPES 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, EGTA 2mM, ácido ascórbico 0.1 %, pH=7.5. Al principio y al final de las reacciones con los fármacos se pusieron dos tubos conteniendo radioligando y membranas de sinaptosomas para la determinación de la unión total y otros dos conteniendo radioligando, mianserina 60μM y membranas de sinaptosomas para la determinación de la unión no específica. Todas las reacciones, realizadas con puntos por duplicado, se incubaron 30 min a 37 °C en presencia de Gpp(NH)p 100 μM (*Sigma Aldrich*) y se iniciaron con la adición de las membranas de sinaptosomas (175 μg proteína/tubo) (Tabla 14).

Después de la incubación las reacciones se filtraron de igual modo que en los ensayos de saturación por la unión a receptor D₂ en estriado, p.77.

Tabla 14: Tabla resumen del ensayo de competición por la unión a receptor 5-HT_{2A} en presencia de Gpp(NH)p en sinaptosomas de ratón reeler.

TUBO	TAMPÓN INCUBACIÓN	Gpp(NH)p (100 µM)	MIANSERINA (60 µM)	LIGANDO COMPETIDOR*	³ H-LSD (1.7 nM)	MEMBRANAS (175 µg)
UNIÓN TOTAL	375 µl	50 µl	---	---	50 µl	25 µl
UNIÓN NO ESPECÍFICA	325 µl	50 µl	50 µl	---	50 µl	25 µl
LIGANDO COMPETIDOR	325 µl	50 µl	---	50 µl	50 µl	25 µl

* Ligando competidor: distintas concentraciones de los fármacos haloperidol y risperidona.

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresaron como la media ± eem (en los ensayos de saturación y competición) y como la media de los porcentajes de estimulación ± eem (en los ensayos de unión de [³⁵S]GTPγS). El análisis estadístico se realizó utilizando el software SPSS, versión 15.0 (SPSS software Inc., Chicago, USA).

Las comparaciones entre los genotipos (en los ensayos de saturación y competición) o entre los ratones (HZ, WT y Swiss) (en los ensayos de [³⁵S]GTPγS) se realizaron mediante ANOVA de un factor seguido del test de comparación (post hoc test) de la diferencia menos significativa (DMS). Los resultados del tratamiento durante 15 días con haloperidol se analizaron mediante ANOVA de dos factores para estudiar las posibles interacciones entre el genotipo y el tratamiento. Cuando se observaron interacciones significativas, se realizó ANOVA de un factor para analizar las diferencias entre los grupos de tratamiento seguida del test post-hoc DMS. En todos los casos se fijó un nivel de significación de p<0.05.

VIII. REACTIVOS UTILIZADOS

Además de los distintos reactivos ya citados a lo largo del texto, a continuación se detallan las casas comerciales que suministraron los reactivos utilizados en la preparación de los distintos tampones de ensayo así como las de los reactivos farmacológicos utilizados en los ensayos de unión de radioligandos.

Reactivos utilizados en la preparación de tampones

Los reactivos SDS (Dodecilsulfato sódico), Trizma base, sacarosa, EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate), ácido bórico, HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid), EGTA (Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid), ácido L-ascórbico, MgCl₂, DTT (DL-dithiothreitol), ácido láctico, H₂NaPO₄ · 2 H₂O, KCl, CaCl₂, BSA (albúmina de suero bovino), Nonidet P-40 y fosfato de sodio fueron suministrados por *Sigma Aldrich*.

Los reactivos NaCl, glucosa y NaOH fueron suministrados por *Panreac*.

Reactivos farmacológicos utilizados en los ensayos de unión de radioligandos

Los reactivos farmacológicos haloperidol, clozapina, risperidona, ketanserina, mianserina y sulpiride fueron suministrados por *Sigma Aldrich*. A partir de estos reactivos se preparó una solución stock de 1mM con DMSO (Dimetil sulfóxido, *Sigma Aldrich*).

RESULTADOS

I. ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE RECEPTORES EN HOMOGENADOS DE CEREBRO DE RATÓN

Estudios en ratón Swiss

En esta parte del trabajo nos propusimos estudiar la densidad y afinidad de los receptores D₂ de dopamina y 5-HT_{2A} de serotonina en homogenados de membranas de estriado y de corteza frontal de ratón Swiss, repectivamente.

Caracterización del receptor D₂ de dopamina en el estriado

La caracterización del receptor D₂ de dopamina se realizó mediante ensayos de saturación utilizando el radioligando ³H-espiperona en membranas de estriado de ratón Swiss (Figura 15). El radioligando ³H-espiperona tiene una elevada afinidad por los receptores de dopamina y es utilizado ampliamente desde hace más de 30 años para marcar estos receptores tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo* (Leysen y cols., 1978). Los parámetros de unión (B_{max} y K_D) de ³H-espiperona se muestran en la tabla 15.

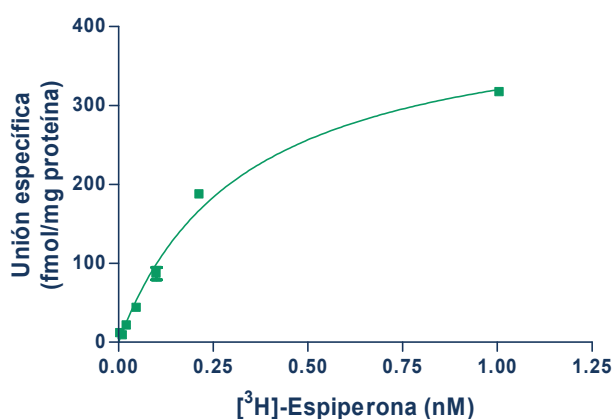


Figura 15: Curva de unión específica de [³H]-espiperona en el receptor D₂ de dopamina en membranas de estriado de ratón Swiss utilizando sulpiride 10 μM como ligando para evaluar la unión inespecífica. Se muestra un experimento representativo de un total de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Tabla 15: Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [3H]-espiperona en membranas de estriado de ratón Swiss. Los valores representan la media \pm eem de dos experimentos independientes (n=2) realizados con puntos por duplicado.

$B_{max} \pm eem$ (fmol/mg proteína)	$K_D \pm eem$ (nM)
413.20 \pm 12.00	0.40 \pm 0.07

Caracterización del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en la corteza frontal

La caracterización del receptor 5-HT_{2A} de serotonina se realizó mediante ensayos de saturación utilizando el radioligando ³H-LSD en membranas de corteza frontal de ratón Swiss (Figura 16). El LSD es una sustancia alucinógena que actúa como ligando agonista de los receptores 5-HT_{2A} (Gonzalez-Maeso y cols., 2007). Los parámetros de unión (B_{max} y K_D) de ³H-LSD se muestran en la tabla 16.

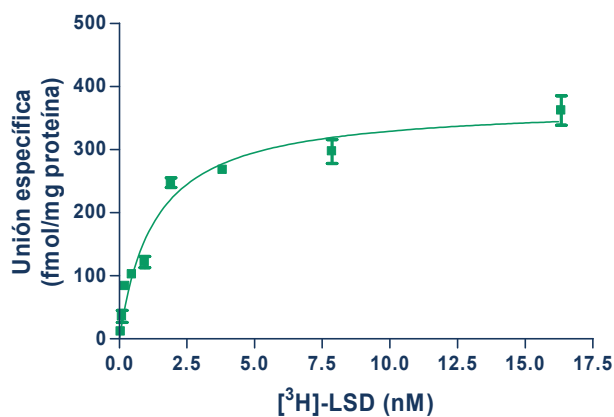


Figura 16: Curva de unión específica de [3H]-LSD en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina en membranas de corteza frontal de ratón Swiss utilizando mianserina 60 μ M como ligando para evaluar la unión inespecífica. Se muestra un experimento representativo de un total de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Tabla 16: Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [3H]-LSD en membranas de corteza frontal de ratón Swiss. Se muestra la media \pm eem de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

$B_{max} \pm eem$ (fmol/mg proteína)	$K_D \pm eem$ (nM)
383.35 \pm 11.75	1.46 \pm 0.17

Estudios en ratón reeler

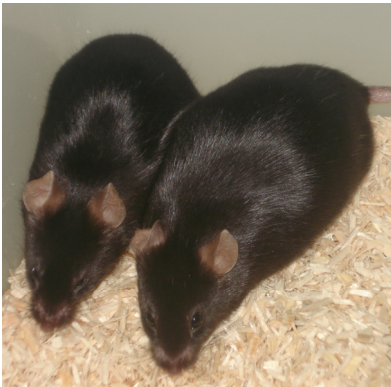
Como se ha comentado en el apartado de introducción, se ha descrito que los niveles del ARNm y de la proteína reelina están disminuidos alrededor de un 50 % en la corteza prefrontal, el hipocampo y el cerebelo de los pacientes esquizofrénicos, y este descenso ha sido propuesto como un factor de vulnerabilidad al desarrollo de esquizofrenia (Guidotti y cols., 2000; Impagnatiello y cols., 1998). Por esta razón, el ratón heterocigoto reeler (HZ), que posee una reducción de la expresión de reelina similar a la observada en pacientes esquizofrénicos, fue propuesto como un modelo genético para el estudio de los factores de vulnerabilidad a esquizofrenia y para el desarrollo de nuevos fármacos antipsicóticos (Costa y cols., 2002b).

En esta parte del trabajo, nos propusimos estudiar el posible efecto de los niveles de reelina en la expresión de dos de los principales GPCRs implicados en el efecto de los actuales fármacos antipsicóticos, el receptor D_2 de dopamina y el receptor $5-HT_{2A}$ de serotonina. Para ello, se realizaron ensayos de unión de radioligandos en membranas de estriado y corteza frontal de ratón heterocigoto reeler (HZ, ~50 % de reelina) y *wild type* (WT).

Determinación del genotipo

A partir de una pareja de ratones heterocigoto reeler (HZ) obtenida de los laboratorios Jackson (Bar Harbor ME, USA) establecimos nuestra propia colonia de ratones. La determinación del genotipo se realizó mediante PCR a partir de ADN genómico extraído de muestras de cola. Los productos amplificados por PCR permitieron distinguir los tres genotipos: ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y *wild type* (WT) (Figura 17).

A



B



Figura 17: A) Ratones B6C3Fe reeler (HZ) portadores de una mutación autosómica recesiva espontánea en el gen de la reelina. B) Productos amplificados por PCR a partir de ADN genómico de ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y *wild type* (WT). M: Marcador de peso molecular.

Ensayos de unión de radioligandos en membranas de estriado y de corteza frontal

En esta parte del trabajo nos propusimos estudiar si los niveles de reelina alteraban la densidad y sensibilidad del receptor D₂ de dopamina y del receptor 5-HT_{2A} de serotonina. Para ello se realizaron ensayos de saturación para caracterizar el receptor D₂ en membranas de estriado y el receptor 5-HT_{2A} en membranas de corteza frontal de ratones heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT).

Caracterización del receptor D₂ de dopamina en el estriado

La caracterización del receptor D₂ de dopamina se realizó mediante ensayos de saturación utilizando el radioligando ³H-espiperona en membranas de estriado de ratón heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT) (Figura 18). Los parámetros de unión (B_{max} y K_D) de ³H-espiperona se muestran en la tabla 17. El análisis estadístico mediante ANOVA de un factor reveló un efecto significativo del genotipo para el valor B_{max} [F(1,3)=54.021, p<0.05] pero no para el valor de K_D [F(1,3)=0.898, p=0.443] de ³H-espiperona en membranas de estriado de los dos genotipos.

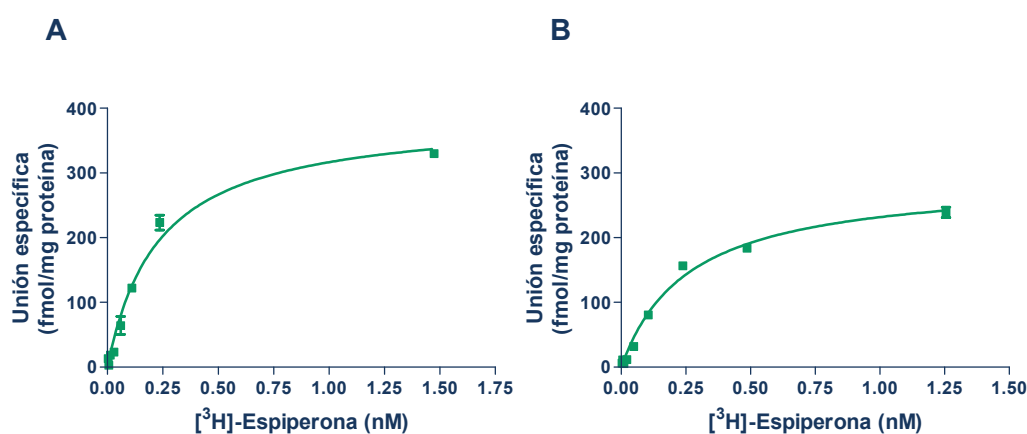


Figura 18: Curva de unión específica de [³H]-espiperona en el receptor D₂ de dopamina en membranas de estriado de ratón heterocigoto reeler (HZ) (A) y *wild type* (WT) (B) utilizando sulpiride 10 μM como ligando para evaluar la unión inespecífica. Se muestra un experimento representativo de un total de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Tabla 17: Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [3H]-espiperona en membranas de estriado de ratón heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT). Se muestra la media \pm eem de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

GENOTIPO	$B_{max} \pm eem$ (fmol/mg proteína)	$K_D \pm eem$ (nM)
Heterocigoto reeler (HZ)	378.15 \pm 11.75*	0.33 \pm 0.10
<i>Wild type</i> (WT)	291.75 \pm 0.35	0.23 \pm 0.03

*: $p < 0.05$ respecto a WT (ANOVA de un factor)

Caracterización del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en la corteza frontal

La caracterización del receptor 5-HT_{2A} de serotonina se realizó mediante ensayos de saturación utilizando el radioligando ³H-LSD en membranas de corteza frontal de ratón heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT) (Figura 19). Los parámetros de unión (B_{max} y K_D) de ³H-LSD se muestran en la tabla 18. El análisis estadístico mediante ANOVA de un factor, reveló un efecto significativo del genotipo para el valor de B_{max} [$F(1,4)=10.134$, $p < 0.05$] pero no para el valor de K_D [$F(1,4)=5.492$, $p=0.101$].

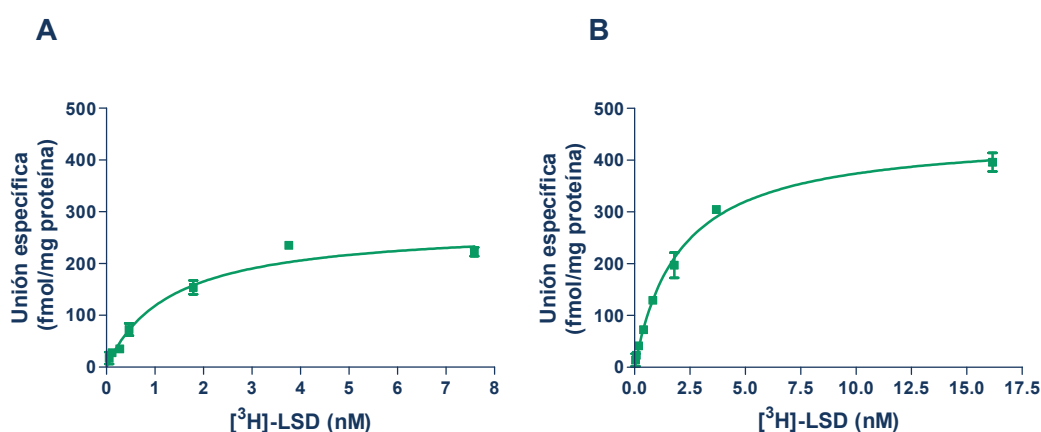


Figura 19: Curva de unión específica de [3H]-LSD en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina en membranas de corteza frontal de ratón heterocigoto reeler (HZ) (A) y *wild type* (WT) (B) utilizando mianserina 60 μ M como ligando para evaluar la unión inespecífica. Se muestra un experimento representativo de un total de dos (n=2) (HZ) y de tres (n=3) (WT) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Tabla 18: Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [3H]-LSD en membranas de corteza frontal de ratón heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT). Se muestra la media \pm eem de dos (n=2) (HZ) y de tres (n=3) (WT) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

GENOTIPO	$B_{max} \pm eem$ (fmol/mg proteína)	$K_D \pm eem$ (nM)
Heterocigoto reeler (HZ)	276.05 \pm 2.95*	1.43 \pm 0.12
<i>Wild type</i> (WT)	407.27 \pm 31.88	2.22 \pm 0.25

*: $p < 0.05$ respecto a WT (ANOVA de un factor)

II. ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD EN EL ACOPLAMIENTO A LAS PROTEÍNAS G

Una vez comprobado que la reelina influye en la expresión de los receptores D₂ y 5-HT_{2A}, nos planteamos estudiar el efecto de los niveles de reelina en la activación de las proteínas G mediada por estos receptores. Para ello se realizaron ensayos funcionales de [³⁵S]GTPγS en estriado (para la caracterización del receptor D₂) y en corteza frontal (para la caracterización del receptor 5-HT_{2A}) de ratón heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT). Además estos ensayos se realizaron al mismo tiempo en membranas de estriado y de corteza frontal de ratón Swiss como una medida de control del ensayo.

Estudios de la funcionalidad en el acoplamiento a proteínas G del receptor D₂ de dopamina en el estriado

Los estudios de la funcionalidad en el acoplamiento a proteínas G del receptor D₂ se realizaron mediante la estimulación de la unión de [³⁵S]GTPγS con dopamina 100 μM seguida de la inmunoprecipitación con el anticuerpo Gα_{i1,2,3} en membranas de estriado de ratón heterocigoto reeler (HZ), *wild type* (WT) y ratón Swiss. La actividad funcional de los receptores D₂ en el estriado de los distintos ratones se muestra en la figura 20. El análisis estadístico mediante ANOVA de un factor mostró diferencias significativas en la unión de [³⁵S]GTPγS [F(2,42)=6.490, p<0.01] en el receptor D₂ en membranas de estriado de los distintos ratones. La prueba post hoc DMS mostró un incremento significativo en la actividad funcional de los receptores D₂ en el estriado de los ratones heterocigoto reeler (HZ) con respecto a los *wild type* (WT) (p<0.001).

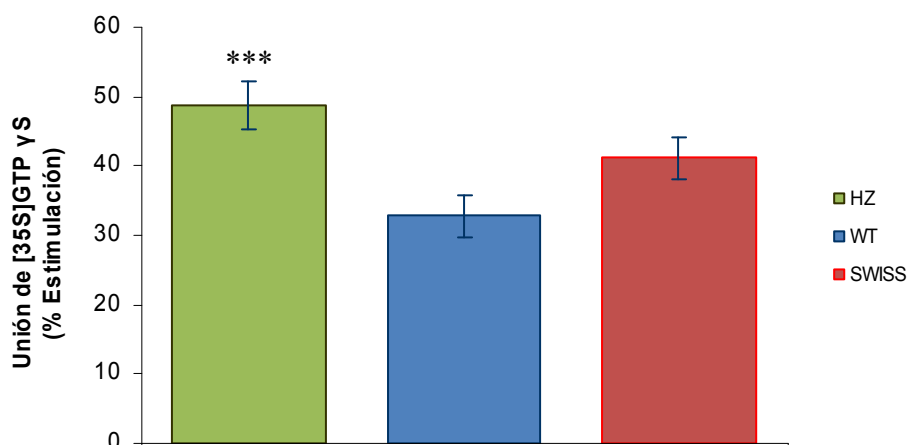


Figura 20: Estimulación de la unión de [^{35}S]GTP γ S por dopamina 100 μM en el receptor D_2 en membranas de estriado de ratones heterocigoto reeler (HZ), *wild type* (WT) y Swiss. Se representa la media \pm eem de los porcentajes de estimulación de un total de tres a cinco experimentos independientes (n=3-5). ***: $p < 0.001$ respecto a WT (ANOVA de un factor con DMS post hoc test).

Estudios de la funcionalidad en el acoplamiento a proteínas G del receptor 5-HT $_2\text{A}$ de serotonina en la corteza frontal

Los estudios de la funcionalidad en el acoplamiento a proteínas G del receptor 5-HT $_2\text{A}$ se realizaron mediante la estimulación de la unión de [^{35}S]GTP γ S con DOI 100 μM seguida de la inmunoprecipitación con el anticuerpo $\text{G}\alpha_{q/11}$ en membranas de corteza frontal de ratón heterocigoto reeler (HZ), *wild type* (WT) y ratón Swiss. La actividad funcional de los receptores 5-HT $_2\text{A}$ en la corteza frontal de los distintos ratones se muestra en la figura 21. El análisis estadístico mediante ANOVA de un factor mostró diferencias significativas en la unión de [^{35}S]GTP γ S [$F(2,28)=17.211$, $p < 0.001$] en el receptor 5-HT $_2\text{A}$ en membranas de corteza frontal de los distintos ratones. La prueba post hoc DMS mostró un descenso significativo en la actividad funcional de los receptores 5-HT $_2\text{A}$ en la corteza de los ratones heterocigoto reeler (HZ) con respecto a los *wild type* (WT) ($p < 0.001$).

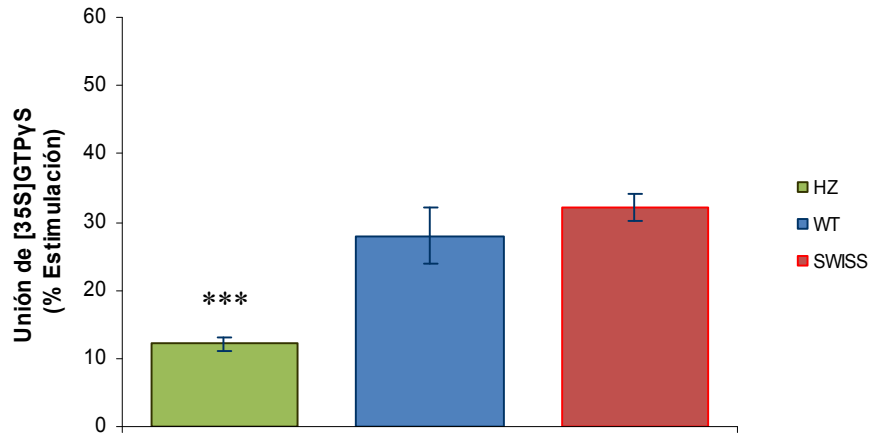


Figura 21: Estimulación de la unión de [³⁵S]GTPγS por DOI 100 μM en el receptor 5-HT_{2A} en membranas de corteza frontal de ratones heterocigoto reeler (HZ), *wild type* (WT) y Swiss. Se representa la media ± eem de los porcentajes de estimulación de un total de cuatro a cinco experimentos independientes (n=4-5). ***: p<0.001 respecto a WT (ANOVA de un factor con DMS post hoc test).

III. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES POR EL TRATAMIENTO CON EL ANTIPSICÓTICO HALOPERIDOL

Con el objetivo de conocer la influencia de la reelina sobre la modulación de la expresión de los receptores D₂ de dopamina y 5-HT_{2A} de serotonina ejercida por el tratamiento con el antipsicótico haloperidol realizamos un tratamiento de 24 horas y otro de 15 días con este fármaco en ratones reeler heterocigoto (HZ) y *wild type* (WT).

Tratamiento 24 horas

Como paso previo al tratamiento de 15 días se realizó un tratamiento con una única administración (24 horas) del fármaco haloperidol (0.2 mg/kg). Se realizaron ensayos de saturación para determinar los niveles de densidad y sensibilidad del receptor D₂ en membranas de estriado y del receptor 5-HT_{2A} en membranas de corteza frontal.

Ensayos de saturación de la unión a receptor D₂ en el estriado

Los niveles de densidad y sensibilidad del receptor D₂ de dopamina se determinaron mediante ensayos de saturación utilizando el radioligando ³H-espiperona en los cuatro grupos de tratamiento: ratones heterocigoto reeler (HZ) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10g), HZ tratados con haloperidol (0.2 mg/kg), ratones *wild type* (WT) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10 g) y WT tratados con haloperidol (0.2 mg/kg) (Figura 22 y 23) sin que se observasen diferencias significativas en ambos parámetros en función del tratamiento. Los parámetros de unión (B_{max} y K_D) obtenidos para los cuatro grupos de tratamiento se muestran en la tabla 19.

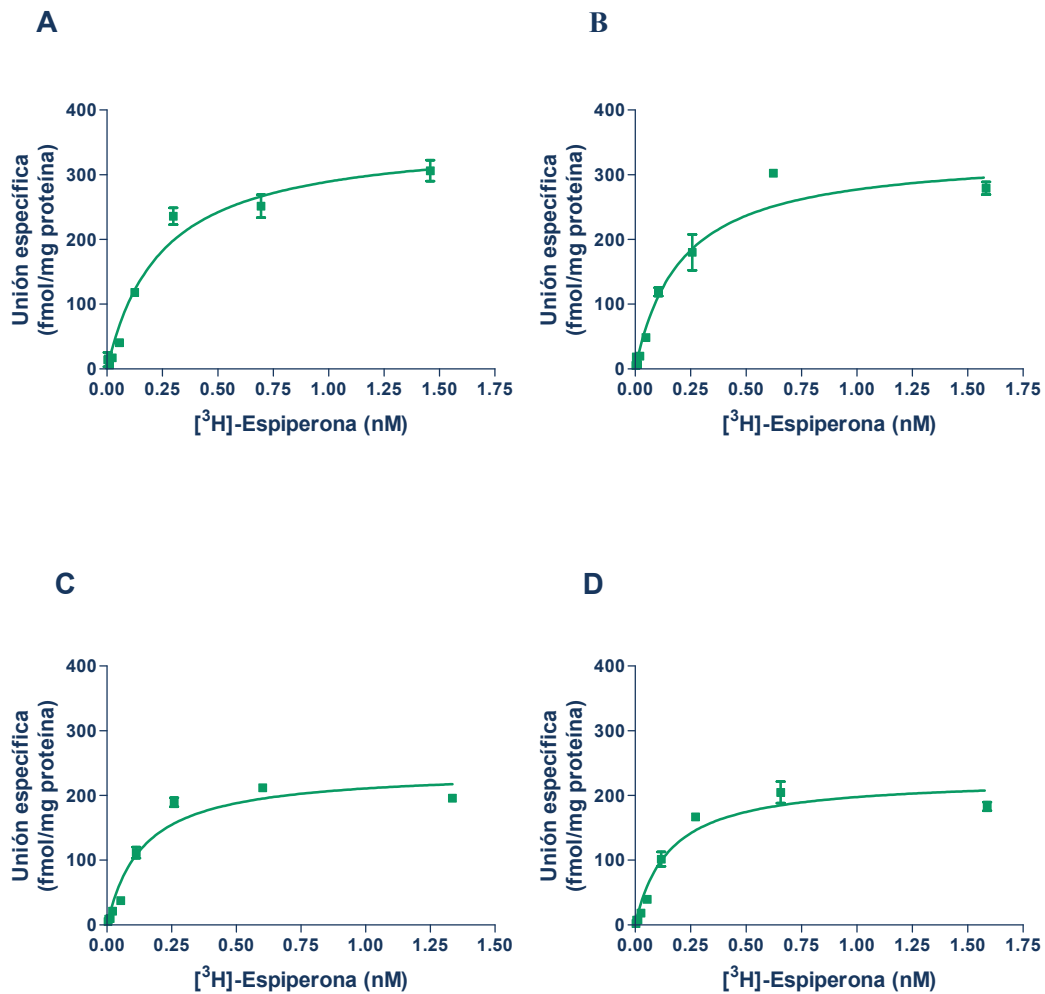


Figura 22: Curva de unión específica de [³H]-espiperona en el receptor D₂ de dopamina en membranas de estriado de ratones heterocigoto reeler (HZ) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10g) (A), HZ tratados con haloperidol (0.2 mg/kg) (B), *wild type* (WT) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10 g) (C) y WT tratados con haloperidol (0.2 mg/kg) (D), utilizando sulpiride 10 μM como ligando para evaluar la unión inespecífica. Se muestra un experimento realizado con puntos por duplicado.

Tabla 19: Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [3H]-espiperona en membranas de estriado de los cuatro grupos de tratamiento. Se muestra el valor \pm eem de un experimento realizado con puntos por duplicado.

GRUPOS TRATAMIENTO	$B_{max} \pm eem$ (fmol/mg proteína)	$K_D \pm eem$ (nM)
HZ Control	360.1 \pm 21.92	0.24 \pm 0.04
HZ Haloperidol	334.4 \pm 20.18	0.21 \pm 0.04
WT Control	239.9 \pm 16.57	0.14 \pm 0.03
WT Haloperidol	227.6 \pm 14.23	0.15 \pm 0.03

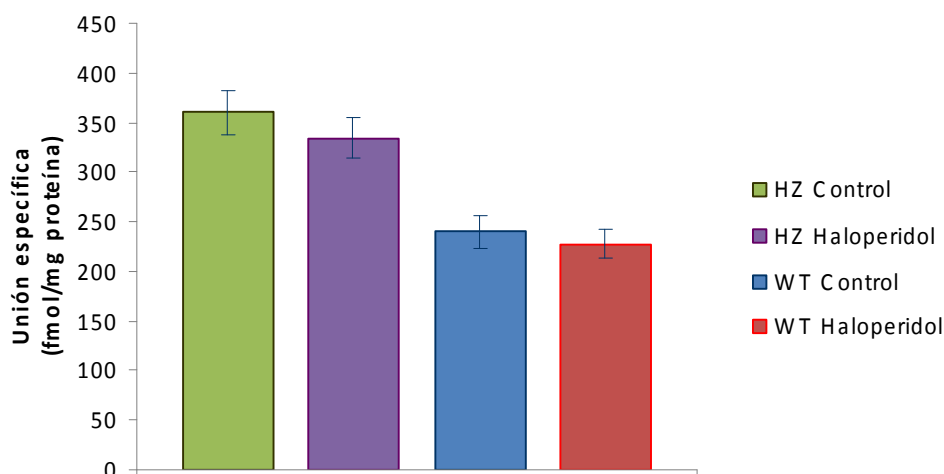


Figura 23: Densidad (B_{max}) en fmol/mg proteína del receptor D_2 de dopamina en membranas de estriado de los cuatro grupos de tratamiento. Se representa el valor de $B_{max} \pm eem$ de un experimento realizado con puntos por duplicado.

Ensayos de saturación de la unión a receptor 5-HT_{2A} en la corteza frontal

Los niveles de densidad y sensibilidad del receptor 5-HT_{2A} de serotonina se determinaron mediante ensayos de saturación utilizando el radioligando ³H-LSD en los cuatro grupos de tratamiento: ratones heterocigoto reeler (HZ) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10g), HZ tratados con haloperidol (0.2 mg/kg), ratones *wild type* (WT) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10 g) y WT tratados con haloperidol (0.2 mg/kg) (Figura 24 y 25) sin que se observasen diferencias significativas debidas al tratamiento. Los parámetros de unión (B_{max} y K_D) obtenidos para los cuatro grupos de tratamiento se muestran en la tabla 20.

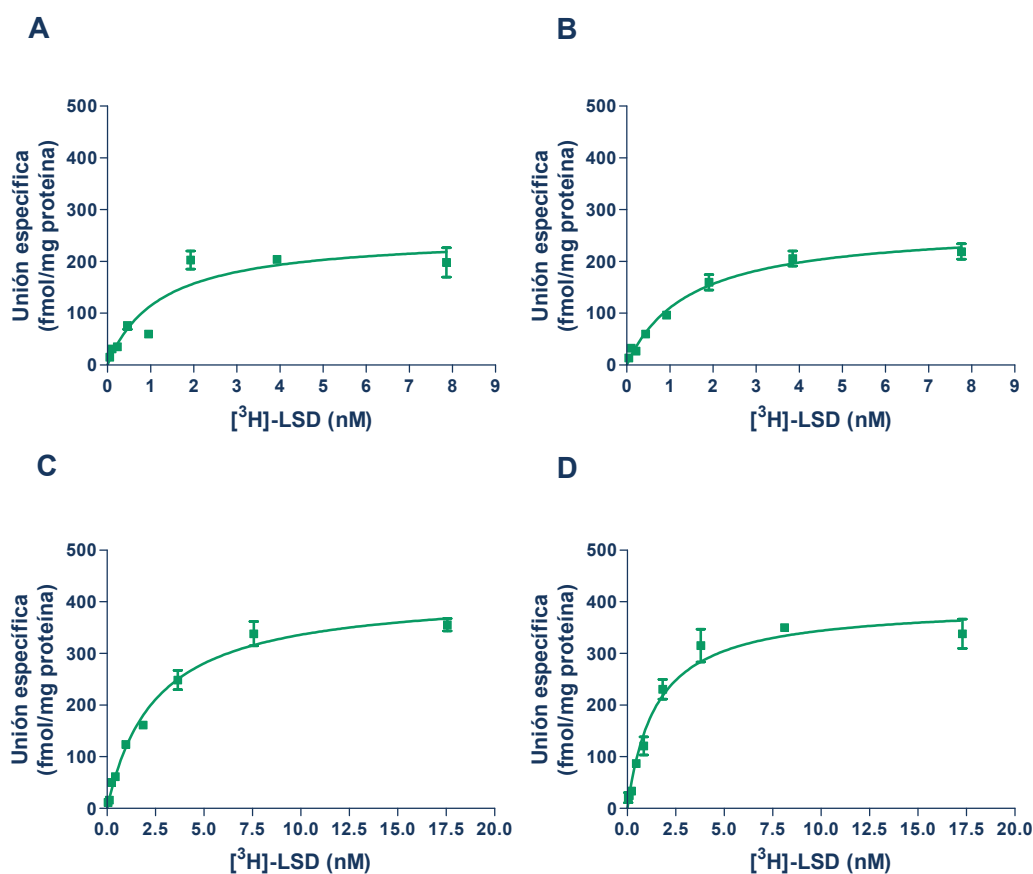


Figura 24: Curva de unión específica de [³H]-LSD en el receptor D₂ de dopamina en membranas de estriado de ratones heterocigoto reeler (HZ) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10g) (A), HZ tratados con haloperidol (0.2 mg/kg) (B), *wild type* (WT) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10 g) (C) y WT tratados con haloperidol (0.2 mg/kg) (D), utilizando sulpiride 10 μM como ligando para evaluar la unión inespecífica. Se muestra un experimento realizado con puntos por duplicado.

Tabla 20: Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [3H]-LSD en membranas de corteza frontal de los cuatro grupos de tratamiento. Se muestra el valor \pm eem de un experimento realizado con puntos por duplicado.

GRUPOS TRATAMIENTO	$B_{max} \pm eem$ (fmol/mg proteína)	$K_D \pm eem$ (nM)
HZ Control	251.8 \pm 29.63	1.21 \pm 0.42
HZ Haloperidol	269.2 \pm 14.30	1.44 \pm 0.22
WT Control	419.4 \pm 16.19	2.48 \pm 0.28
WT Haloperidol	395.1 \pm 20.70	1.48 \pm 0.25

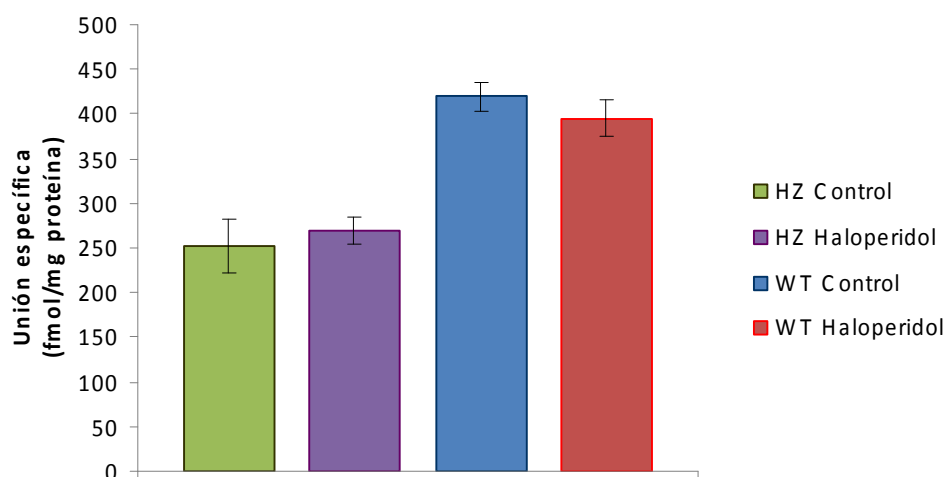


Figura 25: Densidad (B_{max}) en fmol/mg proteína del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en membranas de corteza frontal de los cuatro grupos de tratamiento. Se representa el valor de $B_{max} \pm eem$ de un experimento realizado con puntos por duplicado.

Tratamiento 15 días

En esta parte del trabajo estudiamos el efecto de un tratamiento intraperitoneal (i.p.) de 15 días con haloperidol (0.2 mg/kg) sobre la densidad y sensibilidad del receptor D₂ de dopamina en membranas de estriado y del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en membranas de corteza frontal.

Ensayos de saturación de la unión a receptor D₂ en el estriado

Los niveles de densidad y sensibilidad del receptor D₂ de dopamina se determinaron mediante ensayos de saturación utilizando el radioligando ³H-espiperona en los cuatro grupos de tratamiento: ratones heterocigoto reeler (HZ) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10g), HZ tratados con haloperidol (0.2 mg/kg), ratones *wild type* (WT) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10 g) y WT tratados con haloperidol (0.2 mg/kg) durante 15 días (Figura 26 y 27). Los parámetros de unión (B_{max} y K_D) obtenidos para los cuatro grupos de tratamiento se muestran en la tabla 21. El análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores para el valor de B_{max} reveló un efecto significativo del genotipo [F(1,7)=8.524, p<0.05], un efecto no significativo del tratamiento [F(1,7)=6.996, p=0.057] y una interacción significativa entre estos dos factores [F(1,7)=13.388, p<0.05]. El subsiguiente análisis estadístico mediante ANOVA de un factor para B_{max} entre los grupos reveló un efecto significativo del grupo [F(3,7)=9.636, p<0.05]. La prueba post hoc DMS mostró un incremento en la B_{max} en WT haloperidol y HZ control con respecto a WT control (p<0.05). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores para el valor de K_D no mostró un efecto significativo del genotipo [F(1,7)=0.000, p=0.998], ni del tratamiento [F(1,7)=0.456, p=0.536] aunque si de la interacción entre el genotipo y el tratamiento [F(1,7)=11.678, p<0.05]. El subsiguiente análisis mediante ANOVA de un factor no reveló diferencias significativas en los valores de K_D [F(3,7)=4.045, p=0.105] de ³H-espiperona en membranas de estriado de los cuatro grupos de tratamiento.

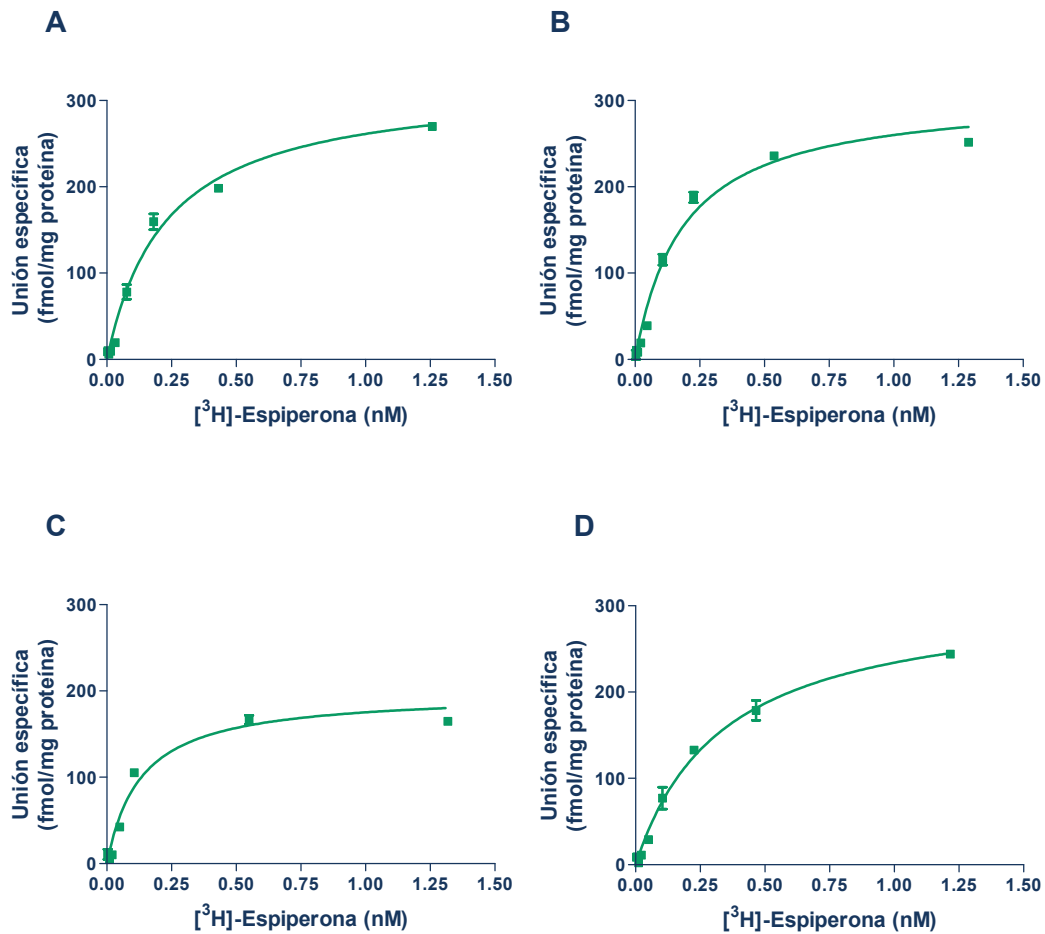


Figura 26: Curva de unión específica de [³H]-espiperona en el receptor D₂ de dopamina en membranas de estriado de ratones heterocigoto reeler (HZ) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10g) (A), HZ tratados con haloperidol (0.2 mg/kg) (B), *wild type* (WT) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10 g) (C) y WT tratados con haloperidol (0.2 mg/kg) (D) durante 15 días, utilizando sulpiride 10 μ M como ligando para evaluar la unión inespecífica. Se muestra un experimento representativo de un total de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Tabla 21: Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [3H]-espiperona en membranas de estriado de los cuatro grupos de tratamiento. Se muestra la media \pm eem de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

GRUPOS TRATAMIENTO	$B_{max} \pm eem$ (fmol/mg proteína)	$K_D \pm eem$ (nM)
HZ Control	352.6 \pm 31.4*	0.31 \pm 0.08
HZ Haloperidol	327.3 \pm 19.1	0.19 \pm 0.01
WT Control	188.45 \pm 9.65	0.16 \pm 0.03
WT Haloperidol	345.75 \pm 32.35*	0.34 \pm 0.00

*: $p < 0.05$ respecto a WT Control (ANOVA de un factor con DMS post hoc test).

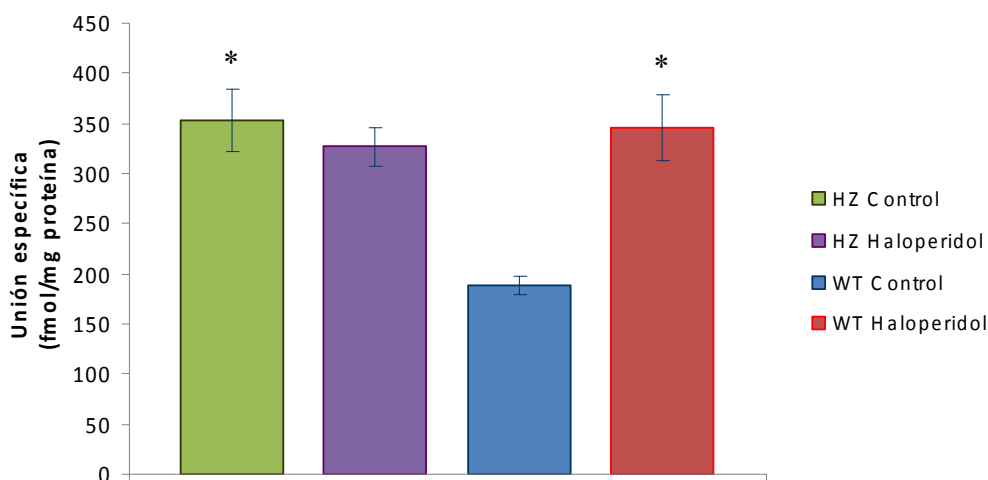


Figura 27: Densidad (B_{max}) en fmol/mg proteína del receptor D_2 de dopamina en membranas de estriado de los cuatro grupos de tratamiento. Se representa la media \pm eem de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado. *: $p < 0.05$ respecto a WT Control (ANOVA de un factor con DMS post hoc test).

Ensayos de saturación de la unión a receptor 5-HT_{2A} en la corteza frontal

Los niveles de densidad y sensibilidad del receptor 5-HT_{2A} de serotonina se determinaron mediante ensayos de saturación utilizando el radioligando ³H-LSD en los cuatro grupos de tratamiento: ratones heterocigoto reeler (HZ) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10g), HZ tratados con haloperidol (0.2 mg/kg), ratones *wild type* (WT) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10g) y WT tratados con haloperidol (0.2 mg/kg) durante 15 días (Figura 28 y 29). Los parámetros de unión (B_{max} y K_D) obtenidos para los cuatro grupos de tratamiento se muestran en la tabla 22. El análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores para el valor de B_{max} reveló un efecto significativo del genotipo [$F(1,12)=15.961$, $p<0.01$], un efecto no significativo del tratamiento [$F(1,12)=0.177$, $p=0.684$] y una interacción significativa entre el genotipo y el tratamiento [$F(1,12)=22.095$, $p<0.001$]. El subsiguiente análisis estadístico mediante ANOVA de un factor para B_{max} entre los grupos de tratamiento reveló un efecto significativo del grupo [$F(3,12)=11.978$, $p<0.01$]. La prueba post hoc DMS mostró una disminución de B_{max} en el grupo HZ control con respecto a WT control ($p<0.001$), una disminución del valor de B_{max} en WT haloperidol con respecto a WT control ($p<0.05$) y un aumento en HZ haloperidol con respecto a HZ control ($p<0.01$). El análisis estadístico mediante ANOVA de dos factores para el valor de K_D no reveló un efecto significativo del genotipo [$F(1,12)=4.621$, $p=0.060$], ni del tratamiento [$F(1,12)=0.481$, $p=0.505$] aunque si mostró un efecto significativo de la interacción entre estos dos factores [$F(1,12)=14.281$, $p<0.01$]. El subsiguiente análisis estadístico mediante ANOVA de un factor reveló un efecto significativo del grupo [$F(3,12)=6.079$, $p<0.05$] para el valor de K_D entre los cuatro grupos de tratamiento. La prueba post hoc DMS mostró una disminución de la K_D en el grupo HZ control con respecto a WT control ($p<0.01$), una disminución del valor de K_D en WT haloperidol con respecto a WT control ($p<0.05$) y un aumento en HZ haloperidol con respecto a HZ control ($p<0.05$).

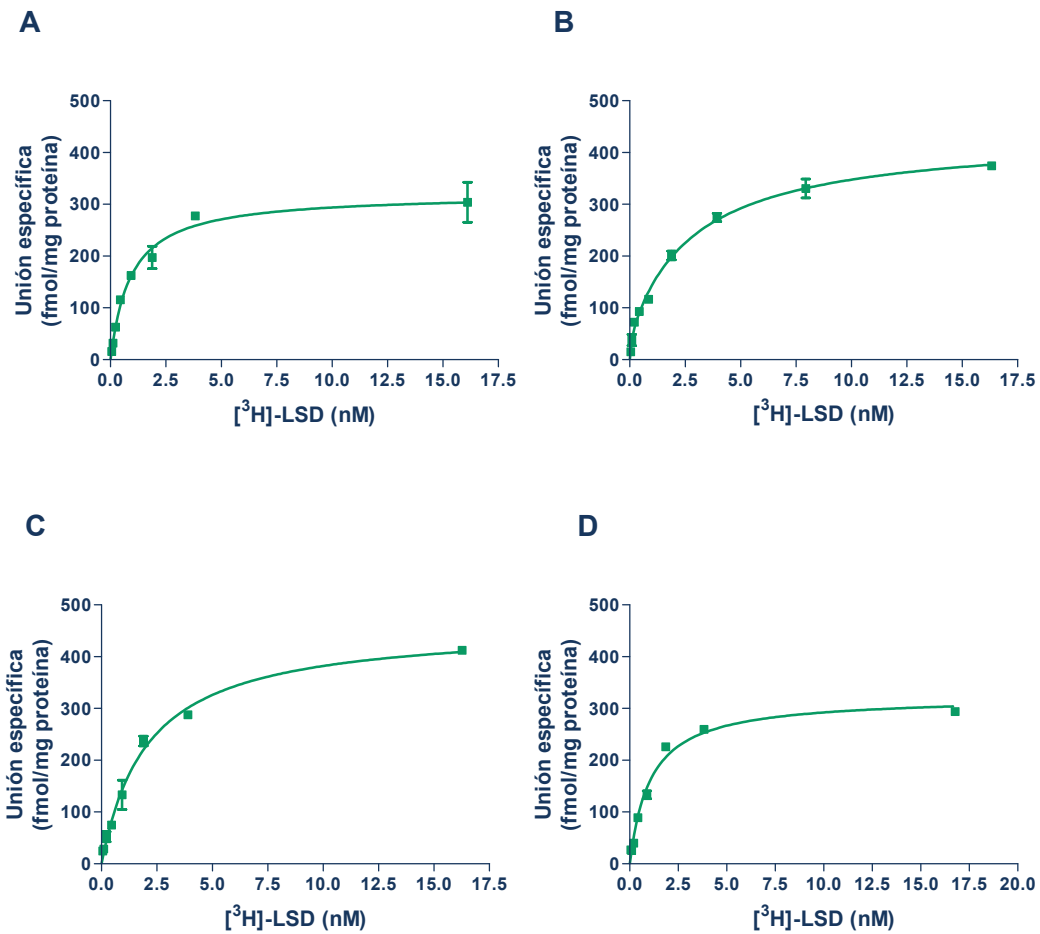


Figura 28: Curva de unión específica de [³H]-LSD en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina en membranas de corteza frontal de ratones heterocigoto reeler (HZ) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10 g) (A), HZ tratados con haloperidol (0.2 mg/kg) (B), *wild type* (WT) tratados con vehículo (salino 0.1 ml/10 g) (C) y WT tratados con haloperidol (0.2 mg/kg) (D) durante 15 días, utilizando mianserina 60 μM como ligando para evaluar la unión inespecífica. Se muestra un experimento representativo de un total de tres (n=3) (A, C y D) y cuatro (n=4) (B) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Tabla 22: Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [3H]-LSD en membranas de corteza frontal de los cuatro grupos de tratamiento. Se muestra la media \pm eem de tres (n=3) (HZ control, WT control y WT haloperidol) y cuatro (n=4) (HZ haloperidol) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

GRUPOS TRATAMIENTO	$B_{max} \pm eem$ (fmol/mg proteína)	$K_D \pm eem$ (nM)
HZ Control	280.47 \pm 20.53***	0.80 \pm 0.11**
HZ Haloperidol	397.6 \pm 14.60##	1.45 \pm 0.19#
WT Control	479.37 \pm 25.62	2.04 \pm 0.35
WT Haloperidol	381.47 \pm 31.74*	1.10 \pm 0.03*

***: p<0.001; **: p<0.01 y *: p<0.05 respecto a WT Control (ANOVA de un factor con DMS post hoc test). ##: p<0.01 y #: p<0.05 respecto a HZ Control (ANOVA de un factor con DMS post hoc test).

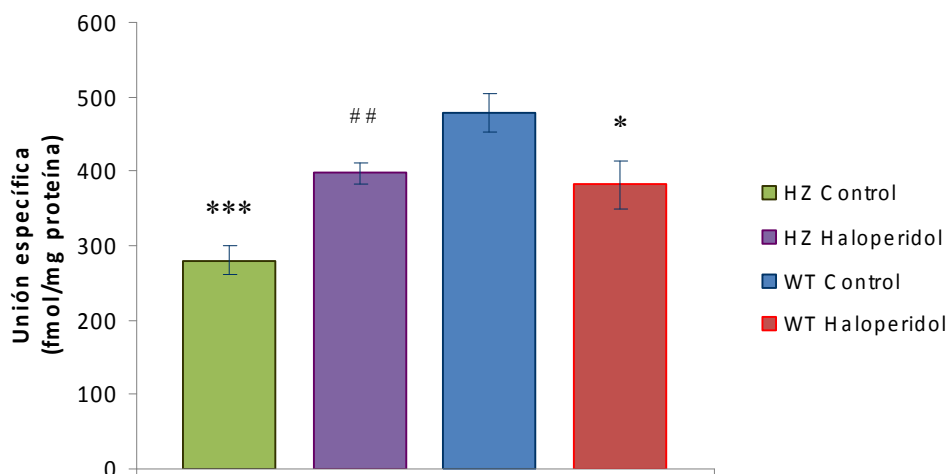


Figura 29: Densidad (B_{max}) en fmol/mg proteína del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en membranas de corteza frontal de los cuatro grupos de tratamiento. Se representa la media \pm eem de tres (n=3) (HZ control, WT control y WT haloperidol) y cuatro (n=4) (HZ haloperidol) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado. ***: p<0.001 y *: p<0.05 respecto a WT Control (ANOVA de un factor con DMS post hoc test). ##: p<0.01 respecto a HZ Control (ANOVA de un factor con DMS post hoc test).

IV. CARACTERIZACIÓN FARMACOLÓGICA DE LOS RECEPTORES D₂ Y 5-HT_{2A} EN SINAPTOSOMAS

El aislamiento de los sinaptosomas, sinapsis aisladas artificialmente, es una técnica útil para identificar y estudiar los receptores en los terminales sinápticos (Villasana y cols., 2006). En esta parte del trabajo, nos propusimos poner a punto la metodología necesaria para la caracterización de los receptores D₂ de dopamina y 5-HT_{2A} de serotonina en preparaciones de sinaptosomas de ratón Swiss.

Caracterización del receptor D₂ de dopamina en sinaptosomas

La caracterización farmacológica del receptor D₂ de dopamina en sinaptosomas se realizó mediante ensayos de saturación. En los ensayos de saturación con el radioligando [³H]-espiperona se obtuvo una curva compatible con un solo sitio de unión (Figura 30). Los parámetros de unión (B_{max} y K_D) de ³H-espiperona se muestran en la tabla 23.

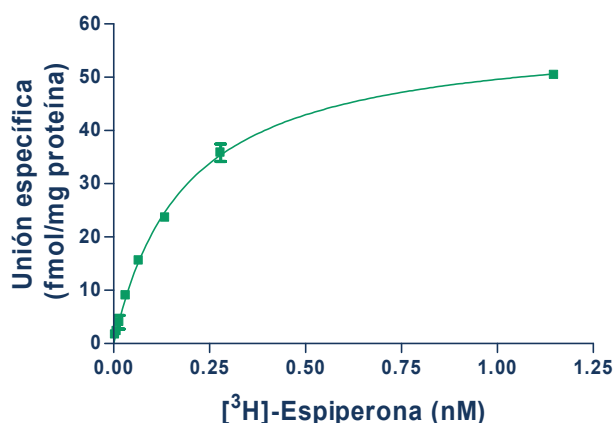


Figura 30: Curva de unión específica de [³H]-espiperona en el receptor D₂ de dopamina en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss utilizando sulpiride 10 μM como ligando para evaluar la unión inespecífica. Se muestra un experimento representativo de un total de dos experimentos independientes (n=2) realizados con puntos por duplicado.

Tabla 23: Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [3H]-espiperona en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss. Los valores representan la media \pm eem de dos experimentos independientes ($n=2$) realizados con puntos por duplicado.

$B_{max} \pm eem$ (fmol/mg proteína)	$K_D \pm eem$ (nM)
59.91 ± 1.19	0.23 ± 0.04

Caracterización del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en sinaptosomas

La caracterización farmacológica del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en sinaptosomas de ratón Swiss se realizó mediante ensayos de saturación.

Los ensayos de saturación se realizaron utilizando el radioligando [3H]-LSD y se obtuvo una curva compatible con un solo sitio de unión (Figura 31). Los parámetros de unión (B_{max} y K_D) de 3H -LSD se muestran en la tabla 24.

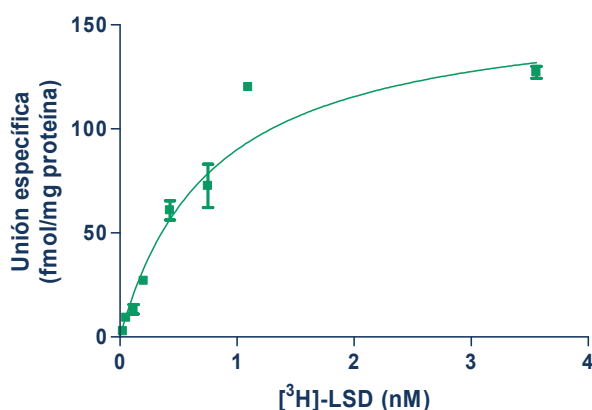


Figura 31: Curva de unión específica de [3H]-LSD en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss utilizando ketanserina 10 μ M como ligando para evaluar la unión inespecífica. Se muestra un experimento representativo de un total de dos experimentos independientes ($n=2$) realizados con puntos por duplicado.

Tabla 24: Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [3H]-LSD en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss. Los valores representan la media \pm eem de dos experimentos independientes (n=2) realizados con puntos por duplicado.

$B_{max} \pm eem$ (fmol/mg proteína)	$K_D \pm eem$ (nM)
176.95 \pm 15.85	1.04 \pm 0.25

Análisis comparativo de la expresión de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} en función de los niveles de reelina

El ratón heterocigoto reeler (HZ) al igual que los pacientes esquizofrénicos presenta una disminución de la densidad de espinas dendríticas (los principales lugares de contacto sináptico) (Liu y cols., 2001), lo cual hace que la caracterización de dos de los principales GPCRs implicados en el tratamiento y la farmacología de la esquizofrenia, el receptor D₂ de dopamina y el receptor 5-HT_{2A} de serotonina, en sinaptosomas de ratón reeler resulte de gran interés.

Microscopía electrónica de sinaptosomas de ratón reeler

La presencia de sinaptosomas en preparaciones obtenidas de cerebro total de ratón reeler se determinó mediante microscopía electrónica (Figura 32).

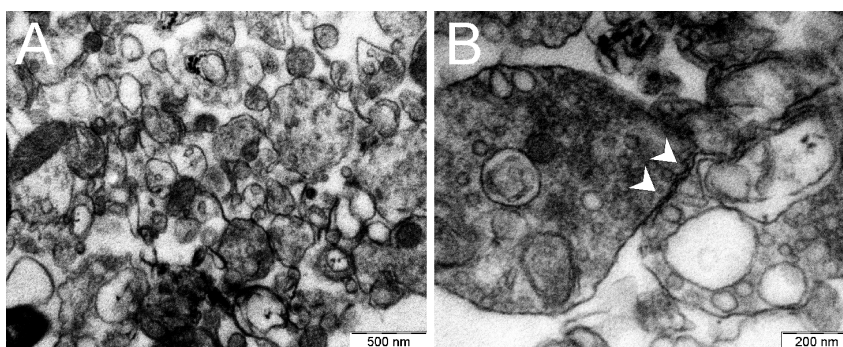


Figura 32: Microfotografías de sinaptosomas. A) Fotografía de preparación de sinaptosomas obtenidos de cerebro total de ratón reeler. B) Terminaciones presinápticas con vesículas y estructuras postsinápticas. Barras de calibrado: A 0.5 μ m, B 0.2 μ m.

Ensayos de unión de radioligandos en sinaptosomas de ratón reeler

En esta parte del trabajo nos propusimos estudiar si los niveles de reelina tenían un efecto en la densidad y sensibilidad de los receptores D₂ de dopamina y 5-HT_{2A} de serotonina en membranas de sinaptosomas.

Caracterización del receptor D₂ de dopamina en sinaptosomas

Con el objetivo de estudiar un posible efecto de los niveles de reelina en la densidad y sensibilidad del receptor D₂ de dopamina se realizaron ensayos de saturación con ³H-espiperona en sinaptosomas de cerebro total de ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y *wild type* (WT) (Figura 33 y 34). Los parámetros de unión (B_{max} y K_D) obtenidos para los distintos genotipos se muestran en la tabla 25. El análisis estadístico mediante ANOVA de un factor para B_{max} entre los genotipos reveló un efecto significativo del genotipo [F(2,7)=59.98, p<0.001]. La prueba post hoc DMS mostró una reducción en el valor de B_{max} en RL (p<0.001) y HZ (p<0.001) con respecto a WT y un descenso del valor de B_{max} en RL (p<0.05) con respecto a HZ. El análisis estadístico mediante ANOVA de un factor no reveló un efecto significativo del genotipo [F(2,7)=2.90, p=0.146] para el valor de K_D entre los tres genotipos.

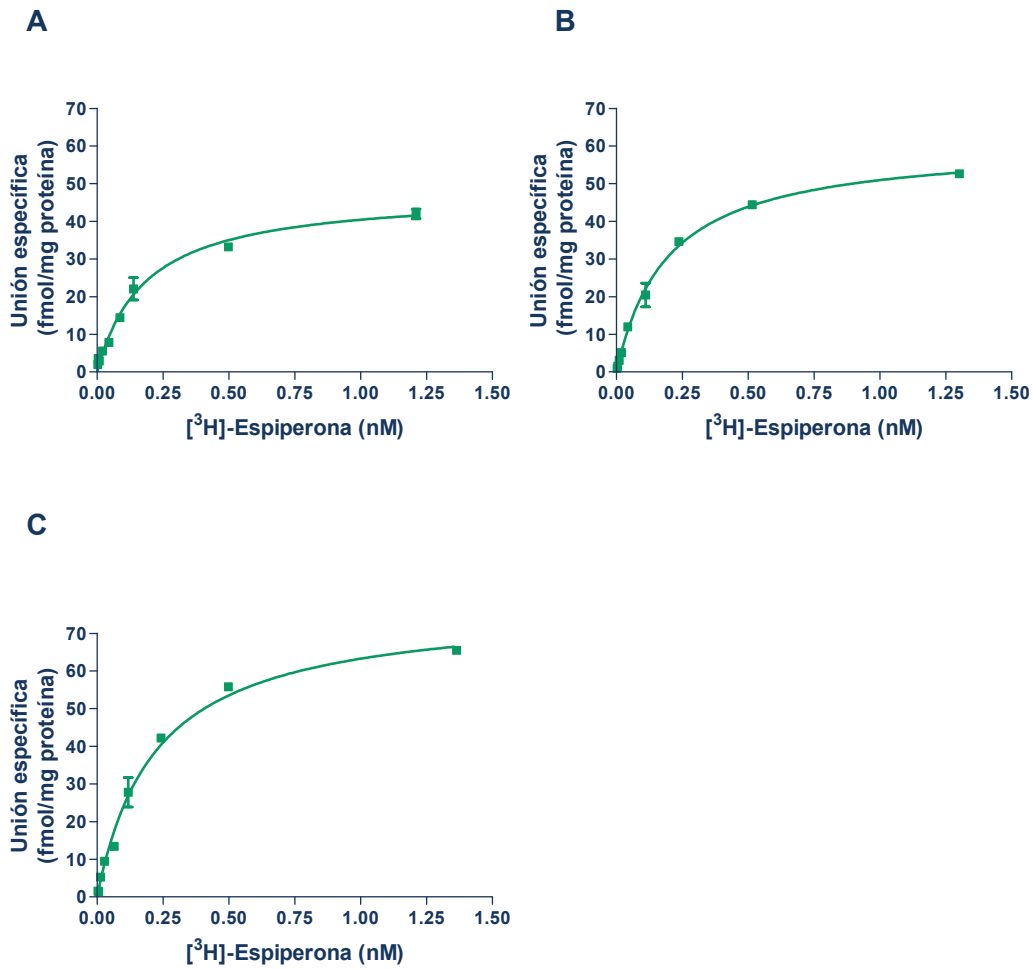


Figura 33: Curva de unión específica de [³H]-espiperona en el receptor D₂ de dopamina en membranas de sinaptosomas de ratón homocigoto reeler (RL) (A), heterocigoto (HZ) (B) y *wild type* (WT) (C) utilizando sulpiride 10 μM como ligando para evaluar la unión inespecífica. Se muestra un experimento representativo de un total de dos (n=2) (A) y tres (n=3) (B,C) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Tabla 25: Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [3H]-espiperona en sinaptosomas de ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y *wild type* (WT). Se muestra la media \pm eem de dos (n=2) (RL) y tres (n=3) (HZ,WT) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

GENOTIPO	$B_{max} \pm eem$ (fmol/mg proteína)	$K_D \pm eem$ (nM)
Homocigoto reeler (RL)	50.18 \pm 2.37 ***;#	0.17 \pm 0.01
Heterocigoto reeler (HZ)	58.75 \pm 1.51 ***	0.17 \pm 0.02
<i>Wild type</i> (WT)	79.33 \pm 2.00	0.24 \pm 0.02

***: $p < 0.001$ respecto a WT (ANOVA de un factor con DMS post hoc test); #: $p < 0.05$ respecto a HZ (ANOVA de un factor con DMS post hoc test).

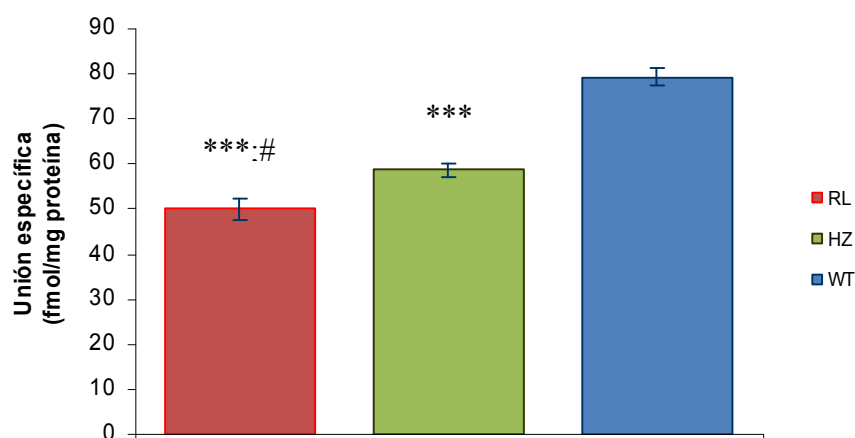


Figura 34: Densidad (B_{max}) en fmol/mg proteína del receptor D₂ de dopamina en sinaptosomas de ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y *wild type* (WT). Se representa la media \pm eem de dos (n=2) (RL) y tres (n=3) (HZ, WT) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado. ***: $p < 0.001$ respecto a WT (ANOVA de un factor con DMS post hoc test); #: $p < 0.05$ respecto a HZ (ANOVA de un factor con DMS post hoc test).

Caracterización del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en sinaptosomas

Dado que se acepta que los agonistas se unen preferentemente a los estados de alta afinidad del receptor (complejo receptor acoplado a proteína G), mientras que los antagonistas se unen a los estados de alta y baja afinidad del receptor (receptor no acoplado a proteína G) con igual afinidad (Egan y cols., 2000), en esta parte del trabajo realizamos la caracterización del receptor 5-HT_{2A} de serotonina mediante ensayos de saturación utilizando dos radioligandos distintos, un antagonista ³H-ketanserina y un agonista ³H-LSD, en sinaptosomas de cerebro total de ratón reeler.

Con el objetivo de estudiar una posible relación entre los niveles de reelina de los animales y la densidad y sensibilidad del receptor 5-HT_{2A} de serotonina se realizaron ensayos de saturación con ³H-ketanserina en sinaptosomas de cerebro total de ratón heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT) (Figura 35). Los parámetros de unión (B_{max} y K_D) de ³H-ketanserina se muestran en la tabla 26. El análisis estadístico mediante ANOVA de un factor reveló una disminución significativa [$F(1,4)=14.815$, $p<0.05$] de la K_D de ³H-ketanserina por el receptor 5-HT_{2A} de serotonina en sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ) con respecto a *wild type* (WT), sin observarse diferencias significativas en la densidad (B_{max}) [$F(1,4)=2.093$, $p=0.244$] de los receptores 5-HT_{2A} entre los dos genotipos.

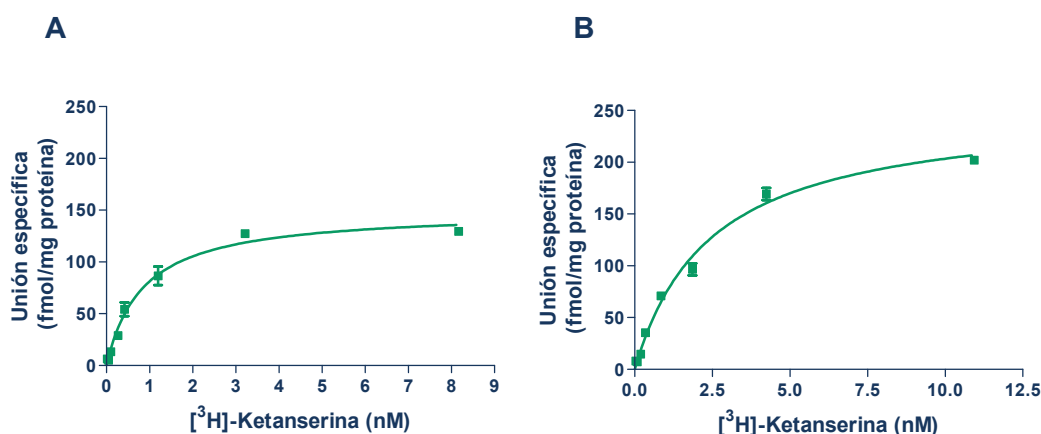


Figura 35: Curva de unión específica de [³H]-ketanserina en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ) (A) y *wild type* (WT) (B) utilizando mianserina 60 μ M como ligando para evaluar la unión inespecífica. Se muestra un experimento representativo de un total de dos ($n=2$) (A) y tres ($n=3$) (B) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Tabla 26: Parámetros de unión (B_{max} y K_D) de [3H]-ketanserina en sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT). Se muestra la media \pm eem de dos (n=2) (HZ) y tres (n=3) (WT) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

GENOTIPO	$B_{max} \pm eem$ (fmol/mg proteína)	$K_D \pm eem$ (nM)
Heterocigoto reeler (HZ)	166 \pm 16.2	1.08 \pm 0.24 *
<i>Wild type</i> (WT)	227.4 \pm 31.51	2.15 \pm 0.16

*: $p < 0.05$ respecto a WT (ANOVA de un factor con DMS post hoc test).

Posteriormente, se estudió si el nivel de reelina ejercía un efecto en el nivel de expresión de los estados de afinidad del receptor 5-HT_{2A} de serotonina marcados por el agonista (alta afinidad). Para ello se realizaron ensayos de saturación con el radioligando agonista ³H-LSD en membranas de sinaptosomas de cerebro total de ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y *wild type* (WT) (Figura 36 y 37). Los parámetros de unión (B_{max} y K_D) se muestran en la tabla 27. El análisis estadístico mediante ANOVA de un factor para B_{max} entre los distintos genotipos de ratón estudiados reveló un efecto significativo del genotipo [$F(2,5)=117,905$, $p < 0.01$]. La prueba post hoc DMS mostró una reducción en el valor de B_{max} en RL ($p < 0.001$) y HZ ($p < 0.01$) con respecto a WT y un descenso del valor de B_{max} en RL ($p < 0.01$) con respecto a HZ. El análisis estadístico mediante ANOVA de un factor no reveló un efecto significativo del genotipo [$F(2,5)=1.462$, $p=0.360$] para el valor de K_D .

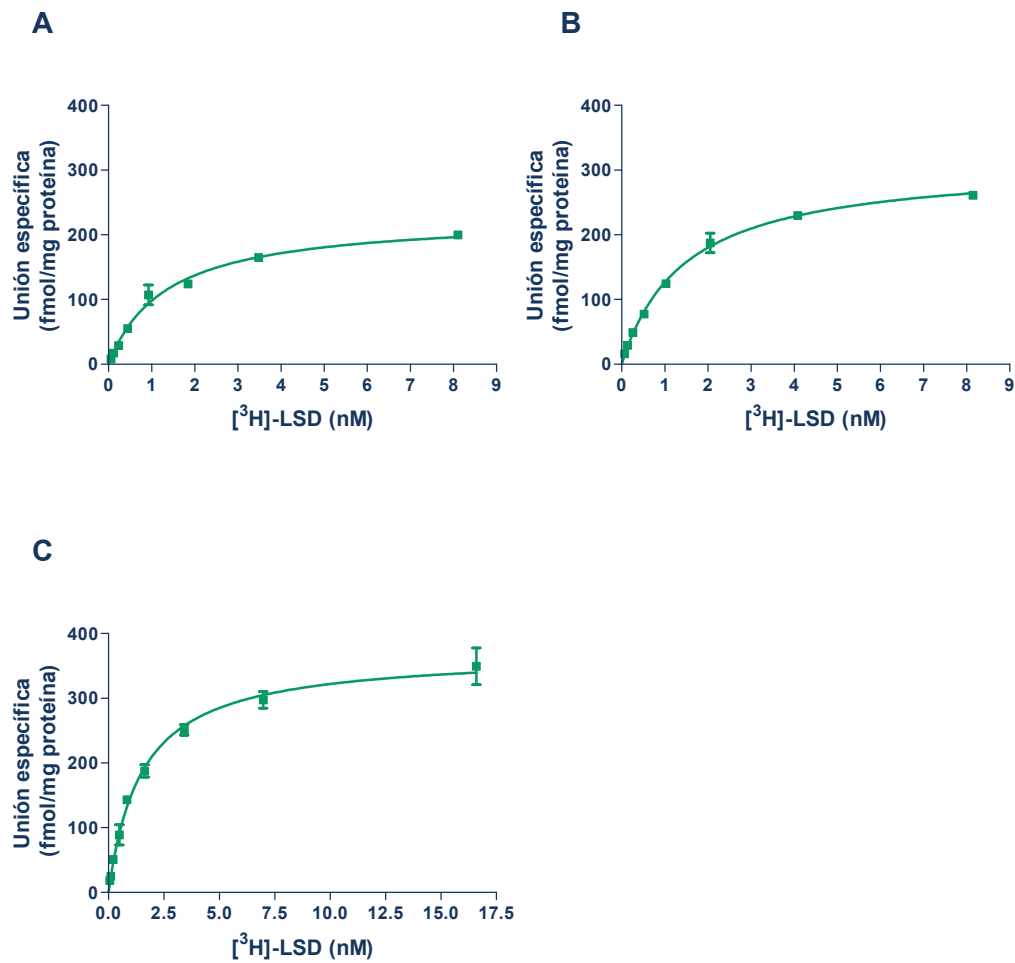


Figura 36: Curva de unión específica de [³H]-LSD en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón homocigoto reeler (RL) (A), heterocigoto (HZ) (B) y *wild type* (WT) (C) utilizando mianserina 60 μM como ligando para evaluar la unión inespecífica. Se muestra un experimento representativo de un total de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Tabla 27: Parámetros de unión (B_{\max} y K_D) de [^3H]-LSD en sinaptosomas de ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y *wild type* (WT). Se muestra la media \pm eem de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

GENOTIPO	$B_{\max} \pm \text{eem}$ (fmol/mg proteína)	$K_D \pm \text{eem}$ (nM)
Homocigoto reeler (RL)	232.0 \pm 3.3 ^{***,##}	1.12 \pm 0.20
Heterocigoto reeler (HZ)	312.35 \pm 0.85 ^{**}	1.29 \pm 0.17
<i>Wild type</i> (WT)	381.65 \pm 11.45	1.50 \pm 0.002

^{***}: p<0.001 y ^{**}: p<0.01 respecto a WT (ANOVA de un factor con DMS post hoc test). ^{##}: p<0.01 respecto a HZ (ANOVA de un factor con DMS post hoc test).

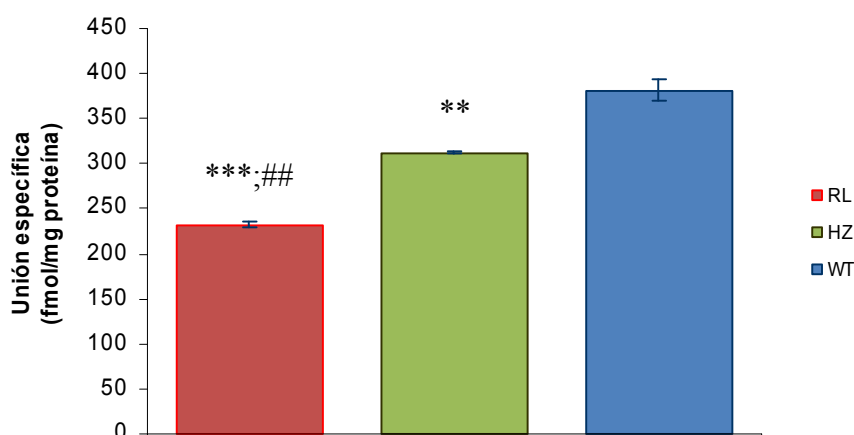


Figura 37: Densidad (B_{\max}) en fmol/mg proteína del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en sinaptosomas de ratón homocigoto reeler (RL), heterocigoto (HZ) y *wild type* (WT). Se representa la media \pm eem de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado. ^{***}: p<0.001 y ^{**}: p<0.01 respecto a WT (ANOVA de un factor con DMS post hoc test). ^{##}: p<0.01 respecto a HZ (ANOVA de un factor con DMS post hoc test).

V. ESTUDIO DE LAS CARACTERÍSTICAS CONFORMACIONALES DE LOS RECEPTORES D₂ Y 5-HT_{2A} EN SINAPTOSOMAS

Tal y como se comentó en la introducción los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) son capaces de adoptar múltiples estados conformacionales que existen en un equilibrio dinámico. Los ligandos estabilizan distintos estados conformacionales de estos GPCRs posibilitando una regulación diferencial de las distintas vías de señalización (Kenakin y Miller, 2010).

Estudios en sinaptosomas de ratón Swiss

En esta parte del trabajo nos propusimos poner a punto la metodología necesaria para la caracterización conformacional del receptor D₂ de dopamina y 5-HT_{2A} de serotonina en sinaptosomas de ratón Swiss.

Caracterización conformacional del receptor D₂ de dopamina en sinaptosomas

La caracterización conformacional del receptor D₂ de dopamina en sinaptosomas de ratón Swiss se realizó mediante ensayos de competición por la unión frente a [³H]-espiperona. Se evaluó la afinidad por los receptores D₂ de dopamina de los fármacos (haloperidol, clozapina y risperidona) y de distintas herramientas farmacológicas sintetizadas por el grupo de los Dres. Raviña y Masaguer del departamento de Química Orgánica de la Universidad de Santiago de Compostela (QF1004B, QF0108B y QF0703B).

Todos los compuestos estudiados presentan un perfil de competición monofásico, indicativo de que reconocen una única conformación del receptor en nuestro sistema (Figura 38 y 39). Los parámetros de afinidad (K_i y pK_i) de los compuestos estudiados se muestran en la tabla 28.

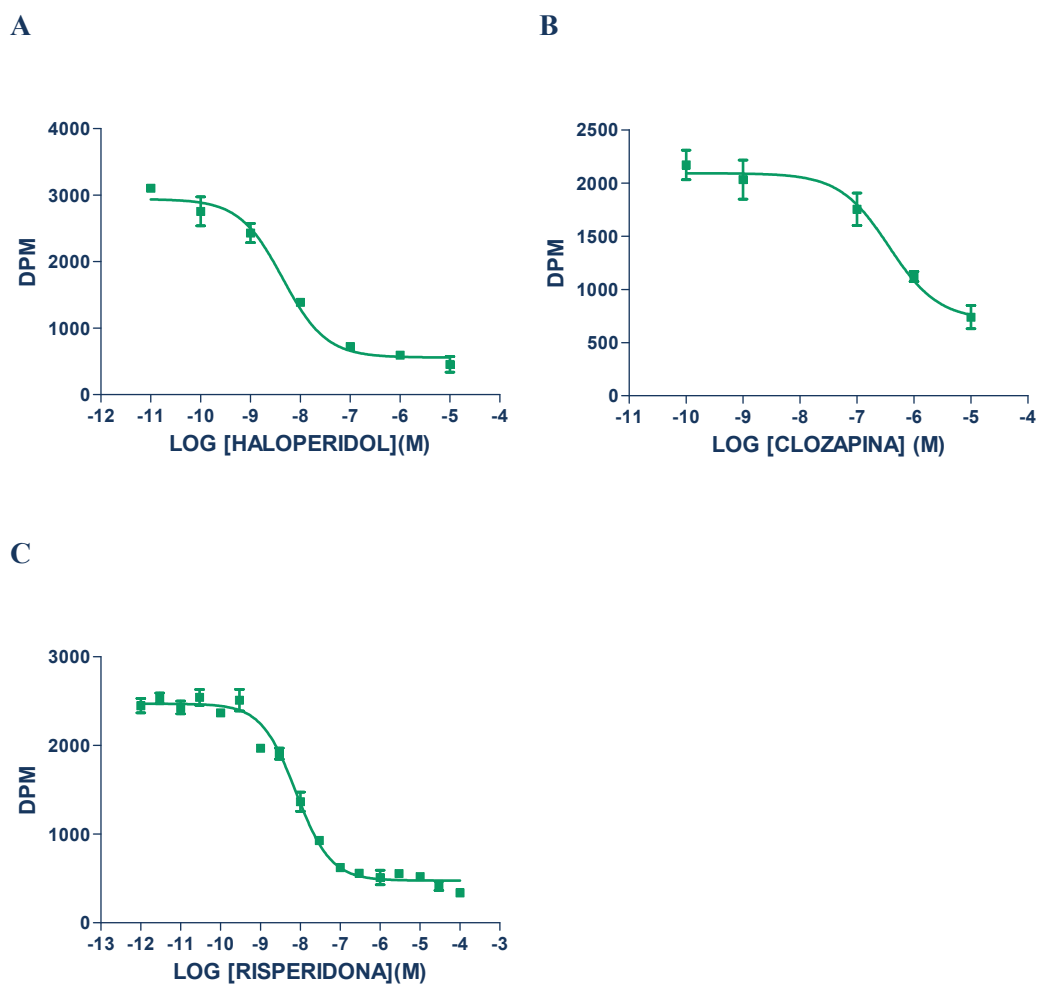


Figura 38: Curva de competición de los compuestos: A) Haloperidol, B) Clozapina, C) Risperidona frente a [³H]-espiperona en el receptor D₂ de dopamina en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss. Se muestra un experimento representativo de un total de dos (n=2) (B,C) y tres (n=3) (A) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

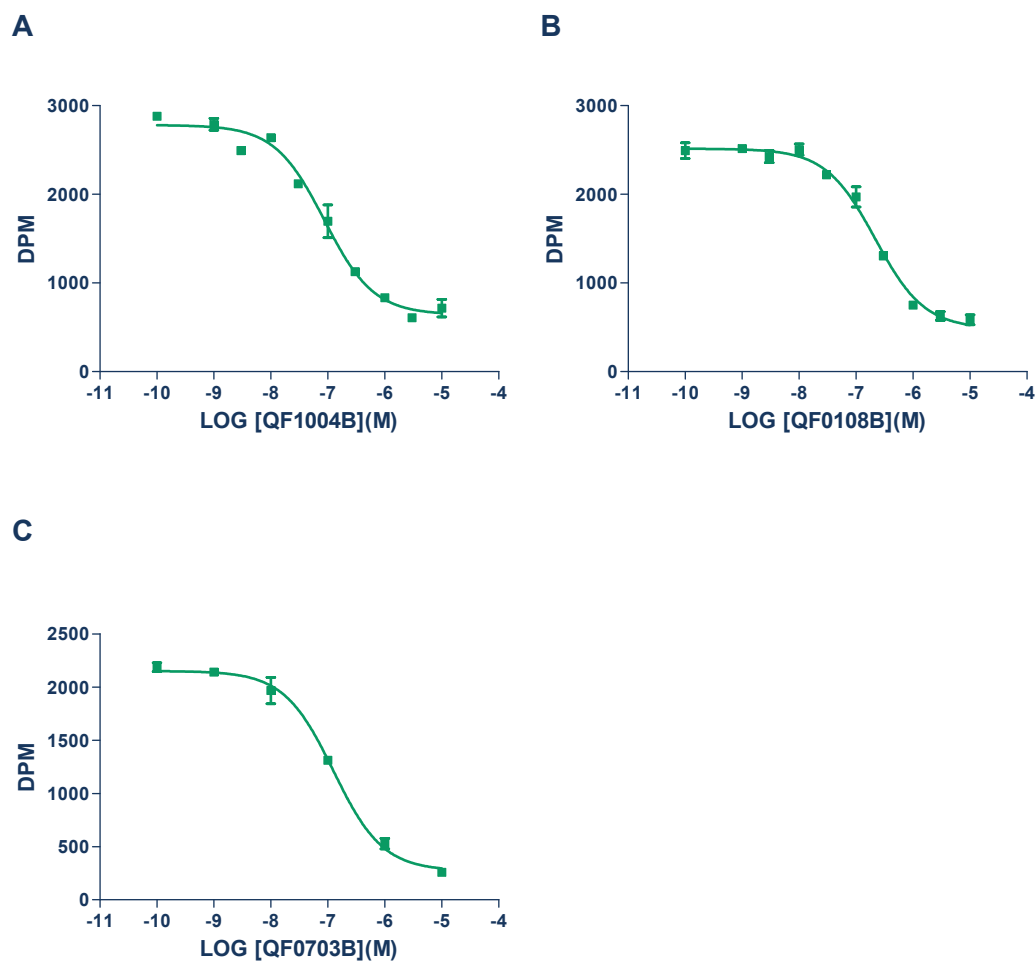


Figura 39: Curva de competición de los compuestos: A) QF1004B, B) QF0108B, C) QF0703B frente a [³H]-espiperona en el receptor D₂ de dopamina en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss. Se muestra un experimento representativo de un total de tres experimentos independientes (n=3) con puntos por duplicado.

Tabla 28: Afinidad (K_i y pK_i) por el receptor D_2 de dopamina de sinaptosomas de ratón Swiss marcado con [3H]-espiperona de los compuestos estudiados. Se muestra la media \pm eem de dos a tres ($n=2-3$) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

COMPUESTO	K_i (nM)	pK_i
Haloperidol	3.36 \pm 0.26	8.48 \pm 0.03
Clozapina	242.88 \pm 1.36	6.61 \pm 0.00
Risperidona	4.44 \pm 0.43	8.35 \pm 0.04
QF1004B	50.40 \pm 3.13	7.30 \pm 0.03
QF0108B	173.54 \pm 31.00	6.77 \pm 0.07
QF0703B	74.73 \pm 9.89	7.14 \pm 0.06

Caracterización conformacional del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en sinaptosomas

La caracterización conformacional del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en sinaptosomas de ratón Swiss se realizó mediante ensayos de competición por la unión frente a [3H]-LSD. Se evaluó la afinidad por los receptores 5-HT_{2A} de los fármacos (haloperidol, clozapina y ketanserina) y de distintas herramientas farmacológicas sintetizadas por el grupo del Dr Raviña y el Dr Masaguer (QF1004B, QF0108B y QF2004B).

Los compuestos haloperidol, clozapina, QF1004B y QF2004B presentan un perfil de competición monofásico, indicativo de que reconocen una única conformación del receptor 5-HT_{2A} en nuestro sistema, mientras que los compuestos ketanserina y QF0108B presentan un perfil de competición bifásico indicativo de que reconocen dos conformaciones del receptor. (Figura 40 y 41). Los parámetros de afinidad (K_i y pK_i) de los compuestos estudiados se muestran en la tabla 29.

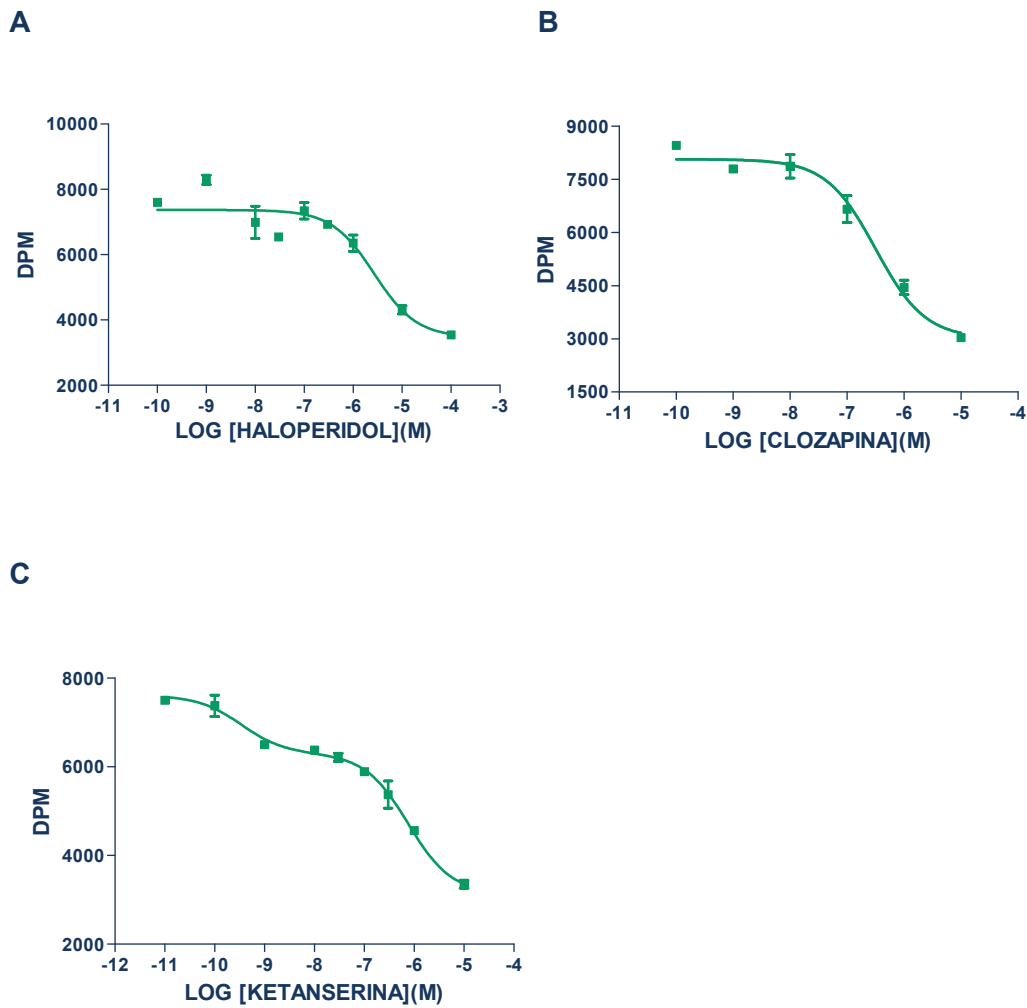


Figura 40: Curva de competición de los compuestos: A) Haloperidol, B) Clozapina, C) Ketanserina frente a [³H]-LSD en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss. Se muestra un experimento representativo de un total de dos (n=2) (A,C), tres (n=3) (B) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

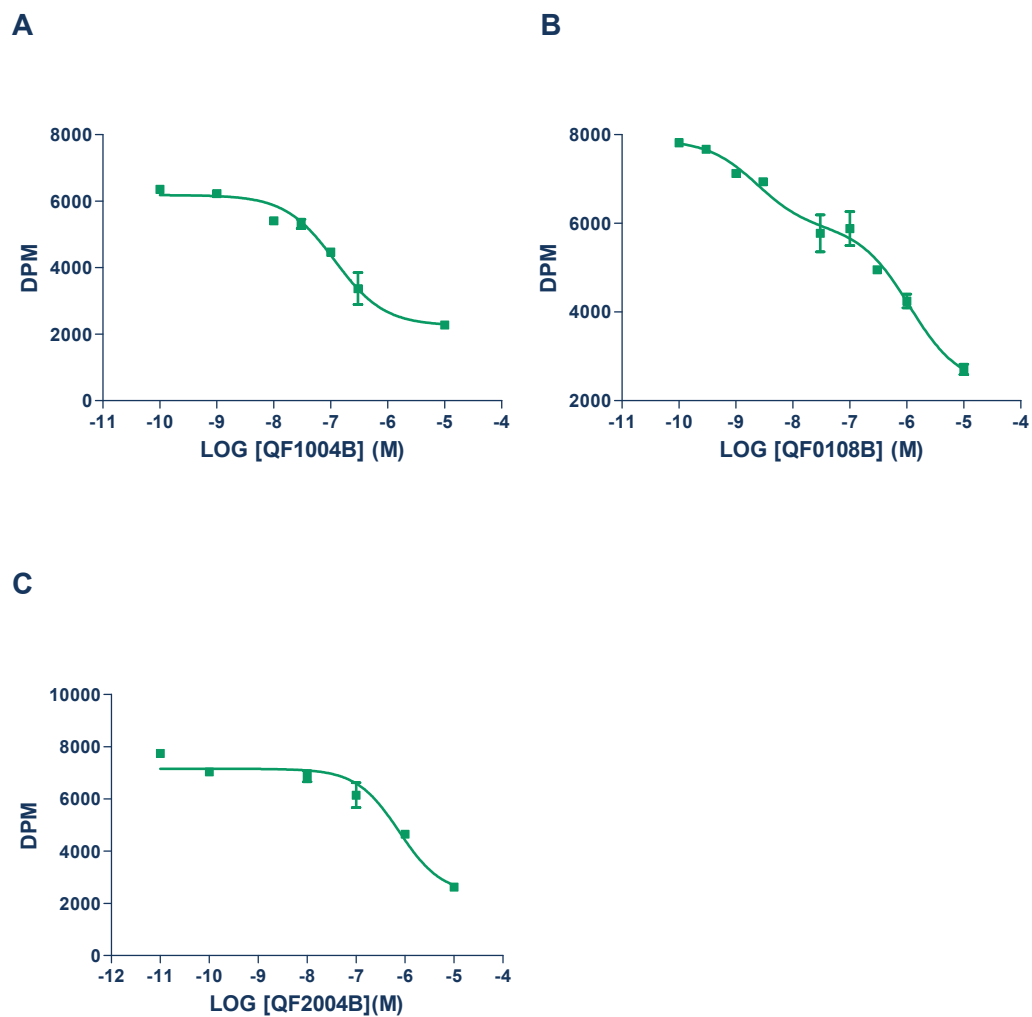


Figura 41: Curva de competición de los compuestos: A) QF1004B, B) QF0108B, C) QF2004B frente a [³H]-LSD en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón Swiss. Se muestra un experimento representativo de un total de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Tabla 29: Afinidad (K_i y pK_i) por el receptor 5-HT_{2A} de serotonina de sinaptosomas de ratón Swiss marcado con [³H]-LSD de los compuestos estudiados. Se muestra la media \pm eem de dos a tres (n=2-3) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

COMPUESTO	K_i alta (nM)	pK_i (alta afinidad)	K_i baja (nM)	pK_i (baja afinidad)
Haloperidol			1055.5 \pm 2.50	5.98 \pm 0.00
Clozapina			113.03 \pm 4.93	6.95 \pm 0.02
Ketanserina	0.08 \pm 0.07	10.43 \pm 0.59	257.85 \pm 62.05	6.60 \pm 0.11
QF1004B			30.86 \pm 21.07	7.65 \pm 0.36
QF0108B	0.54 \pm 0.41	9.45 \pm 0.43	360.0 \pm 99.4	6.46 \pm 0.12
QF2004B			273.25 \pm 1.35	6.56 \pm 0.00

Estudios en sinaptosomas de ratón reeler

En esta parte del trabajo nos propusimos estudiar si los niveles de reelina en los ratones influían en el perfil de las curvas de competición lo que resulta indicativo de la expresión conformacional de los receptores.

Caracterización conformacional del receptor D₂ de dopamina en sinaptosomas

La posible influencia de los niveles de reelina en la afinidad de los fármacos antipsicóticos por el receptor D₂ de dopamina se analizó mediante ensayos de competición con ³H-espiperona en sinaptosomas de cerebro total de ratón heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT) con un antipsicótico típico (haloperidol) y dos atípicos (clozapina y risperidona). Los compuestos presentaron un perfil de competición monofásico, tanto en ratón heterocigoto reeler (HZ) como en *wild type* (WT) (Figura 42 y 43). El análisis estadístico mediante ANOVA de un factor no mostró diferencias significativas en el parámetro de afinidad (K_i) del haloperidol y la clozapina pero si en el de la risperidona [F(1,3)=430.809, p<0.01] (Tabla 30) entre los dos genotipos.

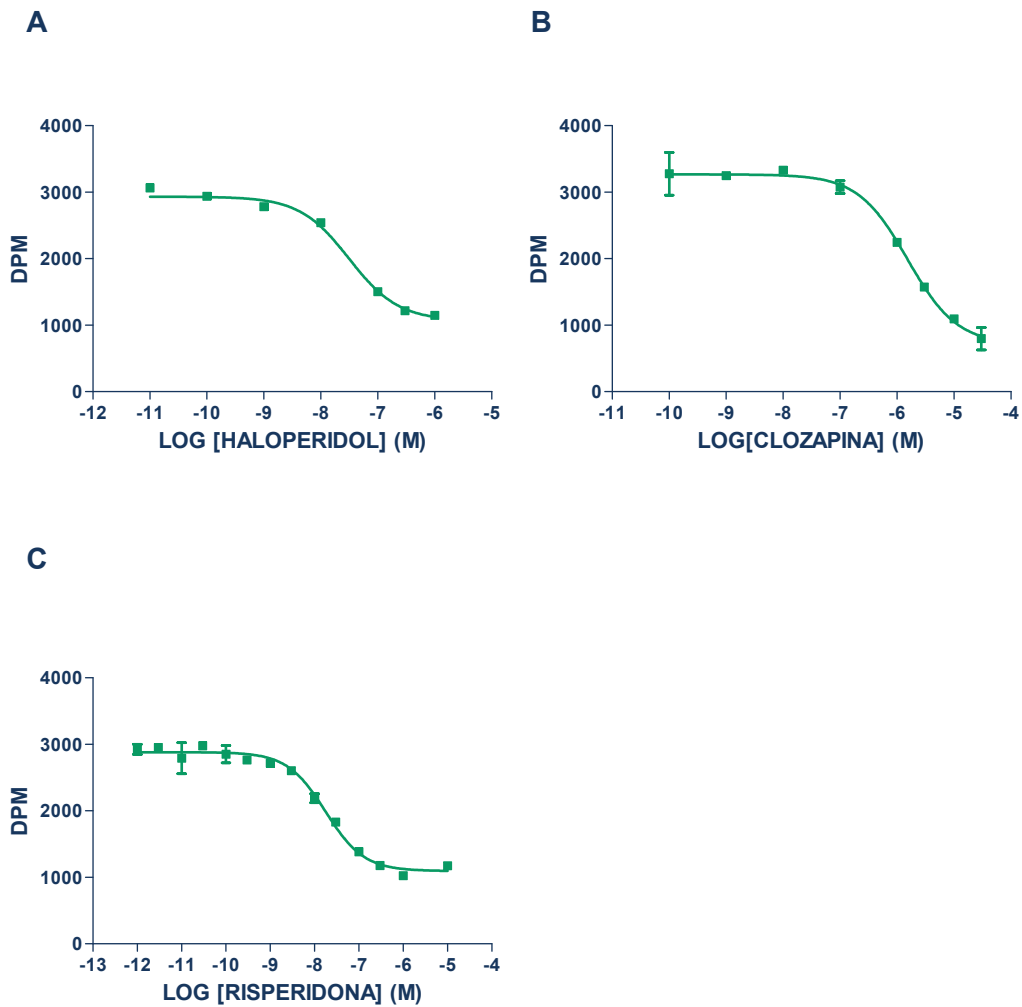


Figura 42: Curva de competición de los compuestos: A) Haloperidol, B) Clozapina, C) Risperidona frente a [³H]-espiperona en el receptor D₂ de dopamina en membranas de sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ). Se muestra un experimento representativo de un total de dos (n=2) (A y C) y tres (n=3) (B) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

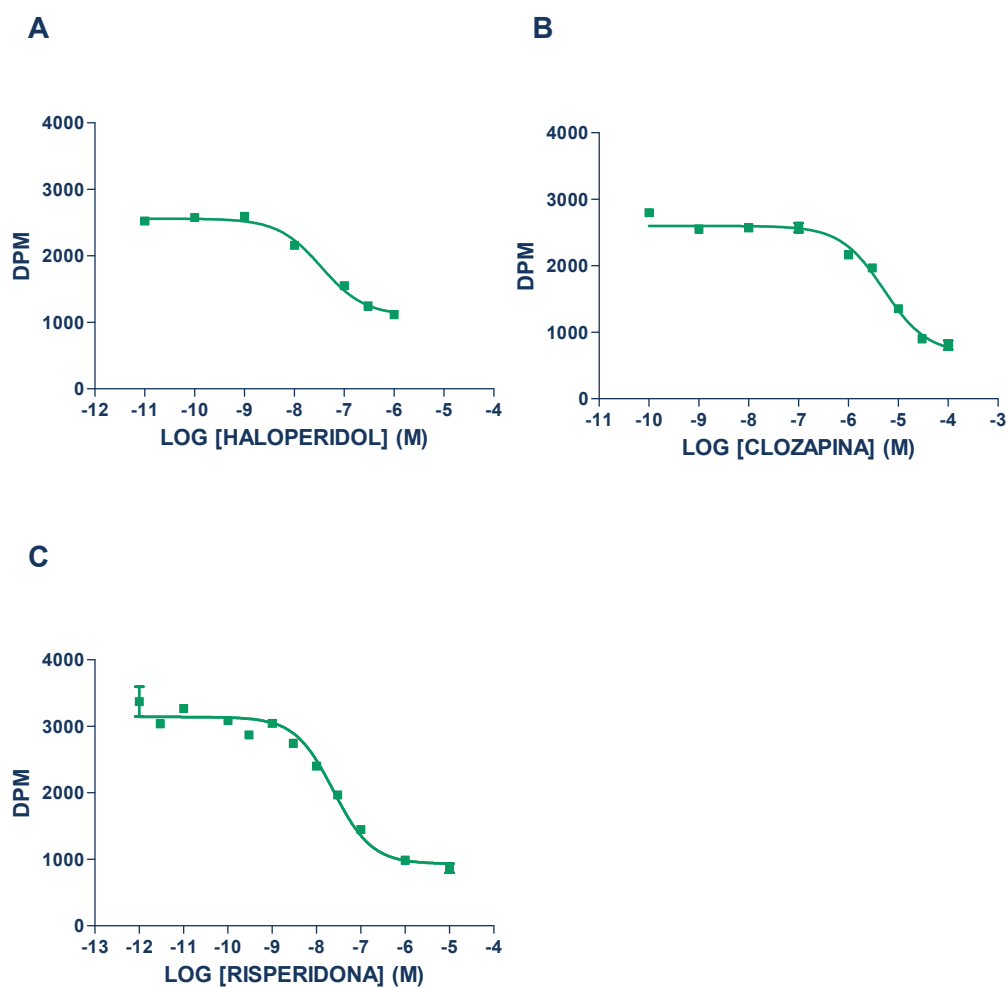


Figura 43: Curva de competición de los compuestos: A) Haloperidol, B) Clozapina, C) Risperidona frente a [³H]-espiperona en el receptor D₂ de dopamina en membranas de sinaptosomas de ratón *wild type* (WT). Se muestra un experimento representativo de un total de dos (n=2) (C), tres (n=3) (A) y cinco (n=5) (B) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Tabla 30: Afinidad (K_i y pK_i) por el receptor D_2 de dopamina de sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT) con [3H]-espiperona de los compuestos estudiados. Se muestra la media \pm eem de dos a cinco (n=2-5) experimentos independientes con puntos por duplicado.

COMPUESTO	Heterocigoto reeler (HZ)		<i>Wild type</i> (WT)	
	K_i (nM)	pK_i	K_i (nM)	pK_i
Haloperidol	8.85 \pm 2.01	8.06 \pm 0.10	11.1 \pm 1.49	7.96 \pm 0.06
Clozapina	1254.08 \pm 390.22	5.95 \pm 0.15	1777.9 \pm 202.89	5.76 \pm 0.05
Risperidona	5.97 \pm 0.14**	8.22 \pm 0.01	9.35 \pm 0.08	8.03 \pm 0.00

** : $p < 0.01$ respecto a WT (ANOVA de un factor).

Caracterización conformacional del receptor 5-HT_{2A} de serotonina en sinaptosomas

En esta parte del trabajo se realizaron las curvas concentración-respuesta de un antipsicótico típico (haloperidol) y dos atípicos (clozapina y risperidona) en sinaptosomas de cerebro total de ratón heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT) mediante estudios de competición frente al radioligando agonista 3H -LSD. Mediante estos estudios se observó que la competición con el haloperidol y la risperidona se ajustó a un perfil de competición bifásico mientras que la clozapina presentó un perfil de competición monofásico (Figura 44 y 45). El análisis estadístico mediante ANOVA de un factor no reveló diferencias significativas en el parámetro de afinidad (K_i) del haloperidol y la clozapina, aunque si reveló diferencias significativas en el parámetro de alta afinidad de la risperidona ($K_{i\text{ alta}}$) [$F(1,3)=18.033$, $p < 0.05$] (Tabla 31 y 32) entre los dos genotipos.

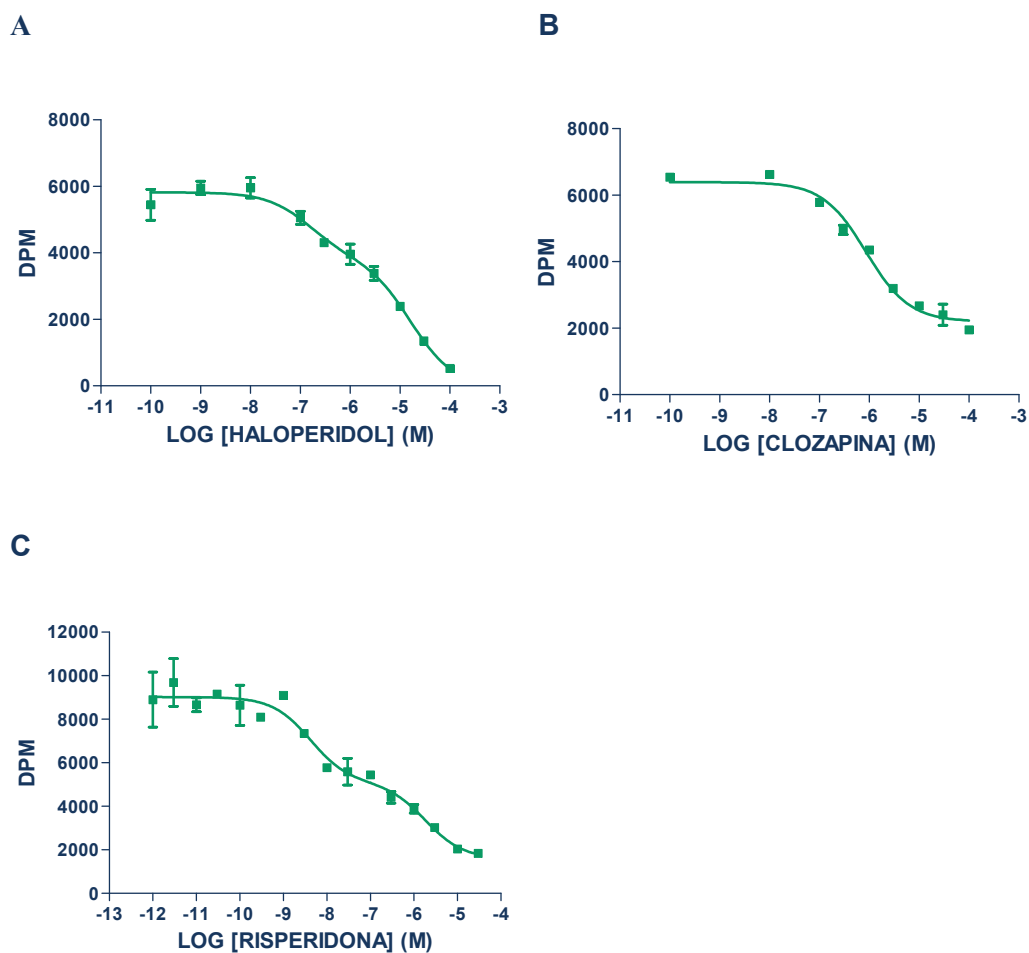


Figura 44: Curva de competición de los compuestos: A) Haloperidol, B) Clozapina, C) Risperidona frente a [3 H]-LSD en el receptor 5-HT $_2A$ de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ). Se muestra un experimento representativo de un total de dos (n=2) (C) y tres experimentos independientes (n=3) (A y B) realizados con puntos por duplicado.

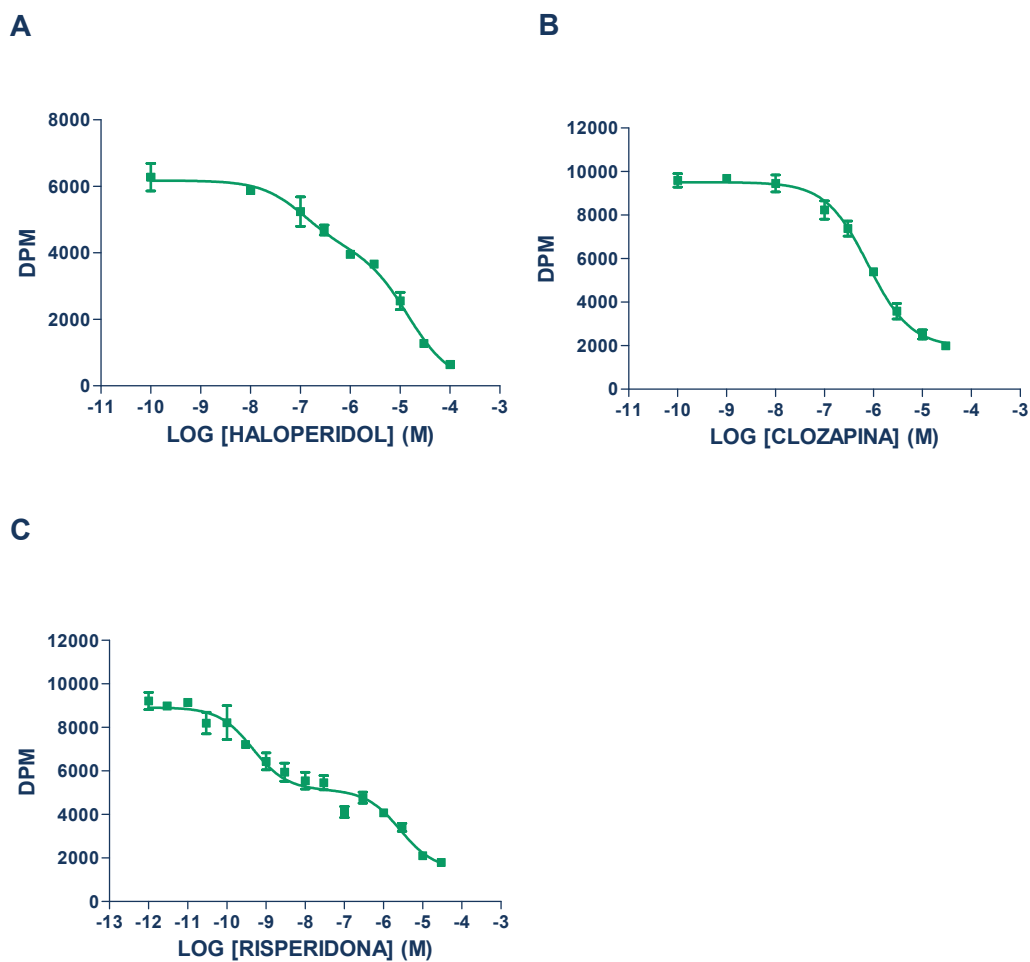


Figura 45: Curva de competición de los compuestos: A) Haloperidol, B) Clozapina, C) Risperidona frente a [³H]-LSD en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón *wild type* (WT). Se muestra un experimento representativo de un total dos (n=2) (A,C) y tres (n=3) (B) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Tabla 31: Afinidad por el receptor 5-HT_{2A} de serotonina de sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ) con [³H]-LSD de los compuestos estudiados. Se muestra la media ± eem de un total de dos (n=2) (Risperidona) y tres (n=3) (Haloperidol y clozapina) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Heterocigoto reeler (HZ)				
COMPUESTO	K_i alta (nM)	pK_i (alta afinidad)	K_i baja (nM)	pK_i (baja afinidad)
Haloperidol	65.1±9.23	7.20±0.06	5833.0±714.08	5.24±0.05
Clozapina			409.13±47.41	6.39±0.05
Risperidona	1.56±0.23*	8.81±0.06	555.45±235.65	6.30±0.20

*: p<0.05 respecto a WT (ANOVA de un factor).

Tabla 32: Afinidad por el receptor 5-HT_{2A} de serotonina de sinaptosomas de ratón *wild type* (WT) con [³H]-LSD de los compuestos estudiados. Se muestra la media ± eem de un total de dos (n=2) (Haloperidol y risperidona) y tres (n=3) (Clozapina) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Wild type (WT)				
COMPUESTO	K_i alta (nM)	pK_i (alta afinidad)	K_i baja (nM)	pK_i (baja afinidad)
Haloperidol	32.70±20.85	7.60±0.33	6382.0±157.0	5.20±0.01
Clozapina			355.94±21.05	6.45±0.03
Risperidona	0.37±0.16	9.47±0.20	1315.25±73.75	5.88±0.02

Con el objetivo de descartar que las curvas de competición bifásicas obtenidas con el haloperidol y la risperidona fueran debidas al grado de acoplamiento de las proteínas G al receptor marcado con el agonista ^3H -LSD (los clásicos estados de alta afinidad), se realizaron ensayos de competición con $100\ \mu\text{M}$ de Gpp(NH)p (guanosina-5'-(β,γ -imido)trifosfato), un análogo no hidrolizable del GTP que desacopla las proteínas G del receptor. La presencia de Gpp(NH)p no modificó las curvas de competición bifásicas para el haloperidol y la risperidona tanto en ratones heterocigoto reeler (HZ) como *wild type* (WT) (Figura 46 y 47). Los parámetros de afinidad (K_i) (Tabla 33 y 34) no variaron significativamente en relación a los obtenidos en ausencia de Gpp(NH)p.

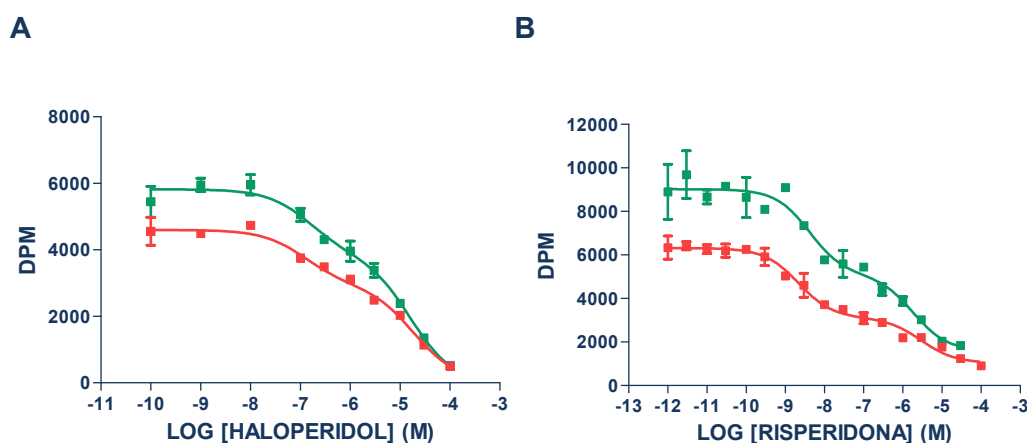


Figura 46: Curva de competición de los compuestos: A) Haloperidol y B) Risperidona frente a [^3H]-LSD en el receptor 5-HT_{2A} de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ) en ausencia (■) y en presencia (■) de $100\ \mu\text{M}$ de Gpp(NH)p. Se muestra un experimento representativo de un total de dos o tres experimentos independientes ($n=3$) realizados con puntos por duplicado.

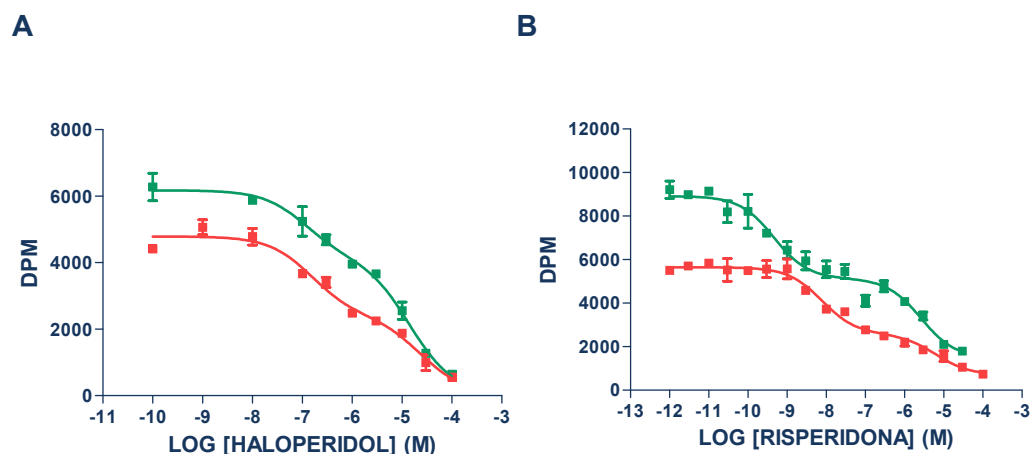


Figura 47: Curva de competición de los compuestos: A) Haloperidol y B) Risperidona frente a [^3H]-LSD en el receptor $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ de serotonina en membranas de sinaptosomas de ratón *wild type* (WT) en ausencia (■) y en presencia (■) de $100\ \mu\text{M}$ de Gpp(NH)p. Se muestra un experimento representativo de un total de dos o tres experimentos independientes ($n=3$) realizados con puntos por duplicado.

Tabla 33: Afinidad por el receptor $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ de serotonina de sinaptosomas de ratón heterocigoto reeler (HZ) con [^3H]-LSD de los compuestos estudiados en ausencia o en presencia de $100\ \mu\text{M}$ de Gpp(NH)p. Se muestra la media \pm eem de un total de dos ($n=2$) (Risperidona, haloperidol con Gpp(NH)p y risperidona con Gpp(NH)p) y tres ($n=3$) (Haloperidol) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

Heterocigoto reeler (HZ)				
COMPUESTO	K_i alta (nM)	pK_i (alta afinidad)	K_i baja (nM)	pK_i (baja afinidad)
Haloperidol	65.1 ± 9.23	7.20 ± 0.06	5833.0 ± 714.08	5.24 ± 0.05
Haloperidol ($100\ \mu\text{M}$ Gpp(NH)p)	53.29 ± 8.25	7.28 ± 0.07	5277.0 ± 1341.88	5.30 ± 0.10
Risperidona	1.56 ± 0.23	8.81 ± 0.06	555.45 ± 235.65	6.30 ± 0.20
Risperidona ($100\ \mu\text{M}$ Gpp(NH)p)	1.50 ± 0.57	8.86 ± 0.17	1510.5 ± 243.5	5.83 ± 0.07

Tabla 34: Afinidad por el receptor 5-HT_{2A} de serotonina de sinaptosomas de ratón *wild type* (WT) con [³H]-LSD de los compuestos estudiados en ausencia o en presencia de 100 μM de Gpp(NH)p. Se muestra la media ± eem de un total de dos (n=2) experimentos independientes realizados con puntos por duplicado.

<i>Wild type</i> (WT)				
COMPUESTO	K _i alta (nM)	pK _i (alta afinidad)	K _i baja (nM)	pK _i (baja afinidad)
Haloperidol	32.70±20.85	7.60±0.33	6382.0±157.0	5.20±0.01
Haloperidol (100 μM Gpp(NH)p)	82.28±9.96	7.09±0.05	8916.0±2144.0	5.06±0.11
Risperidona	0.37±0.16	9.47±0.20	1315.25±73.75	5.88±0.02
Risperidona (100 μM Gpp(NH)p)	2.82±0.75	8.57±0.12	2163.8±748.2	5.69±0.16

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

La reelina es una glicoproteína de la matriz extracelular (D'Arcangelo y cols., 1997) reguladora de la migración neuronal durante el desarrollo cerebral (Tissir y Goffinet, 2003) y de la modulación de la plasticidad sináptica durante el periodo postnatal y adulto (Beffert y cols., 2005; Herz y Chen, 2006). El ratón heterocigoto reeler (HZ) que presenta una disminución de ~50 % de la expresión de esta proteína, similar a la descrita en pacientes esquizofrénicos (ver apartado “El ratón heterocigoto reeler como modelo animal de esquizofrenia” de la introducción, p.63), ha sido ampliamente utilizado para el estudio de las alteraciones neuroanatómicas y comportamentales observadas en la esquizofrenia (Costa y cols., 2001; Krueger y cols., 2006; Podhorna y Didriksen, 2004; Tueting y cols., 1999) y se ha propuesto como un modelo genético de esta enfermedad (Liu y cols., 2001).

Sin embargo, existen pocos estudios que evalúen en este modelo animal las características de los principales sistemas de neurotransmisión implicados en la patología de la esquizofrenia (Ballmaier y cols., 2002; Isosaka y cols., 2006; Matsuzaki y cols., 2007; Panagopoulos y cols., 1993). Por ello, nuestro objetivo en la presente Tesis Doctoral fue caracterizar farmacológicamente (en función de la expresión de reelina en los modelos de ratones) los dos receptores de neurotransmisores más citados en relación con el mecanismo de acción de los fármacos antipsicóticos y la neuropatología de la esquizofrenia, los receptores D₂ de dopamina y 5-HT_{2A} de serotonina. Para ello, se evaluó comparativamente la expresión y la función de estos receptores en ratones heterocigoto reeler (HZ) y *wild type* (WT) así como el efecto del tratamiento antipsicótico en la expresión de estos receptores. Además dado que la reelina afecta directamente la expresión proteica en las sinapsis, hemos puesto a punto la metodología para la caracterización farmacológica y conformacional de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} en sinapsis aisladas para evaluar el efecto de la reelina sobre la distribución conformacional de estos receptores en dicho modelo de sinaptosomas.

El estudio de la expresión del receptor D₂, mostró un incremento de la densidad (B_{max}) de estos receptores en el estriado de los ratones HZ comparado a los ratones WT. Se ha descrito que los ratones HZ presentan un nivel de dopamina en el

estriado inferior a los ratones WT (Ognibene y cols., 2008), lo que se podría atribuir a fenómenos de *up-regulation* en ratones HZ para compensar la pérdida de señal. Respecto a los datos de otros estudios, en la bibliografía hay discrepancias: Panagopoulos y cols., 1993 no observaron diferencias en la unión de [³H]-espiperona al receptor D₂ en el estriado de ratones homocigoto reeler (RL) y Matsuzaki y cols, 2007 observaron una disminución de la unión al receptor D₂ en el estriado de ratones RL. Dicha disminución se describió en ratones RL (sin proteína reelina) mientras los datos presentados en nuestro trabajo fueron obtenidos en ratones HZ (~50 % de los niveles de reelina).

Asimismo, se debe tener en cuenta que el estudio de Matsuzaki y cols, 2007 y el nuestro se llevaron a cabo con distintos radioligandos, [³H]-raclopride en el estudio de Matsuzaki y [³H]-espiperona en el nuestro. Los derivados de la butirofenona como la espiperona se unen a los tres subtipos de la familia D₂ (D₂, D₃ y D₄) (Lomena y cols., 2004; Soares y Innis, 1999) además de a los receptores 5-HT_{2A} (Barnes y Sharp, 1999; Zavitsanou y Huang, 2002), mientras que los derivados de las benzamidas como el raclopride se unen solo a los subtipos D₂ y D₃ (Lomena y cols., 2004; Soares y Innis, 1999). En nuestro estudio la posible interferencia del receptor D₄ debería ser mínima ya que el estriado contiene un número pequeño de receptores D₄ relativo a D₂ (Primus y cols., 1997). En lo que respecta a la posible interferencia con los receptores 5-HT_{2A} nuestros ensayos se llevaron a cabo en presencia de una concentración de ketanserina (50 nM) que bloquea la unión a receptores 5-HT_{2A}.

El aumento observado en nuestros estudios concuerda con numerosos estudios postmortem que han mostrado una elevación de los receptores D₂ en el estriado de pacientes con esquizofrenia (Guillin y cols., 2007; Lee y Seeman, 1980; Seeman y cols., 1987; Soares y Innis, 1999), aunque la mayoría de estos estudios postmortem se han realizado en muestras de pacientes que habían sido tratados con antipsicóticos, lo que introduce la posibilidad de que este incremento sea debido al tratamiento (Lomena y cols., 2004; Seeman y Kapur, 2000).

Igualmente, los estudios de la densidad del receptor D₂ en pacientes esquizofrénicos que no habían sido tratados previamente con fármacos antipsicóticos mediante estudios de imagen *in vivo* han aportado datos contradictorios. Estudios

utilizando [^{11}C]metilespiperona mostraron una elevación de los receptores D_2 en la esquizofrenia (Tune y cols., 1996; Wong y cols., 1997), mientras que los resultados utilizando [^{11}C]raclopride no mostraron dicha elevación (Farde y cols., 1990; Hietala y cols., 1994; Talvik y cols., 2006). Estas diferencias han sido atribuidas a distintos factores, entre los que se incluyen diferencias en la capacidad de los ligandos de competir con la dopamina endógena, diferencias en los métodos de análisis, diferencias en la evolución de la enfermedad e incluso diferencias en la capacidad de los ligandos de discriminar entre formas monoméricas, diméricas y oligoméricas del receptor (Dean y cols., 1997; Lomena y cols., 2004; Malmberg y cols., 1996; Seeman y Kapur, 2000). Así, la espiperona marca específicamente las formas monoméricas del receptor mientras que el raclopride se une tanto a formas monoméricas como diméricas. Se ha sugerido que en la esquizofrenia existe un predominio de las formas monoméricas del receptor, de este modo la unión con raclopride no mostraría diferencias, pero la unión con espiperona sería mayor en el cerebro de esquizofrénicos en relación a los controles, debido al aumento del número de monómeros (Seeman y Kapur, 2000; Zawarynski y cols., 1998). Este aumento sería concordante con el observado en nuestro estudio en los ratones HZ con niveles de reelina similares a los de los pacientes esquizofrénicos.

Con el objetivo de evaluar la funcionalidad de los receptores D_2 , hemos realizado ensayos funcionales con [^{35}S]GTP γ S para estudiar el grado de acoplamiento del receptor D_2 a las proteínas G. Nuestros resultados muestran un aumento significativo de la funcionalidad del receptor D_2 en ratones HZ comparado a WT que se corresponde con el aumento de la densidad y que concordaría con la hiperactividad dopaminérgica característica de la esquizofrenia (Abi-Dargham, 2004). De este modo, el déficit de reelina parece inducir una sobreexpresión de los receptores D_2 y una mayor sensibilidad funcional de los mismos, conduciendo por tanto a una hiperactividad dopaminérgica.

Por otra parte, los receptores $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ son también receptores acoplados a proteínas G, que han sido implicados en la patología y en el mecanismo de acción de los antipsicóticos atípicos. Se ha observado que la activación de los receptores $5\text{-HT}_{2\text{A}}$ por sustancias alucinógenas como el LSD induce síntomas psicóticos como la esquizofrenia (Geyer y Vollenweider, 2008). Adicionalmente, la clozapina, el

fármaco patrón o *gold standard* de los antipsicóticos atípicos tiene mayor afinidad por estos receptores que por los D₂, por ello en el diseño de las nuevas generaciones de antipsicóticos atípicos se consideró y la mayoría de los fármacos antipsicóticos atípicos comercializados presentan una elevada afinidad como antagonistas de los receptores 5-HT_{2A} (Meltzer, 1999; Meltzer y cols., 2003b), ver apartado “Fármacos antipsicóticos” de la introducción de esta Tesis, p.21.

Cuando investigamos la influencia de los niveles de reelina sobre la expresión en la corteza frontal de los receptores 5-HT_{2A} de los distintos genotipos observamos un descenso significativo en la densidad de los receptores 5-HT_{2A} en ratones HZ. Estos datos apoyarían una cercanía entre el descenso de los niveles de reelina en el ratón HZ y la esquizofrenia, en la que mayoritariamente se describe una disminución de la densidad de los receptores 5-HT_{2A}. Se ha descrito de forma mayoritaria una reducción significativa de la densidad del receptor 5-HT_{2A} en las áreas corticales, especialmente en la corteza frontal, del cerebro de los pacientes esquizofrénicos (Arora y Meltzer, 1991; Bennett, Jr. y cols., 1979; Dean y Hayes, 1996; Dean, 2003; Laruelle y cols., 1993; Matsumoto y cols., 2005; Mita y cols., 1986; Pralong y cols., 2000). Esta disminución es apoyada por un estudio piloto *in vivo* en la corteza prefrontal de seis individuos con riesgo de padecer esquizofrenia (Hurlemann y cols., 2005). Del mismo modo, se describen niveles reducidos del ARNm del receptor 5-HT_{2A} en pacientes esquizofrénicos ancianos sin tratamiento neuroléptico en el giro frontal superior izquierdo, con respecto a controles o a pacientes tratados con fármacos neurolépticos, para los que se observó mayor densidad del ARNm del receptor 5-HT_{2A} (Hernandez y Sokolov, 2000).

Sin embargo, algunos autores han encontrado un aumento de la densidad del receptor 5-HT_{2A} en la esquizofrenia (Whitaker y cols., 1981), mientras que otros estudios no encontraron cambios en la densidad de estos receptores (Dean y cols., 1996; Reynolds y cols., 1983). Estas diferencias son atribuidas frecuentemente a una heterogeneidad en la enfermedad o a diferencias en la influencia de los tratamientos. Del mismo modo, hay descripciones variables respecto a su afinidad, con aumentos, disminuciones y mayoritariamente sin cambios (Dean, 2003; Hernandez y Sokolov, 2000). Los resultados de los estudios *in vivo*, igual que en los receptores D₂, describen datos variables de la densidad de estos receptores. Existen estudios *in vivo*

que han mostrado un descenso en la densidad del receptor 5-HT_{2A} en la corteza frontal de esquizofrénicos (Ngan y cols., 2000; Rasmussen y cols., 2010) aunque también existen estudios que no muestran diferencias significativas entre pacientes y controles (Erritzoe y cols., 2008; Lewis y cols., 1999; Okubo y cols., 2000; Trichard y cols., 1998; Verhoeff y cols., 2000).

Para conocer la influencia de la reelina en la funcionalidad de los receptores 5-HT_{2A}, igual que para receptores D₂, se llevaron a cabo estudios de [³⁵S]GTPγS que mostraron una disminución significativa en la funcionalidad de este receptor en la corteza frontal de los ratones HZ comparado a los WT. Esta disminución en la funcionalidad concuerda con la disminución de la expresión de receptores y parece indicar que el déficit de reelina conlleva una disminución de la actividad del receptor 5-HT_{2A}. No se puede atribuir a la existencia de distintos niveles de serotonina endógena, ya que se describió que no existen diferencias significativas de sus niveles entre ratones HZ y WT (Ognibene y cols., 2008).

En conjunto, estos resultados indican que el sistema dopaminérgico y serotoninérgico, concretamente los receptores D₂ y 5-HT_{2A}, están alterados en el ratón HZ con una tendencia que se podría considerar similar a la descrita en la esquizofrenia. Todo ello implica un papel para la reelina en la expresión y la función de estos receptores y plantea la posibilidad de utilizar los ratones HZ como modelos animales *in vitro* de la enfermedad.

En estas condiciones de acercamiento del posible modelo animal a la enfermedad, nos planteamos el estudio de la influencia del tratamiento con antipsicóticos sobre la expresión de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} en ratones HZ que como acabamos de comentar acompañan su deficiencia genética en reelina con diferentes niveles de estos receptores en comparación con los ratones WT.

Existe numerosa información bibliográfica que describe resultados contradictorios y, con frecuencia, paradójicos en la regulación farmacológica de los GPCRs por fármacos antipsicóticos. Sin embargo, aunque son bien conocidos los cambios en los niveles de estos receptores y de la reelina en situaciones fisiológicas y fisiopatológicas de los pacientes, y que también es conocido que la reelina regula la plasticidad sináptica y la expresión de proteínas (los receptores lo son) en los terminales sinápticos, no existe (hasta donde llega nuestro conocimiento) ningún dato

que reporte información respecto a la regulación farmacológica en ratones con distintos niveles de reelina.

Es bien conocida una *down-regulation* paradójica de los receptores 5-HT_{2A} por fármacos antipsicóticos antagonistas de los mismos (Gray y Roth, 2001) y se han discutido distintas hipótesis para explicarla, entre las que destaca la referida a la internalización de los receptores (Berry y cols., 1996; VanOekelen y cols., 2003; Willins y cols., 1998; Willins y cols., 1999). En estudios en la línea celular NIH 3T3 Willins y cols. en 1999 describieron que la olanzapina produjo cambios en la distribución subcelular de los receptores 5-HT_{2A} *in vitro*, y que tras siete días de tratamiento en rata se produjo la internalización y redistribución celular desde las dendritas apicales a compartimentos intracelulares en el soma de neuronas piramidales glutamatérgicas. En relación con esto, en un tratamiento con olanzapina en ratas, en nuestro laboratorio (Padin y cols., 2006), observamos cambios en la distribución de los receptores 5-HT_{2A} en la corteza motora frontoparietal, después de dieciséis días de tratamiento, la olanzapina indujo inmunoreactividad para la proteína 5-HT_{2A} tanto en el soma de neuronas piramidales, como en otros somas no piramidales, con una desaparición de la inmunotinción del receptor 5-HT_{2A} de las dendritas, lo cual sugiere que con el tratamiento ocurrió una remodelación de los circuitos sinápticos a través de cambios en el transporte subcelular del soma a las dendritas (de acuerdo con la idea propuesta por Willins y cols., 1999). Esta redistribución podría ser la responsable de la disminución en la densidad de receptores en las membranas de la corteza frontal, medida por estudios de *binding*. Por lo tanto, dicha *down-regulation* representaría más una redistribución neuronal de la proteína receptora 5-HT_{2A} que una disminución global de la misma.

Una explicación para la *down-regulation* paradójica por antagonistas, alternativa a la redistribución, es la propuesta por González-Maeso y Sealfon en 2009, que la atribuyeron a una confusión arrastrada por la heterogeneidad de los pacientes esquizofrénicos de los distintos estudios, agravada por la influencia de los tratamientos farmacológicos. Estos autores, en un estudio con pacientes esquizofrénicos no tratados con neurolépticos, describieron un aumento de la densidad de receptores 5-HT_{2A} en pacientes jóvenes y una correlación negativa con la edad, disminuyendo la densidad en pacientes mayores. Esta última observación

coincide con la disminución del ARNm del receptor 5-HT_{2A} en pacientes esquizofrénicos ancianos (Hernandez y Sokolov, 2000).

Una reconceptualización de estas dos explicaciones nos llevaría a proponer un mayor número global de receptores en distintas localizaciones subcelulares en la esquizofrenia (aunque en la membrana neuronal se puedan observar densidades variables) que sería compensado por los fármacos antipsicóticos, afectando a la dinámica neuronal global de los receptores responsable en última instancia de que lo que se observa en concreto en la membrana sea una disminución. Sería plausible, en este planteamiento, un escenario dinámico de la distribución cerebral de la proteína receptora 5-HT_{2A} en el que varíe su densidad en situaciones fisiológicas (p. ej. en función de la edad), patológicas (la psicosis en este caso) y farmacológicas (p. ej. el tratamiento con antipsicóticos).

Parece lógico pensar que la introducción de un factor externo como el farmacológico en dicho sistema dinámico, tienda a llevarlo a un estado estacionario de equilibrio, independientemente de la situación inicial en que lo encuentre. Esto no podría verse si los tratamientos farmacológicos en animales de experimentación se llevan a cabo en animales control con niveles constantes y comunes de los receptores. Por eso, en la presente Tesis Doctoral hemos comparado dos grupos de ratones que expresan distinta densidad de receptores: los ratones WT y los ratones HZ, los cuales como se ha comentado anteriormente, expresan aproximadamente un 50 % de reeplina, reducción similar a la observada en pacientes esquizofrénicos (Fatemi, 2001; Impagnatiello y cols., 1998). Como hemos discutido anteriormente en los ratones HZ se produce una disminución en la densidad de los receptores 5-HT_{2A} de corteza frontal y una tendencia al aumento (quizá compensatorio) en la afinidad de los mismos (medida como K_D), respecto al WT.

En el presente estudio hemos investigado el efecto de la administración *in vivo* del antipsicótico haloperidol sobre la densidad (B_{max}) y afinidad (K_D) de los receptores 5-HT_{2A} en la corteza frontal de ratones WT y HZ, medidas mediante estudios de saturación para el binding de ³H-LSD.

La dosis de haloperidol utilizada en el presente estudio (0.2 mg/kg/día) fue escogida como equivalente a la dosis terapéutica usada en humanos 5-10 mg/día (0.07-0.13 mg/kg/día) (Hales y Yudofsky, 2005). Teniendo en cuenta la vida media

del haloperidol en humanos y en ratón (Broadbent y cols., 1995; de Leon J. y cols., 2004; Zetler y Baumann, 1985) se extrapola que el metabolismo en el ratón es de dos a seis veces mayor que en humanos por lo que la dosis utilizada en este estudio estaría comprendida en un rango de 0.03-0.10 mg/kg/día.

En dichas condiciones, la administración de 0.2 mg/kg/día (ip) de haloperidol durante quince días mostró una disminución significativa en la densidad (B_{max}) de los receptores 5-HT_{2A} en la corteza frontal de los ratones WT además de un aumento significativo en la afinidad ($p < 0.05$ para el descenso en el valor de la K_D).

De forma opuesta, la administración de 0.2 mg/kg/día i.p. haloperidol mostró, después de quince días de tratamiento, un aumento en la densidad (B_{max}) de los receptores 5-HT_{2A} en la corteza cerebral frontal de los ratones HZ, además de un descenso significativo en la afinidad ($p < 0.05$ para el aumento en el valor de K_D). Esta es, hasta donde llega nuestro conocimiento, la primera descripción comparada del efecto compensador del tratamiento antipsicótico en los niveles de GPCRs de ratones HZ y WT, con una regulación en la densidad y sensibilidad de los receptores 5-HT_{2A} aparentemente hacia unos niveles similares, en relación inversa a su nivel de partida en cada grupo de animales.

Esta regulación opuesta de la densidad/sensibilidad de los receptores 5-HT_{2A} en función de los valores de partida, sugiere, en un modelo dinámico, una tendencia hacia un estado estacionario de equilibrio. Sería compatible con una redistribución neuronal (antes descrita de los receptores 5-HT_{2A}) especialmente en las espinas dendríticas donde podrían ponerse de manifiesto alteraciones en la plasticidad sináptica dependientes del déficit de reelina de los ratones HZ.

En cualquiera de los casos, nuestros resultados apoyan una perspectiva compensatoria hacia niveles similares de densidad y sensibilidad en la regulación de los receptores 5-HT_{2A} por el haloperidol, lo que permite plantear una hipótesis que reconcilia los datos heterogéneos y contradictorios observados en la regulación de este receptor en cerebro humano, hacia un posible estado estacionario de equilibrio en el que el cambio observado (aumento o disminución) dependería de los niveles de partida en la expresión y afinidad de los receptores. En el caso humano, como se ha comentado, la redistribución de los receptores se modificaría en función del nivel de partida, por la edad del paciente y las variaciones fisiopatológicas del curso de la

enfermedad, dando lugar (siempre según esta hipótesis) a los resultados contradictorios de regulación descritos en la bibliografía.

Resulta razonable pensar en un bucle de interregulación entre el sistema reelina-GABA y los GPCRs implicados en la farmacología de la psicosis, de hecho varios estudios han hipotetizado que los antipsicóticos afectan a genes responsables de cambios en la estructura y la función sináptica que podrían ser subyacentes a la respuesta clínica (Chen y Chen, 2005; Fatemi y cols., 2009). Los cambios *ex vivo* que hemos observado en la regulación por haloperidol de los receptores 5-HT_{2A} apoyarían esta posibilidad.

Nuestros resultados miden la unión del radioligando a los receptores de la membrana neuronal de la corteza frontal, ello no nos permite afirmar o descartar que estas modificaciones sean el producto del déficit de reelina en los ratones HZ, pero son compatibles con tal relación y, de hecho, se ha descrito que el tratamiento con fármacos antipsicóticos afecta la expresión del sistema de señalización de reelina en la corteza frontal de rata; concretamente el haloperidol a dosis de 1,5 mg/kg/día (i.p.) durante 21 días incrementó los niveles de la proteína GSK3 (serina cinasa implicada en la vía de señalización de la reelina), la expresión del receptor VLDLR de reelina, y causó reducciones en la propia reelina y en la descarboxilasa del ácido glutámico de 65 y 67 (GAD₆₅ y GAD₆₇) (Fatemi y cols., 2009).

Con respecto a los receptores D₂ de dopamina en el estriado, por los que el haloperidol presenta alta afinidad, la administración de 0.2 mg/kg/día (i.p.) de haloperidol durante quince días mostró un incremento significativo de la densidad (B_{max}) de los receptores D₂ en el estriado de los ratones WT, mientras que en los ratones HZ mostró una tendencia a la reducción aunque los cambios no alcanzan la significación. Del mismo modo, el tratamiento no modificó significativamente la afinidad en ninguno de los dos genotipos aunque la tendencia fue de disminución en WT y de aumento en HZ. El incremento en la densidad (B_{max}) de los receptores D₂ en los ratones WT concuerda con los resultados descritos en la bibliografía que describen un incremento en la expresión de estos receptores en las áreas estriatales después del tratamiento prolongado con haloperidol (Hurley y cols., 1996; Laruelle y cols., 1992). En HZ, aunque no significativas las tendencias fueron a la disminución

hacia un hipotético estado estacionario de equilibrio, de forma paralela a lo que ocurre en los receptores 5-HT_{2A}.

En conclusión, nuestro estudio describe, por primera vez, una regulación diferencial de los receptores 5-HT_{2A} por el haloperidol en ratones que expresan distintos niveles de reelina, observándose una disminución de su densidad en los ratones WT y un aumento en los ratones HZ tendentes a alcanzar niveles similares en ambos grupos de animales tras el tratamiento. Igual tendencia se observó hacia una afinidad similar. Estos resultados, además de apoyar la interacción reelina-5-HT_{2A} en la regulación por haloperidol, suponen la primera observación de una regulación dependiente de los niveles de partida que permite explicar los resultados heterogéneos y la regulación paradójica descrita en la bibliografía para los receptores 5-HT_{2A}. Similar a lo que sucede con los receptores 5-HT_{2A}, se observa una regulación diferencial de los receptores D₂ de dopamina en ratones que expresan distintos niveles de reelina con un incremento en su densidad en los ratones WT que no ocurre en los ratones HZ. En este caso, parece que el tratamiento con haloperidol también muestra una tendencia (no significativa, cuya confirmación requeriría ampliar el estudio) a igualar los niveles de expresión del receptor D₂ lo que apoya también la regulación dependiente de los niveles de partida ya observada para el receptor 5-HT_{2A}.

A la vista de estos resultados, que apoyan la influencia de la reelina en la distribución, función y regulación farmacológica de los receptores estudiados, hemos querido analizar de la forma más fisiológica posible las características de la expresión de estas proteínas receptoras en ratones con distintos niveles de expresión de reelina.

Los pacientes esquizofrénicos presentan un descenso en el número de espinas dendríticas, principal lugar de contacto sináptico, que se puede relacionar también con el descenso de los niveles de reelina observados en estos pacientes (ver apartado “Función de la reelina” de introducción, p.54). La reelina se ha relacionado con procesos de translación de ARNm residentes en las espinas dendríticas así como con la localización de receptores en estas estructuras. Teniendo en cuenta estos hechos, que las espinas dendríticas son el principal lugar de contacto sináptico y que están disminuidas tanto en la esquizofrenia como en el ratón heterocigoto reeler asociado a

los niveles de reelina (ver apartado “El ratón heterocigoto reeler como modelo animal de esquizofrenia” de la introducción, p. 63), decidimos estudiar las características conformacionales de los receptores en sinaptosomas cerebrales (sinapsis aisladas) de los distintos genotipos de ratones.

Hemos realizado ensayos de saturación para estudiar la expresión de los receptores 5-HT_{2A} y D₂ en sinaptosomas de ratones RL, HZ y WT. A partir de estos estudios se observó una disminución significativa en los sinaptosomas en la densidad (B_{max}) de ambos receptores en el genotipo HZ con respecto al WT, además de un descenso para el genotipo RL con respecto al WT y al HZ, mientras que no se observaron diferencias en la afinidad de los radioligandos utilizados en cualquiera de los genotipos. Estas diferencias sugieren que la reelina condiciona la expresión de los receptores en los terminales sinápticos, y que esta disminución de la expresión de receptores se podría relacionar con la disminución de las espinas dendríticas asociada con la disminución de los niveles de reelina.

Además, es bien conocido que la distribución conformacional de las proteínas está condicionada, entre otros factores, por el entorno en que se expresan los receptores (Kenakin y Miller, 2010). Dada la alteración del entorno de las espinas sinápticas por el déficit de reelina, hemos realizado también la caracterización conformacional de los receptores 5-HT_{2A} y D₂ en sinaptosomas.

En un estudio previo (Brea y cols., 2009; Lopez-Gimenez y cols., 2001) en cerebro nativo humano y en líneas celulares expresando receptores 5-HT_{2A} humanos recombinantes sin actividad constitutiva, se propuso la expresión dimérica de estos receptores en base a las curvas de competición bifásicas (tanto en unión como en función) para los antagonistas clozapina, ketanserina y risperidona compitiendo con radioligandos agonistas (³H-DOB, ¹²⁵I-DOI). Estas curvas bifásicas fueron atribuidas a la cooperatividad negativa de los receptores 5-HT_{2A} homodiméricos humanos (Brea y cols., 2009). Con el fin de estudiar este comportamiento en animales de experimentación con distintos niveles de reelina, en el presente trabajo realizamos la caracterización conformacional de los receptores 5-HT_{2A} y D₂ en sinaptosomas de ratón.

En sinaptosomas de ratón Swiss la ketanserina mostró curvas de competición bifásicas sugerentes de cooperatividad negativa en los receptores 5-HT_{2A} marcados

con el radioligando agonista [^3H]-LSD, discriminando aparentemente dos conformaciones diferentes del receptor, mientras que el haloperidol y la clozapina mostraron perfiles de competición monofásicos. En trabajos anteriores se comprobó que estas curvas de competición bifásica eran insensibles a Gpp(NH)p. La insensibilidad a Gpp(NH)p de las curvas de competición bifásicas obtenidas indican que las dos fases no reflejan estados del receptor de baja y alta afinidad dependientes de proteínas G, y eliminan el modelo del complejo ternario (TC) (De Lean A. y cols., 1980) y el modelo del complejo ternario extendido (ETC) (Lefkowitz y cols., 1993; Samama y cols., 1993) como enfoques útiles para analizar los datos. Los modelos alostéricos (Bosier y Hermans, 2007; Kenakin, 2007) también se consideraron inapropiados debido a que se observó un desplazamiento completo de los radioligandos de sus sitios específicos de unión para todos los antagonistas testados. Las curvas bifásicas podían ser explicadas como ya se describió anteriormente en trabajos del grupo de investigación, mediante una cooperatividad negativa entre los protómeros del receptor 5-HT_{2A} homodimérico (Albizu y cols., 2006; Brea y cols., 2009).

Estas conformaciones del receptor dependientes de ligando coinciden con las descritas anteriormente en los receptores 5-HT_{2A} humanos (Brea y cols., 2009; Lopez-Gimenez y cols., 2001) donde la forma de las curvas fue dependiente del ligando competidor, como se acaba de comentar. En estos estudios hemos observado diferencias inter-especie en la distribución conformacional de los receptores 5-HT_{2A}, ya que los valores de afinidad (K_i) de la ketanserina fueron diferentes en humano y ratón, y la forma de la curva de competición obtenida con la clozapina (curva de competición bifásica en los receptores humanos y monofásica en sinaptosomas de ratón) también fue diferente. Asimismo, cabe destacar que los ensayos en humanos se llevaron a cabo en cortes de cerebro o en líneas celulares, mientras que este estudio se llevó a cabo en sinaptosomas. Esta diferencia en la preparación de la muestra no puede ser descartada ya que es conocida la influencia del entorno en la distribución conformacional que adoptan los receptores (Kenakin y Miller, 2010).

Estudios análogos realizados para el receptor D₂ de sinaptosomas mostraron que todos los antipsicóticos evaluados (haloperidol, clozapina y risperidona)

presentaban curvas de competición monofásicas, compatibles con una única conformación del receptor.

Dada la heterogeneidad estructural de los compuestos estudiados, que podría condicionar la aparición de curvas bifásicas, nos propusimos llevar a cabo estudios análogos con compuestos con una alta homología estructural que habían demostrado ser activos en los receptores 5-HT_{2A} y D₂ (Brea y cols., 2002) y que previamente demostraron reconocer distintas conformaciones de los receptores 5-HT_{2A} humanos (Brea y cols., 2003; Brea, 2004). Estas moléculas son butirofenonas conformacionalmente restringidas con un núcleo *p-Fluoro*-benzisoxazol en su estructura y con variaciones en el extremo carbonílico de la butirofenona (Figura 13). Los compuestos (QF1004B, QF0108B y QF0703B) sintetizados por el grupo de los Dres. Raviña y Masaguer de la USC mostraron curvas de competición monofásicas en el receptor D₂. En el caso del receptor 5-HT_{2A} se observaron curvas de competición monofásicas con los compuestos QF1004B y QF2004B mientras que el compuesto QF0108B presentó una curva de competición bifásica. Estos resultados apuntan a que incluso pequeñas variaciones estructurales en el heterociclo unido a la ciclohexanona de la molécula permiten discriminar distintos estados conformacionales del receptor en sinaptosomas ya que el compuesto QF0108B presenta una benzociclohexanona, mientras que los compuestos QF1004B y QF2004B tienen heterociclos sustituidos como es el caso de una benzofuranona o de una carbazolona. Estos resultados, al igual que sucede en el caso de la clozapina y la ketanserina, también aportan datos de diferencias inter-especie: el compuesto QF0108B al igual que en humano presentó una curva de competición bifásica en sinaptosomas de ratón, sin embargo el compuesto QF2004B mostró una curva de competición monofásica en sinaptosomas de ratón mientras que en humano fue bifásica.

Con el objetivo de estudiar el papel que la reelina ejerce en la distribución conformacional de los receptores 5-HT_{2A} y D₂, hemos llevado a cabo los estudios comparados en ratón WT y HZ.

En los receptores 5-HT_{2A} de ratones WT y HZ se observó que el haloperidol y la risperidona mostraron curvas de competición bifásicas, mientras que la clozapina mostró curvas de competición monofásicas para ambos genotipos. Se observaron

diferencias significativas en la constante de afinidad de la risperidona en la primera fase de la curva de competición (K_i alta), siendo más alta en los ratones HZ que en los WT.

Por tanto, nuestros resultados muestran diferencias entre distintas cepas de ratones, donde el haloperidol mostró curvas de competición bifásicas en el ratón reeler (HZ y WT) y monofásicas en Swiss. Además los valores de K_i para la clozapina y risperidona obtenidos en el ratón reeler fueron más altos que los obtenidos en Swiss y también se observaron diferencias en el tipo de curvas de competición, predictivos de distintos estados conformacionales.

Los perfiles de competición diferentes observados entre ratón reeler WT y HZ sugieren que la reelina está participando no solo en la expresión de los receptores en los botones sinápticos, como se observó en los estudios de saturación, sino también en las conformaciones que estos receptores son capaces de adoptar (Lopez-Gimenez y cols., 2001). Esta modulación podría ocurrir directamente sobre las conformaciones de los receptores o ser inducida por los cambios en el entorno donde se expresan estos receptores.

Los ensayos con los receptores D_2 de dopamina mostraron curvas de competición monofásicas con todos los compuestos evaluados en ambos genotipos, sin embargo la risperidona mostró una afinidad más elevada por los receptores D_2 de los ratones HZ que por los de los WT, la cual es una nueva evidencia de la influencia de los niveles de reelina sobre las características de los GPCRs.

Las curvas de competición monofásicas obtenidas para los receptores D_2 podrían ser atribuibles a la ausencia de receptores homodiméricos en nuestro sistema, ya que aunque hay varias evidencias que informan de homodímeros de receptores D_2 (Guo y cols., 2003; Guo y cols., 2005) ninguna se describió en receptores de ratones, a la ausencia de cooperatividad entre los protómeros de los receptores D_2 homodiméricos con los ligandos utilizados en nuestro estudio o a que la modulación del ambiente ejercida por reelina sea más intensa en las zonas corticales, donde la reelina y los receptores 5-HT_{2A} se expresan a niveles más elevados que en el estriado donde la expresión de los receptores D_2 es elevada, pero la de reelina es más baja (Alcantara y cols., 1998; Ramos-Moreno y cols., 2006).

Nuestros resultados apoyan la idea de que la distribución conformacional de los receptores 5-HT_{2A} y D₂ dependen del ligando (Kenakin y Miller, 2010) y de los niveles de reelina, mostrando diferencias inter-especies y también inter-cepas en sinaptosomas. En este sentido los sinaptosomas de ratón resultan un modelo experimental de interés para la caracterización diferencial de los GPCRs expresados en el cerebro.

En resumen, en la presente Tesis Doctoral hemos observado: i) una alteración de los receptores D₂ y 5-HT_{2A} dependiente de los niveles de expresión de la reelina en ratones, ii) cambios en las características conformacionales de los receptores 5-HT_{2A} dependientes del ligando y de la expresión de la reelina y iii) una regulación farmacológica de estos receptores por el antipsicótico haloperidol variable en función de los niveles de reelina. Nuestros datos sugieren una interconexión entre la disfunción dopaminérgica (D₂), serotoninérgica (5-HT_{2A}) y “reelinérgica” en el ratón heterocigoto reeler *in vitro* que concuerda con la descrita en la esquizofrenia, y que señala al ratón heterocigoto reeler como un modelo animal *in vitro* para el estudio de la farmacología de la esquizofrenia.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los ratones heterocigoto reeler (HZ) presentan un incremento en la densidad (B_{\max}) de los receptores D_2 de dopamina en el estriado ($p < 0.05$) y una disminución de los receptores 5-HT_{2A} de serotonina en la corteza frontal ($p < 0.05$) con respecto a los *wild type* (WT).
2. La funcionalidad medida mediante ensayos de [^{35}S]GTP γ S de los receptores D_2 de dopamina está aumentada en el estriado ($p < 0.001$) y disminuida en los receptores 5-HT_{2A} en la corteza frontal ($p < 0.001$) de los ratones HZ con respecto a los WT, respectivamente. No se observaron diferencias significativas en la funcionalidad de estos receptores entre ratón Swiss y WT.
3. El tratamiento con el antipsicótico haloperidol durante 15 días produjo un incremento significativo en la densidad (B_{\max}) de los receptores D_2 en el estriado de los ratones WT ($p < 0.05$) sin modificar la densidad de estos receptores en los ratones HZ. Dicho tratamiento no modificó de forma significativa la afinidad (K_D) de ^3H -espiperona por los receptores D_2 ni en los ratones WT ni en los HZ.
4. El tratamiento con haloperidol durante 15 días disminuyó la densidad (B_{\max}) de los receptores 5-HT_{2A} ($p < 0.05$) y aumentó la afinidad (K_D) ($p < 0.05$) de ^3H -LSD por estos receptores en la corteza frontal de los ratones WT. Dicho tratamiento aumentó la densidad (B_{\max}) de los receptores 5-HT_{2A} ($p < 0.01$) y disminuyó la afinidad (K_D) ($p < 0.05$) de ^3H -LSD por estos receptores en la corteza frontal de los ratones HZ.
5. Se ha puesto a punto la metodología (ensayos de saturación y competición) para la caracterización de los receptores D_2 y 5-HT_{2A} en sinaptosomas de ratón Swiss y ratón reeler (HZ y WT).
6. Existe una disminución de la densidad (B_{\max}) del receptor D_2 en sinaptosomas de ratón HZ con respecto a WT ($p < 0.001$) y en sinaptosomas de ratón RL con respecto a HZ ($p < 0.05$) y a WT ($p < 0.001$) sin observarse diferencias en la afinidad (K_D) de ^3H -espiperona por el receptor D_2 en sinaptosomas de ratón de los tres genotipos.

7. Existe un aumento significativo en la afinidad (disminución de la K_D) de ^3H -ketanserina por el receptor 5-HT_{2A} en ratones HZ con respecto a WT ($p < 0.05$) sin observarse diferencias significativas en la densidad (B_{max}) de estos receptores marcados con ^3H -ketanserina entre ambos genotipos.
8. Existe una disminución en la densidad (B_{max}) de los receptores 5-HT_{2A} marcados con ^3H -LSD en sinaptosomas de ratón HZ con respecto a WT ($p < 0.01$) y en sinaptosomas de ratón RL con respecto a HZ ($p < 0.01$) y WT ($p < 0.001$) sin observarse diferencias en la afinidad (K_D) de ^3H -LSD por estos receptores en sinaptosomas de los tres genotipos.
9. Los fármacos haloperidol y clozapina y las herramientas farmacológicas QF1004B y QF2004B presentaron un perfil de competición monofásico mientras que la ketanserina y el compuesto QF0108B fueron capaces de discriminar entre dos conformaciones del receptor 5-HT_{2A} marcado por ^3H -LSD en sinaptosomas de ratón Swiss lo que sugiere dos estados conformacionales compatibles con la presencia de homodímeros. Todos los compuestos estudiados presentaron un perfil de competición monofásico en el receptor D_2 marcado por ^3H -espiperona en sinaptosomas de ratón Swiss lo que sugiere un único estado conformacional compatible con receptores monoméricos.
10. La clozapina presentó un perfil de competición monofásico mientras que el haloperidol y la risperidona presentaron perfiles de competición bifásicos insensibles a Gpp(NH)p en el receptor 5-HT_{2A} marcado por ^3H -LSD en sinaptosomas de ratón HZ y WT lo que sugiere dos estados conformacionales compatibles con la presencia de homodímeros. La risperidona presentó una constante de afinidad en la primera fase de la curva (K_i alta) mayor por el receptor 5-HT_{2A} de sinaptosomas de ratón HZ que de ratón WT ($p < 0.05$). Todos los compuestos estudiados presentaron perfiles de competición monofásicos en el receptor D_2 marcado por ^3H -espiperona en sinaptosomas de ratón HZ y WT lo que sugiere un único estado conformacional compatible con receptores monoméricos. La risperidona mostró una afinidad mayor (menor K_i) por los receptores D_2 de sinaptosomas de ratón HZ que de ratón WT ($p < 0.01$).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abbott C and Bustillo J (2006) What Have We Learned From Proton Magnetic Resonance Spectroscopy About Schizophrenia? A Critical Update. *Curr Opin Psychiatry* 19:135-139.

Abdolmaleky HM, Cheng K H, Russo A, Smith C L, Faraone S V, Wilcox M, Shafa R, Glatt S J, Nguyen G, Ponte J F, Thiagalingam S and Tsuang M T (2005) Hypermethylation of the Reelin (RELN) Promoter in the Brain of Schizophrenic Patients: a Preliminary Report. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 134B:60-66.

Abi-Dargham A (2004) Do We Still Believe in the Dopamine Hypothesis? New Data Bring New Evidence. *Int J Neuropsychopharmacol* 7 Suppl 1:S1-S5.

Abi-Dargham A and Laruelle M (2005) Mechanisms of Action of Second Generation Antipsychotic Drugs in Schizophrenia: Insights From Brain Imaging Studies. *Eur Psychiatry* 20:15-27.

Akahane A, Kunugi H, Tanaka H and Nanko S (2002) Association Analysis of Polymorphic CGG Repeat in 5' UTR of the Reelin and VLDLR Genes With Schizophrenia. *Schizophr Res* 58:37-41.

Albizu L, Balestre M N, Breton C, Pin J P, Manning M, Mouillac B, Barberis C and Durroux T (2006) Probing the Existence of G Protein-Coupled Receptor Dimers by Positive and Negative Ligand-Dependent Cooperative Binding. *Mol Pharmacol* 70:1783-1791.

Alcantara S, Ruiz M, D'Arcangelo G, Ezan F, de L L, Curran T, Sotelo C and Soriano E (1998) Regional and Cellular Patterns of Reelin mRNA Expression in the Forebrain of the Developing and Adult Mouse. *J Neurosci* 18:7779-7799.

Aleman A, Kahn R S and Selten J P (2003) Sex Differences in the Risk of Schizophrenia: Evidence From Meta-Analysis. *Arch Gen Psychiatry* 60:565-571.

Alex KD and Pehek E A (2007) Pharmacologic Mechanisms of Serotonergic Regulation of Dopamine Neurotransmission. *Pharmacol Ther* 113:296-320.

Allison DB, Mentore J L, Heo M, Chandler L P, Cappelleri J C, Infante M C and Weiden P J (1999) Antipsychotic-Induced Weight Gain: a Comprehensive Research Synthesis. *Am J Psychiatry* 156:1686-1696.

American Psychiatric Association (2000) Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-4th Edition-Text Revision (DSM-IV-TR). *American Psychiatric Association*, Washintong D C.

American Psychiatric Association (2004) Practice Guideline for the Treatment of Patients With Schizophrenia. Second Edition. *Am J Psychiatry* 1-184.

Andersen TE, Finsen B, Goffinet A M, Issinger O G and Boldyreff B (2002) A Reeler Mutant Mouse With a New, Spontaneous Mutation in the Reelin Gene. *Brain Res Mol Brain Res* 105:153-156.

Andreasen NC (2000) Schizophrenia: the Fundamental Questions. *Brain Res Brain Res Rev* 31:106-112.

Andreasen NC, Carpenter W T, Jr., Kane J M, Lasser R A, Marder S R and Weinberger D R (2005) Remission in Schizophrenia: Proposed Criteria and Rationale for Consensus. *Am J Psychiatry* 162:441-449.

Angers S, Salahpour A and Bouvier M (2002) Dimerization: an Emerging Concept for G Protein-Coupled Receptor Ontogeny and Function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:409-435.

Arnaud L, Ballif B A and Cooper J A (2003a) Regulation of Protein Tyrosine Kinase Signaling by Substrate Degradation During Brain Development. *Mol Cell Biol* 23:9293-9302.

Arnaud L, Ballif B A, Forster E and Cooper J A (2003b) Fyn Tyrosine Kinase Is a Critical Regulator of Disabled-1 During Brain Development. *Curr Biol* 13:9-17.

Arnold SE, Trojanowski J Q, Gur R E, Blackwell P, Han L Y and Choi C (1998) Absence of Neurodegeneration and Neural Injury in the Cerebral Cortex in a Sample of Elderly Patients With Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 55:225-232.

Arnone D, McIntosh A M, Tan G M and Ebmeier K P (2008) Meta-Analysis of Magnetic Resonance Imaging Studies of the Corpus Callosum in Schizophrenia. *Schizophr Res* 101:124-132.

Arora RC and Meltzer H Y (1991) Serotonin₂ (5-HT₂) Receptor Binding in the Frontal Cortex of Schizophrenic Patients. *J Neural Transm Gen Sect* 85:19-29.

Arranz MJ and Kapur S (2008) Pharmacogenetics in Psychiatry: Are We Ready for Widespread Clinical Use? *Schizophr Bull* 34:1130-1144.

Assadi AH, Zhang G, Beffert U, McNeil R S, Renfro A L, Niu S, Quattrocchi C C, Antalffy B A, Sheldon M, Armstrong D D, Wynshaw-Boris A, Herz J, D'Arcangelo G and Clark G D (2003) Interaction of Reelin Signaling and Lis1 in Brain Development. *Nat Genet* 35:270-276.

Ballmaier M, Zoli M, Leo G, Agnati L F and Spano P (2002) Preferential Alterations in the Mesolimbic Dopamine Pathway of Heterozygous Reeler Mice: an Emerging Animal-Based Model of Schizophrenia. *Eur J Neurosci* 15:1197-1205.

Bar I, Lambert De R C and Goffinet A M (2000) The Evolution of Cortical Development. An Hypothesis Based on the Role of the Reelin Signaling Pathway. *Trends Neurosci* 23:633-638.

Bar I, Lambert De R C, Royaux I, Krizman D B, Dernoncourt C, Ruelle D, Beckers M C and Goffinet A M (1995) A YAC Contig Containing the Reeler Locus With Preliminary Characterization of Candidate Gene Fragments. *Genomics* 26:543-549.

Barbato A (1998) Schizophrenia and Public Health. Division of Mental Health and Prevention of Substance Abuse. *World Health Organization* 1-32.

- Barnes NM and Sharp T (1999) A Review of Central 5-HT Receptors and Their Function. *Neuropharmacology* 38:1083-1152.
- Barr AM, Fish K N, Markou A and Honer W G (2008) Heterozygous Reeler Mice Exhibit Alterations in Sensorimotor Gating but Not Presynaptic Proteins. *Eur J Neurosci* 27:2568-2574.
- Beffert U, Morfini G, Bock H H, Reyna H, Brady S T and Herz J (2002) Reelin-Mediated Signaling Locally Regulates Protein Kinase B/Akt and Glycogen Synthase Kinase 3beta. *J Biol Chem* 277:49958-49964.
- Beffert U, Stolt P C and Herz J (2004) Functions of Lipoprotein Receptors in Neurons. *J Lipid Res* 45:403-409.
- Beffert U, Weeber E J, Durudas A, Qiu S, Masiulis I, Sweatt J D, Li W P, Adelman G, Frotscher M, Hammer R E and Herz J (2005) Modulation of Synaptic Plasticity and Memory by Reelin Involves Differential Splicing of the Lipoprotein Receptor Apoer2. *Neuron* 47:567-579.
- Belvindrah R, Graus-Porta D, Goebbels S, Nave K A and Muller U (2007) Beta1 Integrins in Radial Glia but Not in Migrating Neurons Are Essential for the Formation of Cell Layers in the Cerebral Cortex. *J Neurosci* 27:13854-13865.
- Benes FM, McSparren J, Bird E D, SanGiovanni J P and Vincent S L (1991) Deficits in Small Interneurons in Prefrontal and Cingulate Cortices of Schizophrenic and Schizoaffective Patients. *Arch Gen Psychiatry* 48:996-1001.
- Bennett JP, Jr., Enna S J, Bylund D B, Gillin J C, Wyatt R J and Snyder S H (1979) Neurotransmitter Receptors in Frontal Cortex of Schizophrenics. *Arch Gen Psychiatry* 36:927-934.
- Berg KA, Maayani S, Goldfarb J, Scaramellini C, Leff P and Clarke W P (1998) Effector Pathway-Dependent Relative Efficacy at Serotonin Type 2A and 2C Receptors: Evidence for Agonist-Directed Trafficking of Receptor Stimulus. *Mol Pharmacol* 54:94-104.
- Berman K and Meyer-Lindenberg A (2004) Functional brain imaging studies in schizophrenia, in *Neurobiology of Mental Illness, Second Edition* (Charney DS and Nestler EJ eds) pp 311-323, Oxford University Press, New York.
- Berry SA, Shah M C, Khan N and Roth B L (1996) Rapid Agonist-Induced Internalization of the 5-Hydroxytryptamine_{2A} Receptor Occurs Via the Endosome Pathway in Vitro. *Mol Pharmacol* 50:306-313.
- Bhugra D (2005) The Global Prevalence of Schizophrenia. *PLoS Med* 2:e151.
- Bock HH and Herz J (2003) Reelin Activates SRC Family Tyrosine Kinases in Neurons. *Curr Biol* 13:18-26.
- Bock HH, Jossin Y, Liu P, Forster E, May P, Goffinet A M and Herz J (2003) Phosphatidylinositol 3-Kinase Interacts With the Adaptor Protein Dab1 in Response to Reelin Signaling and Is Required for Normal Cortical Lamination. *J Biol Chem* 278:38772-38779.

- Bockaert J, Fagni L, Dumuis A and Marin P (2004) GPCR Interacting Proteins (GIP). *Pharmacol Ther* 103:203-221.
- Bosier B and Hermans E (2007) Versatility of GPCR Recognition by Drugs: From Biological Implications to Therapeutic Relevance. *Trends Pharmacol Sci* 28:438-446.
- Bozzi Y and Borrelli E (2006) Dopamine in Neurotoxicity and Neuroprotection: What Do D2 Receptors Have to Do With It? *Trends Neurosci* 29:167-174.
- Bradford MM (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Braff DL and Light G A (2005) The Use of Neurophysiological Endophenotypes to Understand the Genetic Basis of Schizophrenia. *Dialogues Clin Neurosci* 7:125-135.
- Brea J (2004) Estudio De la Señalización Intracelular de los Receptores 5-HT₂. Evaluación Diferencial Para Antipsicóticos. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela.
- Brea J, Castro M, Giraldo J, Lopez-Gimenez J F, Padin J F, Quintian F, Cadavid M I, Vilaro M T, Mengod G, Berg K A, Clarke W P, Vilardaga J P, Milligan G and Loza M I (2009) Evidence for Distinct Antagonist-Revealed Functional States of 5-Hydroxytryptamine(2A) Receptor Homodimers. *Mol Pharmacol* 75:1380-1391.
- Brea J, Masaguer C F, Villazon M, Cadavid M I, Ravina E, Fontaine F, Dezi C, Pastor M, Sanz F and Loza M I (2003) Conformationally Constrained Butyrophenones As New Pharmacological Tools to Study 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} Receptor Behaviours. *Eur J Med Chem* 38:433-440.
- Brea J, Rodrigo J, Carrieri A, Sanz F, Cadavid M I, Enguix M J, Villazon M, Mengod G, Caro Y, Masaguer C F, Ravina E, Centeno N B, Carotti A and Loza M I (2002) New Serotonin 5-HT(2A), 5-HT(2B), and 5-HT(2C) Receptor Antagonists: Synthesis, Pharmacology, 3D-QSAR, and Molecular Modeling of (Aminoalkyl)Benzo and Heterocycloalkanones. *J Med Chem* 45:54-71.
- Bridges TM and Lindsley C W (2008) G-Protein-Coupled Receptors: From Classical Modes of Modulation to Allosteric Mechanisms. *ACS Chem Biol* 3:530-541.
- Brigman JL, Padukiewicz K E, Sutherland M L and Rothblat L A (2006) Executive Functions in the Heterozygous Reeler Mouse Model of Schizophrenia. *Behav Neurosci* 120:984-988.
- Broadbent J, Grahame N J and Cunningham C L (1995) Haloperidol Prevents Ethanol-Stimulated Locomotor Activity but Fails to Block Sensitization. *Psychopharmacology (Berl)* 120:475-482.
- Bullock WM, Paz R D, Roberts R C, Andreasen N C and Perrone-Bizzozero N I (2006) Gene Expression Alterations in the Cerebellum of Patients With Schizophrenia Revealed By DNA Microarray Analysis. *J Neurochem* 96 (suppl 1):34.

- Burnet PW, Eastwood S L and Harrison P J (1996) 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} Receptor MRNAs and Binding Site Densities Are Differentially Altered in Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 15:442-455.
- Carpenter WT and Koenig J I (2008) The Evolution of Drug Development in Schizophrenia: Past Issues and Future Opportunities. *Neuropsychopharmacology* 33:2061-2079.
- Casado V, Cortes A, Ciruela F, Mallol J, Ferre S, Lluís C, Canela E I and Franco R (2007) Old and New Ways to Calculate the Affinity of Agonists and Antagonists Interacting With G-Protein-Coupled Monomeric and Dimeric Receptors: the Receptor-Dimer Cooperativity Index. *Pharmacol Ther* 116:343-354.
- Chabre M and le M M (2005) Monomeric G-Protein-Coupled Receptor As a Functional Unit. *Biochemistry* 44:9395-9403.
- Chai X, Forster E, Zhao S, Bock H H and Frotscher M (2009) Reelin Stabilizes the Actin Cytoskeleton of Neuronal Processes by Inducing N-Cofilin Phosphorylation at Serine3. *J Neurosci* 29:288-299.
- Chen J, Lipska B K and Weinberger D R (2006) Genetic Mouse Models of Schizophrenia: From Hypothesis-Based to Susceptibility Gene-Based Models. *Biol Psychiatry* 59:1180-1188.
- Chen ML and Chen C H (2005) Microarray Analysis of Differentially Expressed Genes in Rat Frontal Cortex Under Chronic Risperidone Treatment. *Neuropsychopharmacology* 30:268-277.
- Chen ML, Chen S Y, Huang C H and Chen C H (2002) Identification of a Single Nucleotide Polymorphism at the 5' Promoter Region of Human Reelin Gene and Association Study With Schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7:447-448.
- Chen Y, Beffert U, Ertunc M, Tang T S, Kavalali E T, Bezprozvanny I and Herz J (2005) Reelin Modulates NMDA Receptor Activity in Cortical Neurons. *J Neurosci* 25:8209-8216.
- Cheng Y and Prusoff W H (1973) Relationship Between the Inhibition Constant (K₁) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 Per Cent Inhibition (I₅₀) of an Enzymatic Reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099-3108.
- Christopoulos A and Kenakin T (2002) G Protein-Coupled Receptor Allosterism and Complexing. *Pharmacol Rev* 54:323-374.
- Clementz BA, Geyer M A and Braff D L (1998) Poor P50 Suppression Among Schizophrenia Patients and Their First-Degree Biological Relatives. *Am J Psychiatry* 155:1691-1694.
- Conn PJ, Christopoulos A and Lindsley C W (2009) Allosteric Modulators of GPCRs: a Novel Approach for the Treatment of CNS Disorders. *Nat Rev Drug Discov* 8:41-54.
- Cools R, Roberts A C and Robbins T W (2008) Serotonergic Regulation of Emotional and Behavioural Control Processes. *Trends Cogn Sci* 12:31-40.
- Cooper JA (2008) A Mechanism for Inside-Out Lamination in the Neocortex. *Trends Neurosci* 31:113-119.

Cooper JR, Bloom F E and Roth R H (2003) Dopamine, in *The Biochemical Basis of Neuropharmacology Eighth Edition* pp 225-270, Oxford University Press, New York.

Costa E, Chen Y, Davis J, Dong E, Noh J S, Tremolizzo L, Veldic M, Grayson D R and Guidotti A (2002a) REELIN and Schizophrenia: a Disease at the Interface of the Genome and the Epigenome. *Mol Interv* 2:47-57.

Costa E, Davis J, Grayson D R, Guidotti A, Pappas G D and Pesold C (2001) Dendritic Spine Hypoplasticity and Downregulation of Reelin and GABAergic Tone in Schizophrenia Vulnerability. *Neurobiol Dis* 8:723-742.

Costa E, Davis J, Pesold C, Tueting P and Guidotti A (2002b) The Heterozygote Reeler Mouse As a Model for the Development of a New Generation of Antipsychotics. *Curr Opin Pharmacol* 2:56-62.

Costa E, Grayson D R and Guidotti A (2003) Epigenetic Downregulation of GABAergic Function in Schizophrenia: Potential for Pharmacological Intervention? *Mol Interv* 3:220-229.

Cullen TJ, Walker M A, Eastwood S L, Esiri M M, Harrison P J and Crow T J (2006) Anomalies of Asymmetry of Pyramidal Cell Density and Structure in Dorsolateral Prefrontal Cortex in Schizophrenia. *Br J Psychiatry* 188:26-31.

D'Arcangelo G (2005) The Reeler Mouse: Anatomy of a Mutant. *Int Rev Neurobiol* 71:383-417.

D'Arcangelo G (2006) Reelin Mouse Mutants As Models of Cortical Development Disorders. *Epilepsy Behav* 8:81-90.

D'Arcangelo G and Curran T (1998) Reeler: New Tales on an Old Mutant Mouse. *Bioessays* 20:235-244.

D'Arcangelo G, Homayouni R, Keshvara L, Rice D S, Sheldon M and Curran T (1999) Reelin Is a Ligand for Lipoprotein Receptors. *Neuron* 24:471-479.

D'Arcangelo G, Miao G G, Chen S C, Soares H D, Morgan J I and Curran T (1995) A Protein Related to Extracellular Matrix Proteins Deleted in the Mouse Mutant Reeler. *Nature* 374:719-723.

D'Arcangelo G, Nakajima K, Miyata T, Ogawa M, Mikoshiba K and Curran T (1997) Reelin Is a Secreted Glycoprotein Recognized by the CR-50 Monoclonal Antibody. *J Neurosci* 17:23-31.

de Bergeyck V, Nakajima K, Lambert De R C, Naerhuyzen B, Goffinet A M, Miyata T, Ogawa M and Mikoshiba K (1997) A Truncated Reelin Protein Is Produced but Not Secreted in the 'Orleans' Reeler Mutation (Reln[RI-Orl]). *Brain Res Mol Brain Res* 50:85-90.

De Lean A., Stadel J M and Lefkowitz R J (1980) A Ternary Complex Model Explains the Agonist-Specific Binding Properties of the Adenylate Cyclase-Coupled Beta-Adrenergic Receptor. *J Biol Chem* 255:7108-7117.

de Leon J. (2009) The Future (or Lack of Future) of Personalized Prescription in Psychiatry. *Pharmacol Res* 59:81-89.

- de Leon J., Diaz F J, Wedlund P, Josiassen R C, Cooper T B and Simpson G M (2004) Haloperidol Half-Life After Chronic Dosing. *J Clin Psychopharmacol* 24:656-660.
- De Oliveira I and Juruena M F (2006) Treatment of Psychosis: 30 Years of Progress. *J Clin Pharm Ther* 31:523-534.
- Dean B (2003) The Cortical Serotonin_{2A} Receptor and the Pathology of Schizophrenia: a Likely Accomplice. *J Neurochem* 85:1-13.
- Dean B and Hayes W (1996) Decreased Frontal Cortical Serotonin_{2A} Receptors in Schizophrenia. *Schizophr Res* 21:133-139.
- Dean B, Hayes W, Opeskin K, Naylor L, Pavey G, Hill C, Keks N and Copolov D L (1996) Serotonin₂ Receptors and the Serotonin Transporter in the Schizophrenic Brain. *Behav Brain Res* 73:169-175.
- Dean B, Pavey G and Opeskin K (1997) [³H]Raclopride Binding to Brain Tissue From Subjects With Schizophrenia: Methodological Aspects. *Neuropharmacology* 36:779-786.
- DeSilva U, D'Arcangelo G, Braden V V, Chen J, Miao G G, Curran T and Green E D (1997) The Human Reelin Gene: Isolation, Sequencing, and Mapping on Chromosome 7. *Genome Res* 7:157-164.
- Di Matteo V, Di Giovanni G, Pierucci M and Esposito E (2008) Serotonin Control of Central Dopaminergic Function: Focus on in Vivo Microdialysis Studies. *Prog Brain Res* 172:7-44.
- Dixon LB, Dickerson F, Bellack A S, Bennett M, Dickinson D, Goldberg R W, Lehman A, Tenhula W N, Calmes C, Pasillas R M, Peer J and Kreyenbuhl J (2010) The 2009 Schizophrenia PORT Psychosocial Treatment Recommendations and Summary Statements. *Schizophr Bull* 36:48-70.
- Dong E, Caruncho H, Liu W S, Smalheiser N R, Grayson D R, Costa E and Guidotti A (2003) A Reelin-Integrin Receptor Interaction Regulates Arc mRNA Translation in Synaptoneuroosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:5479-5484.
- Dulabon L, Olson E C, Taglienti M G, Eisenhuth S, McGrath B, Walsh C A, Kreidberg J A and Anton E S (2000) Reelin Binds Alpha₃beta₁ Integrin and Inhibits Neuronal Migration. *Neuron* 27:33-44.
- Durroux T (2005) Principles: a Model for the Allosteric Interactions Between Ligand Binding Sites Within a Dimeric GPCR. *Trends Pharmacol Sci* 26:376-384.
- Dziedzicka-Wasylewska M (2004) Brain Dopamine Receptors--Research Perspectives and Potential Sites of Regulation. *Pol J Pharmacol* 56:659-671.
- Eastwood SL, Burnet P W, Gittins R, Baker K and Harrison P J (2001) Expression of Serotonin 5-HT_{2A} Receptors in the Human Cerebellum and Alterations in Schizophrenia. *Synapse* 42:104-114.
- Eastwood SL and Harrison P J (2003) Interstitial White Matter Neurons Express Less Reelin and Are Abnormally Distributed in Schizophrenia: Towards an Integration of Molecular and Morphologic Aspects of the Neurodevelopmental Hypothesis. *Mol Psychiatry* 8:769, 821-769, 831.

Eastwood SL and Harrison P J (2006) Cellular Basis of Reduced Cortical Reelin Expression in Schizophrenia. *Am J Psychiatry* 163:540-542.

Eastwood SL, Law A J, Everall I P and Harrison P J (2003) The Axonal Chemorepellant Semaphorin 3A Is Increased in the Cerebellum in Schizophrenia and May Contribute to Its Synaptic Pathology. *Mol Psychiatry* 8:148-155.

Egan C, Grinde E, DuPre A, Roth B L, Hake M, Teitler M and Herrick-Davis K (2000) Agonist High and Low Affinity State Ratios Predict Drug Intrinsic Activity and a Revised Ternary Complex Mechanism at Serotonin 5-HT(2A) and 5-HT(2C) Receptors. *Synapse* 35:144-150.

Elizondo Armendáriz JJ (2008) Clozapina: Una Visión Histórica y Papel Actual En La Esquizofrenia Resistente Al Tratamiento. *Arch Gen Psychiatry* 49(2):135-144.

Enguix MJ, Sanchez L, Villazon M, Brea J, Tristan H, Caruncho H J, Cadavid M I and Loza M I (2003) Differential Regulation of Rat Peripheral 5-HT(2A) and 5-HT(2B) Receptor Systems: Influence of Drug Treatment. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 368:79-90.

Erritzoe D, Rasmussen H, Kristiansen K T, Frokjaer V G, Haugbol S, Pinborg L, Baare W, Svarer C, Madsen J, Lublin H, Knudsen G M and Glenthøj B Y (2008) Cortical and Subcortical 5-HT_{2A} Receptor Binding in Neuroleptic-Naive First-Episode Schizophrenic Patients. *Neuropsychopharmacology* 33:2435-2441.

Falconer DS (1951) Two New Mutants, "Trembler" and "Reeler", With Neurological Actions in the House Mouse. *J Genetic* 50:192-201.

Falloon IR, Montero I, Sungur M, Mastroeni A, Malm U, Economou M, Grawe R, Harangozo J, Mizuno M, Murakami M, Hager B, Held T, Veltro F and Gedye R (2004) Implementation of Evidence-Based Treatment for Schizophrenic Disorders: Two-Year Outcome of an International Field Trial of Optimal Treatment. *World Psychiatry* 3:104-109.

Farde L, Nordstrom A L, Wiesel F A, Pauli S, Halldin C and Sedvall G (1992) Positron Emission Tomographic Analysis of Central D1 and D2 Dopamine Receptor Occupancy in Patients Treated With Classical Neuroleptics and Clozapine. Relation to Extrapyrmidal Side Effects. *Arch Gen Psychiatry* 49:538-544.

Farde L, Wiesel F A, Stone-Elander S, Halldin C, Nordstrom A L, Hall H and Sedvall G (1990) D2 Dopamine Receptors in Neuroleptic-Naive Schizophrenic Patients. A Positron Emission Tomography Study With [¹¹C]Raclopride. *Arch Gen Psychiatry* 47:213-219.

Fatemi SH (2001) Reelin Mutations in Mouse and Man: From Reeler Mouse to Schizophrenia, Mood Disorders, Autism and Lissencephaly. *Mol Psychiatry* 6:129-133.

Fatemi SH, Earle J A and McMenomy T (2000) Reduction in Reelin Immunoreactivity in Hippocampus of Subjects With Schizophrenia, Bipolar Disorder and Major Depression. *Mol Psychiatry* 5:654-63, 571.

Fatemi SH and Folsom T D (2009) The Neurodevelopmental Hypothesis of Schizophrenia, Revisited. *Schizophr Bull* 35:528-548.

- Fatemi SH, Kroll J L and Strydom M (2001) Altered Levels of Reelin and Its Isoforms in Schizophrenia and Mood Disorders. *Neuroreport* 12:3209-3215.
- Fatemi SH, Reutiman T J and Folsom T D (2008) The Role of Reelin in Etiology and Treatment of Psychiatric Disorders, in *Reelin Glycoprotein: Structure, Biology and Treatment of Psychiatric Disorders* (Fatemi SH ed) pp 317-339, Springer, Minneapolis.
- Fatemi SH, Reutiman T J and Folsom T D (2009) Chronic Psychotropic Drug Treatment Causes Differential Expression of Reelin Signaling System in Frontal Cortex of Rats. *Schizophr Res* 111:138-152.
- Fatemi SH, Strydom M, Earle J A, Rahimi-Niknam M and Egan E (2005) GABAergic Dysfunction in Schizophrenia and Mood Disorders As Reflected by Decreased Levels of Glutamic Acid Decarboxylase 65 and 67 KDa and Reelin Proteins in Cerebellum. *Schizophr Res* 72:109-122.
- Fenton AW (2008) Allosterity: an Illustrated Definition for the 'Second Secret of Life'. *Trends Biochem Sci* 33:420-425.
- Flaherty L, Messer A, Russell L B and Rinchik E M (1992) Chlorambucil-Induced Mutations in Mice Recovered in Homozygotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:2859-2863.
- Franco R, Casado V, Cortes A, Mallol J, Ciruela F, Ferre S, Lluís C and Canela E I (2008a) G-Protein-Coupled Receptor Heteromers: Function and Ligand Pharmacology. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S90-S98.
- Franco R, Casado V, Cortes A, Perez-Capote K, Mallol J, Canela E, Ferre S and Lluís C (2008b) Novel Pharmacological Targets Based on Receptor Heteromers. *Brain Res Rev* 58:475-482.
- Franco R, Casado V, Mallol J, Ferrada C, Ferre S, Fuxe K, Cortes A, Ciruela F, Lluís C and Canela E I (2006) The Two-State Dimer Receptor Model: a General Model for Receptor Dimers. *Mol Pharmacol* 69:1905-1912.
- Franco R, Casado V, Mallol J, Ferre S, Fuxe K, Cortes A, Ciruela F, Lluís C and Canela E I (2005) Dimer-Based Model for Heptaspanning Membrane Receptors. *Trends Biochem Sci* 30:360-366.
- Fredriksson R, Lagerstrom M C, Lundin L G and Schiöth H B (2003) The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogue Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* 63:1256-1272.
- Freedman R (2003) Schizophrenia. *N Engl J Med* 349:1738-1749.
- Frotscher M (2010) Role for Reelin in Stabilizing Cortical Architecture. *Trends Neurosci* 33:407-414.
- Frotscher M, Chai X, Bock H H, Haas C A, Forster E and Zhao S (2009) Role of Reelin in the Development and Maintenance of Cortical Lamination. *J Neural Transm* 116:1451-1455.
- Gether U (2000) Uncovering Molecular Mechanisms Involved in Activation of G Protein-Coupled Receptors. *Endocr Rev* 21:90-113.

Geyer MA (2008) Developing Translational Animal Models for Symptoms of Schizophrenia or Bipolar Mania. *Neurotox Res* 14:71-78.

Geyer MA and Moghaddam B (2002) Animal models relevant to schizophrenia disorders, in *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation o Progress* (Davis KL, Charney D, Coyle JT and Nemeroff C eds) pp 689-701, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.

Geyer MA and Vollenweider F X (2008) Serotonin Research: Contributions to Understanding Psychoses. *Trends Pharmacol Sci* 29:445-453.

Gilchrist A (2007) Modulating G-Protein-Coupled Receptors: From Traditional Pharmacology to Allosterics. *Trends Pharmacol Sci* 28:431-437.

Gilmore EC and Herrup K (2000) Cortical Development: Receiving Reelin. *Curr Biol* 10:R162-R166.

Glantz LA and Lewis D A (2000) Decreased Dendritic Spine Density on Prefrontal Cortical Pyramidal Neurons in Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 57:65-73.

Goldberger C, Gourion D, Leroy S, Schurhoff F, Bourdel M C, Leboyer M and Krebs M O (2005) Population-Based and Family-Based Association Study of 5'UTR Polymorphism of the Reelin Gene and Schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 137B:51-55.

Gonzalez-Maeso J and Sealfon S C (2009) Psychedelics and Schizophrenia. *Trends Neurosci* 32:225-232.

Gonzalez-Maeso J, Weisstaub N V, Zhou M, Chan P, Ivic L, Ang R, Lira A, Bradley-Moore M, Ge Y, Zhou Q, Sealfon S C and Gingrich J A (2007) Hallucinogens Recruit Specific Cortical 5-HT(2A) Receptor-Mediated Signaling Pathways to Affect Behavior. *Neuron* 53:439-452.

Goto Y and Grace A A (2007) The Dopamine System and the Pathophysiology of Schizophrenia: a Basic Science Perspective. *Int Rev Neurobiol* 78:41-68.

Gray JA and Roth B L (2001) Paradoxical Trafficking and Regulation of 5-HT(2A) Receptors by Agonists and Antagonists. *Brain Res Bull* 56:441-451.

Gray JA and Roth B L (2007) The Pipeline and Future of Drug Development in Schizophrenia. *Mol Psychiatry* 12:904-922.

Grayson DR, Jia X, Chen Y, Sharma R P, Mitchell C P, Guidotti A and Costa E (2005) Reelin Promoter Hypermethylation in Schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:9341-9346.

Grupo de trabajo de la Guía de Práctica Clínica sobre la Esquizofrenia y el Trastorno Psicótico Incipiente (2009) Fórum De Salut Mental, Coordinación. Guía De Práctica Clínica Sobre La Esquizofrenia y El Trastorno Psicótico Incipiente. Madrid: Plan De Calidad Para El Sistema Nacional De Salud Del Ministerio De Sanidad y Consumo. Agència D'Avaluació De Tecnologia i Recerca Mèdiques. *Guía de Práctica Clínica: AATRM N° 2006/05-2*.

Guidotti A, Auta J, Davis J M, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson D R, Impagnatiello F, Pandey G, Pesold C, Sharma R, Uzunov D and Costa E (2000) Decrease in

- Reelin and Glutamic Acid Decarboxylase67 (GAD67) Expression in Schizophrenia and Bipolar Disorder: a Postmortem Brain Study. *Arch Gen Psychiatry* 57:1061-1069.
- Guidotti A, Dong E, Kundakovic M, Satta R, Grayson D R and Costa E (2009) Characterization of the Action of Antipsychotic Subtypes on Valproate-Induced Chromatin Remodeling. *Trends Pharmacol Sci* 30:55-60.
- Guillin O, Abi-Dargham A and Laruelle M (2007) Neurobiology of Dopamine in Schizophrenia. *Int Rev Neurobiol* 78:1-39.
- Guo W, Shi L, Filizola M, Weinstein H and Javitch J A (2005) Crosstalk in G Protein-Coupled Receptors: Changes at the Transmembrane Homodimer Interface Determine Activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17495-17500.
- Guo W, Shi L and Javitch J A (2003) The Fourth Transmembrane Segment Forms the Interface of the Dopamine D2 Receptor Homodimer. *J Biol Chem* 278:4385-4388.
- Gurevich EV and Joyce J N (1997) Alterations in the Cortical Serotonergic System in Schizophrenia: a Postmortem Study. *Biol Psychiatry* 42:529-545.
- Hales RE and Yudofsky S C (2005) *Tratado De Psiquiatria Clínica*. Masson, Barcelona.
- Hall DA (2000) Modeling the Functional Effects of Allosteric Modulators at Pharmacological Receptors: an Extension of the Two-State Model of Receptor Activation. *Mol Pharmacol* 58:1412-1423.
- Hall H, Lawyer G, Sillen A, Jonsson E G, Agartz I, Terenius L and Arnborg S (2007) Potential Genetic Variants in Schizophrenia: a Bayesian Analysis. *World J Biol Psychiatry* 8:12-22.
- Harrison C and Traynor J R (2003) The [³⁵S]GTPgammaS Binding Assay: Approaches and Applications in Pharmacology. *Life Sci* 74:489-508.
- Harrison PJ (1999a) Neurochemical Alterations in Schizophrenia Affecting the Putative Receptor Targets of Atypical Antipsychotics. Focus on Dopamine (D1, D3, D4) and 5-HT_{2a} Receptors. *Br J Psychiatry Suppl* 12-22.
- Harrison PJ (1999b) The Neuropathology of Schizophrenia. A Critical Review of the Data and Their Interpretation. *Brain* 122 (Pt 4):593-624.
- Harrison PJ, Law A J and Eastwood S L (2003) Glutamate Receptors and Transporters in the Hippocampus in Schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 1003:94-101.
- Harrison PJ and Weinberger D R (2005) Schizophrenia Genes, Gene Expression, and Neuropathology: on the Matter of Their Convergence. *Mol Psychiatry* 10:40-68.
- Heitzler D, Crepieux P, Poupon A, Clement F, Fages F and Reiter E (2009) Towards a Systems Biology Approach of G Protein-Coupled Receptor Signalling: Challenges and Expectations. *C R Biol* 332:947-957.
- Hernandez I and Sokolov B P (2000) Abnormalities in 5-HT_{2A} Receptor mRNA Expression in Frontal Cortex of Chronic Elderly Schizophrenics With Varying Histories of Neuroleptic Treatment. *J Neurosci Res* 59:218-225.

Herz J and Chen Y (2006) Reelin, Lipoprotein Receptors and Synaptic Plasticity. *Nat Rev Neurosci* 7:850-859.

Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell B W, Goffinet A, Mumby M C, Cooper J A and Herz J (1999) Direct Binding of Reelin to VLDL Receptor and ApoE Receptor 2 Induces Tyrosine Phosphorylation of Disabled-1 and Modulates Tau Phosphorylation. *Neuron* 24:481-489.

Hietala J, Syvalahti E, Vuorio K, Nagren K, Lehtikoinen P, Ruotsalainen U, Rakkolainen V, Lehtinen V and Wegelius U (1994) Striatal D2 Dopamine Receptor Characteristics in Neuroleptic-Naive Schizophrenic Patients Studied With Positron Emission Tomography. *Arch Gen Psychiatry* 51:116-123.

Highley JR, Walker M A, McDonald B, Crow T J and Esiri M M (2003) Size of Hippocampal Pyramidal Neurons in Schizophrenia. *Br J Psychiatry* 183:414-417.

Hill K, Mann L, Laws K R, Stephenson C M, Nimmo-Smith I and McKenna P J (2004) Hypofrontality in Schizophrenia: a Meta-Analysis of Functional Imaging Studies. *Acta Psychiatr Scand* 110:243-256.

Hirvonen J, van Erp T G, Huttunen J, Aalto S, Nagren K, Huttunen M, Lonnqvist J, Kaprio J, Hietala J and Cannon T D (2005) Increased Caudate Dopamine D2 Receptor Availability As a Genetic Marker for Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 62:371-378.

Howell BW, Hawkes R, Soriano P and Cooper J A (1997) Neuronal Position in the Developing Brain Is Regulated by Mouse Disabled-1. *Nature* 389:733-737.

Howes OD, Egerton A, Allan V, McGuire P, Stokes P and Kapur S (2009) Mechanisms Underlying Psychosis and Antipsychotic Treatment Response in Schizophrenia: Insights From PET and SPECT Imaging. *Curr Pharm Des* 15:2550-2559.

Howes OD and Kapur S (2009) The Dopamine Hypothesis of Schizophrenia: Version III--the Final Common Pathway. *Schizophr Bull* 35:549-562.

Hoyer D, Hannon J P and Martin G R (2002) Molecular, Pharmacological and Functional Diversity of 5-HT Receptors. *Pharmacol Biochem Behav* 71:533-554.

Huang C and D'Arcangelo G (2008) The Reelin Gene and Its Functions in Brain Development, in *Reelin Glycoprotein: Structure, Biology and Roles in Health and Disease* (Fatemi SH ed) pp 1-13, Springer, Minneapolis.

Huang CH and Chen C H (2006) Absence of Association of a Polymorphic GGC Repeat at the 5' Untranslated Region of the Reelin Gene With Schizophrenia. *Psychiatry Res* 142:89-92.

Huang Y, Magdaleno S, Hopkins R, Slaughter C, Curran T and Keshvara L (2004) Tyrosine Phosphorylated Disabled 1 Recruits Crk Family Adapter Proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 318:204-212.

Huang Z (2009) Molecular Regulation of Neuronal Migration During Neocortical Development. *Mol Cell Neurosci* 42:11-22.

Hur EM and Kim K T (2002) G Protein-Coupled Receptor Signalling and Cross-Talk: Achieving Rapidity and Specificity. *Cell Signal* 14:397-405.

- Hurlemann R, Boy C, Meyer P T, Scherk H, Wagner M, Herzog H, Coenen H H, Vogeley K, Falkai P, Zilles K, Maier W and Bauer A (2005) Decreased Prefrontal 5-HT_{2A} Receptor Binding in Subjects at Enhanced Risk for Schizophrenia. *Anat Embryol (Berl)* 210:519-523.
- Hurlemann R, Matusch A, Kuhn K U, Berning J, Elmenhorst D, Winz O, Kolsch H, Zilles K, Wagner M, Maier W and Bauer A (2008) 5-HT_{2A} Receptor Density Is Decreased in the at-Risk Mental State. *Psychopharmacology (Berl)* 195:579-590.
- Hurley MJ, Stubbs C M, Jenner P and Marsden C D (1996) Effect of Chronic Treatment With Typical and Atypical Neuroleptics on the Expression of Dopamine D₂ and D₃ Receptors in Rat Brain. *Psychopharmacology (Berl)* 128:362-370.
- Hyman SE and Fenton W S (2003) Medicine. What Are the Right Targets for Psychopharmacology? *Science* 299:350-351.
- Ichikawa J, Ishii H, Bonaccorso S, Fowler W L, O'Laughlin I A and Meltzer H Y (2001) 5-HT_{2A} and D₂ Receptor Blockade Increases Cortical DA Release Via 5-HT_{1A} Receptor Activation: a Possible Mechanism of Atypical Antipsychotic-Induced Cortical Dopamine Release. *J Neurochem* 76:1521-1531.
- Ignatova N, Sindic C J and Goffinet A M (2004) Characterization of the Various Forms of the Reelin Protein in the Cerebrospinal Fluid of Normal Subjects and in Neurological Diseases. *Neurobiol Dis* 15:326-330.
- Ikeda Y and Terashima T (1997) Expression of Reelin, the Gene Responsible for the Reeler Mutation, in Embryonic Development and Adulthood in the Mouse. *Dev Dyn* 210:157-172.
- Impagnatiello F, Guidotti A R, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu M G, Uzunov D P, Smalheiser N R, Davis J M, Pandey G N, Pappas G D, Tueting P, Sharma R P and Costa E (1998) A Decrease of Reelin Expression As a Putative Vulnerability Factor in Schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15718-15723.
- Ingraham LJ and Kety S S (2000) Adoption Studies of Schizophrenia. *Am J Med Genet* 97:18-22.
- Isosaka T, Hattori K and Yagi T (2006) NMDA-Receptor Proteins Are Upregulated in the Hippocampus of Postnatal Heterozygous Reeler Mice. *Brain Res* 1073-1074:11-19.
- Jacoby E, Bouhelal R, Gerspacher M and Seuwen K (2006) The 7 TM G-Protein-Coupled Receptor Target Family. *ChemMedChem* 1:761-782.
- Jeon YW and Polich J (2003) Meta-Analysis of P300 and Schizophrenia: Patients, Paradigms, and Practical Implications. *Psychophysiology* 40:684-701.
- Johnston CA and Siderovski D P (2007) Receptor-Mediated Activation of Heterotrimeric G-Proteins: Current Structural Insights. *Mol Pharmacol* 72:219-230.
- Jossin Y (2008) Chemistry of reelin, in *Reelin Glycoprotein: Structure, Biology and Roles in Health and Disease* (Fatemi SH ed) pp 37-47, Springer, Minneapolis.
- Jossin Y, Bar I, Ignatova N, Tissir F, De Rouvroit C L and Goffinet A M (2003) The Reelin Signaling Pathway: Some Recent Developments. *Cereb Cortex* 13:627-633.

Jossin Y and Goffinet A M (2007) Reelin Signals Through Phosphatidylinositol 3-Kinase and Akt to Control Cortical Development and Through MTor to Regulate Dendritic Growth. *Mol Cell Biol* 27:7113-7124.

Jossin Y, Ignatova N, Hiesberger T, Herz J, Lambert De R C and Goffinet A M (2004) The Central Fragment of Reelin, Generated by Proteolytic Processing in Vivo, Is Critical to Its Function During Cortical Plate Development. *J Neurosci* 24:514-521.

Joyce JN, Lexow N, Bird E and Winokur A (1988) Organization of Dopamine D1 and D2 Receptors in Human Striatum: Receptor Autoradiographic Studies in Huntington's Disease and Schizophrenia. *Synapse* 2:546-557.

Kapur S and Mamo D (2003) Half a Century of Antipsychotics and Still a Central Role for Dopamine D2 Receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:1081-1090.

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

Kapur S and Remington G (2001b) Dopamine D(2) Receptors and Their Role in Atypical Antipsychotic Action: Still Necessary and May Even Be Sufficient. *Biol Psychiatry* 50:873-883.

Kapur S and Seeman P (2001) Does Fast Dissociation From the Dopamine D(2) Receptor Explain the Action of Atypical Antipsychotics?: A New Hypothesis. *Am J Psychiatry* 158:360-369.

Katsuyama Y and Terashima T (2009) Developmental Anatomy of Reeler Mutant Mouse. *Dev Growth Differ* 51:271-286.

Kenakin T (2001) Inverse, Protean, and Ligand-Selective Agonism: Matters of Receptor Conformation. *FASEB J* 15:598-611.

Kenakin T (2002a) Drug Efficacy at G Protein-Coupled Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:349-379.

Kenakin T (2002b) Efficacy at G-Protein-Coupled Receptors. *Nat Rev Drug Discov* 1:103-110.

Kenakin T (2003) Ligand-Selective Receptor Conformations Revisited: the Promise and the Problem. *Trends Pharmacol Sci* 24:346-354.

Kenakin T (2007) Collateral Efficacy in Drug Discovery: Taking Advantage of the Good (Allosteric) Nature of 7TM Receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28:407-415.

Kenakin T (2010) Functional Selectivity and Biased Receptor Signaling. *J Pharmacol Exp Ther*.

Kenakin T and Miller L J (2010) Seven Transmembrane Receptors As Shapeshifting Proteins: the Impact of Allosteric Modulation and Functional Selectivity on New Drug Discovery. *Pharmacol Rev* 62:265-304.

Kerjan G and Gleeson J G (2007) A Missed Exit: Reelin Sets in Motion Dab1 Polyubiquitination to Put the Break on Neuronal Migration. *Genes Dev* 21:2850-2854.

- Kern RS, Glynn S M, Horan W P and Marder S R (2009) Psychosocial Treatments to Promote Functional Recovery in Schizophrenia. *Schizophr Bull* 35:347-361.
- Keshavan MS, Tandon R, Boutros N N and Nasrallah H A (2008) Schizophrenia, "Just the Facts": What We Know in 2008 Part 3: Neurobiology. *Schizophr Res* 106:89-107.
- Keshvara L, Benhayon D, Magdaleno S and Curran T (2001) Identification of Reelin-Induced Sites of Tyrosyl Phosphorylation on Disabled 1. *J Biol Chem* 276:16008-16014.
- Kestler LP, Walker E and Vega E M (2001) Dopamine Receptors in the Brains of Schizophrenia Patients: a Meta-Analysis of the Findings. *Behav Pharmacol* 12:355-371.
- Kilts CD (2001) The Changing Roles and Targets for Animal Models of Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 50:845-855.
- Knable MB, Barci B M, Webster M J, Meador-Woodruff J and Torrey E F (2004) Molecular Abnormalities of the Hippocampus in Severe Psychiatric Illness: Postmortem Findings From the Stanley Neuropathology Consortium. *Mol Psychiatry* 9:609-20, 544.
- Knable MB, Torrey E F, Webster M J and Bartko J J (2001) Multivariate Analysis of Prefrontal Cortical Data From the Stanley Foundation Neuropathology Consortium. *Brain Res Bull* 55:651-659.
- Kobilka BK (2007) G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. *Biochim Biophys Acta* 1768:794-807.
- Kohno S, Kohno T, Nakano Y, Suzuki K, Ishii M, Tagami H, Baba A and Hattori M (2009) Mechanism and Significance of Specific Proteolytic Cleavage of Reelin. *Biochem Biophys Res Commun* 380:93-97.
- Kolakowski LF, Jr. (1994) GCRDb: a G-Protein-Coupled Receptor Database. *Receptors Channels* 2:1-7.
- Kristiansen K (2004) Molecular Mechanisms of Ligand Binding, Signaling, and Regulation Within the Superfamily of G-Protein-Coupled Receptors: Molecular Modeling and Mutagenesis Approaches to Receptor Structure and Function. *Pharmacol Ther* 103:21-80.
- Kroeze WK, Sheffler D J and Roth B L (2003) G-Protein-Coupled Receptors at a Glance. *J Cell Sci* 116:4867-4869.
- Krueger DD, Howell J L, Hebert B F, Olausson P, Taylor J R and Nairn A C (2006) Assessment of Cognitive Function in the Heterozygous Reeler Mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 189:95-104.
- Kubasak MD, Brooks R, Chen S, Villeda S A and Phelps P E (2004) Developmental Distribution of Reelin-Positive Cells and Their Secreted Product in the Rodent Spinal Cord. *J Comp Neurol* 468:165-178.
- Kubo K, Mikoshiba K and Nakajima K (2002) Secreted Reelin Molecules Form Homodimers. *Neurosci Res* 43:381-388.
- Kuo G, Arnaud L, Kronstad-O'Brien P and Cooper J A (2005) Absence of Fyn and Src Causes a Reeler-Like Phenotype. *J Neurosci* 25:8578-8586.

Lacor PN, Grayson D R, Auta J, Sugaya I, Costa E and Guidotti A (2000) Reelin Secretion From Glutamatergic Neurons in Culture Is Independent From Neurotransmitter Regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3556-3561.

Lambert De Rouvroit C, de B, V, Cortvrindt C, Bar I, Eeckhout Y and Goffinet A M (1999) Reelin, the Extracellular Matrix Protein Deficient in Reeler Mutant Mice, Is Processed by a Metalloproteinase. *Exp Neurol* 156:214-217.

Lambert De Rouvroit C and Goffinet A M (1998) The Reeler Mouse As a Model of Brain Development. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 150:1-106.

Larson J, Hoffman J S, Guidotti A and Costa E (2003) Olfactory Discrimination Learning Deficit in Heterozygous Reeler Mice. *Brain Res* 971:40-46.

Laruelle M (1998) Imaging Dopamine Transmission in Schizophrenia. A Review and Meta-Analysis. *Q J Nucl Med* 42:211-221.

Laruelle M, Abi-Dargham A, Casanova M F, Toti R, Weinberger D R and Kleinman J E (1993) Selective Abnormalities of Prefrontal Serotonergic Receptors in Schizophrenia. A Postmortem Study. *Arch Gen Psychiatry* 50:810-818.

Laruelle M, Jaskiw G E, Lipska B K, Kolachana B, Casanova M F, Kleinman J E and Weinberger D R (1992) D1 and D2 Receptor Modulation in Rat Striatum and Nucleus Accumbens After Subchronic and Chronic Haloperidol Treatment. *Brain Res* 575:47-56.

Laviola G, Ognibene E, Romano E, Adriani W and Keller F (2009) Gene-Environment Interaction During Early Development in the Heterozygous Reeler Mouse: Clues for Modelling of Major Neurobehavioral Syndromes. *Neurosci Biobehav Rev* 33:560-572.

Lawrie SM and Abukmeil S S (1998) Brain Abnormality in Schizophrenia. A Systematic and Quantitative Review of Volumetric Magnetic Resonance Imaging Studies. *Br J Psychiatry* 172:110-120.

Lee T and Seeman P (1980) Elevation of Brain Neuroleptic/Dopamine Receptors in Schizophrenia. *Am J Psychiatry* 137:191-197.

Leff P (1995) The Two-State Model of Receptor Activation. *Trends Pharmacol Sci* 16:89-97.

Lefkowitz RJ, Cotecchia S, Samama P and Costa T (1993) Constitutive Activity of Receptors Coupled to Guanine Nucleotide Regulatory Proteins. *Trends Pharmacol Sci* 14:303-307.

Levenson JM, Qiu S and Weeber E J (2008) The Role of Reelin in Adult Synaptic Function and the Genetic and Epigenetic Regulation of the Reelin Gene. *Biochim Biophys Acta* 1779:422-431.

Lewis DA, Hashimoto T and Volk D W (2005) Cortical Inhibitory Neurons and Schizophrenia. *Nat Rev Neurosci* 6:312-324.

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

- Lewis R, Kapur S, Jones C, DaSilva J, Brown G M, Wilson A A, Houle S and Zipursky R B (1999) Serotonin 5-HT₂ Receptors in Schizophrenia: a PET Study Using [¹⁸F]Setoperone in Neuroleptic-Naive Patients and Normal Subjects. *Am J Psychiatry* 156:72-78.
- Lewis S and Lieberman J (2008) CATIE and CUtLASS: Can We Handle the Truth? *Br J Psychiatry* 192:161-163.
- Leysen JE (2004) 5-HT₂ Receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 3:11-26.
- Leysen JE, Gommeren W and Laduron P M (1978) Spiperone: a Ligand of Choice for Neuroleptic Receptors. 1. Kinetics and Characteristics of in Vitro Binding. *Biochem Pharmacol* 27:307-316.
- Lichtermann D, Karbe E and Maier W (2000) The Genetic Epidemiology of Schizophrenia and of Schizophrenia Spectrum Disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 250:304-310.
- Lieberman JA, Bymaster F P, Meltzer H Y, Deutch A Y, Duncan G E, Marx C E, Aprille J R, Dwyer D S, Li X M, Mahadik S P, Duman R S, Porter J H, Modica-Napolitano J S, Newton S S and Csernansky J G (2008) Antipsychotic Drugs: Comparison in Animal Models of Efficacy, Neurotransmitter Regulation, and Neuroprotection. *Pharmacol Rev* 60:358-403.
- Lieberman JA, Perkins D, Belger A, Chakos M, Jarskog F, Boteva K and Gilmore J (2001) The Early Stages of Schizophrenia: Speculations on Pathogenesis, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *Biol Psychiatry* 50:884-897.
- Liegeois JF, Ichikawa J and Meltzer H Y (2002) 5-HT_{2A} Receptor Antagonism Potentiates Haloperidol-Induced Dopamine Release in Rat Medial Prefrontal Cortex and Inhibits That in the Nucleus Accumbens in a Dose-Dependent Manner. *Brain Res* 947:157-165.
- Lipska BK and Weinberger D R (2000) To Model a Psychiatric Disorder in Animals: Schizophrenia As a Reality Test. *Neuropsychopharmacology* 23:223-239.
- Liu WS, Pesold C, Rodriguez M A, Carboni G, Auta J, Lacor P, Larson J, Condie B G, Guidotti A and Costa E (2001) Down-Regulation of Dendritic Spine and Glutamic Acid Decarboxylase 67 Expressions in the Reelin Haploinsufficient Heterozygous Reeler Mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3477-3482.
- Lomena F, Catafau A M, Parellada E, Bernardo M, Font M, Gutierrez F and Pavia J (2004) Striatal Dopamine D₂ Receptor Density in Neuroleptic-Naive and in Neuroleptic-Free Schizophrenic Patients: an ¹²³I-IBZM-SPECT Study. *Psychopharmacology (Berl)* 172:165-169.
- Lopez-Gimenez JF, Villazon M, Brea J, Loza M I, Palacios J M, Mengod G and Vilaro M T (2001) Multiple Conformations of Native and Recombinant Human 5-Hydroxytryptamine(2a) Receptors Are Labeled by Agonists and Discriminated by Antagonists. *Mol Pharmacol* 60:690-699.
- Lundstrom K (2005) Structural Genomics of GPCRs. *Trends Biotechnol* 23:103-108.
- Luttrell LM (2008) Reviews in Molecular Biology and Biotechnology: Transmembrane Signaling by G Protein-Coupled Receptors. *Mol Biotechnol* 39:239-264.

Magdaleno SM and Curran T (2001) Brain Development: Integrins and the Reelin Pathway. *Curr Biol* 11:R1032-R1035.

Maki P, Veijola J, Jones P B, Murray G K, Koponen H, Tienari P, Miettunen J, Tanskanen P, Wahlberg K E, Koskinen J, Lauronen E and Isohanni M (2005) Predictors of Schizophrenia - a Review. *Br Med Bull* 73-74:1-15.

Malmberg A, Jerning E and Mohell N (1996) Critical Reevaluation of Spiperone and Benzamide Binding to Dopamine D2 Receptors: Evidence for Identical Binding Sites. *Eur J Pharmacol* 303:123-128.

Marcotte ER, Pearson D M and Srivastava L K (2001) Animal Models of Schizophrenia: a Critical Review. *J Psychiatry Neurosci* 26:395-410.

Marinissen MJ and Gutkind J S (2001) G-Protein-Coupled Receptors and Signaling Networks: Emerging Paradigms. *Trends Pharmacol Sci* 22:368-376.

Martinot JL, Peron-Magnan P, Huret J D, Mazoyer B, Baron J C, Boulenger J P, Loc'h C, Maziere B, Caillard V, Loo H and . (1990) Striatal D2 Dopaminergic Receptors Assessed With Positron Emission Tomography and [76Br]Bromospiperone in Untreated Schizophrenic Patients. *Am J Psychiatry* 147:44-50.

Matsumoto I, Inoue Y, Iwazaki T, Pavey G and Dean B (2005) 5-HT_{2A} and Muscarinic Receptors in Schizophrenia: a Postmortem Study. *Neurosci Lett* 379:164-168.

Matsuzaki H, Minabe Y, Nakamura K, Suzuki K, Iwata Y, Sekine Y, Tsuchiya K J, Sugihara G, Suda S, Takei N, Nakahara D, Hashimoto K, Nairn A C, Mori N and Sato K (2007) Disruption of Reelin Signaling Attenuates Methamphetamine-Induced Hyperlocomotion. *Eur J Neurosci* 25:3376-3384.

Maudsley S, Martin B and Luttrell L M (2005) The Origins of Diversity and Specificity in G Protein-Coupled Receptor Signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 314:485-494.

May LT, Leach K, Sexton P M and Christopoulos A (2007) Allosteric Modulation of G Protein-Coupled Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:1-51.

May P, Herz J and Bock H H (2005) Molecular Mechanisms of Lipoprotein Receptor Signalling. *Cell Mol Life Sci* 62:2325-2338.

McCudden CR, Hains M D, Kimple R J, Siderovski D P and Willard F S (2005) G-Protein Signaling: Back to the Future. *Cell Mol Life Sci* 62:551-577.

McGorry PD (2010) Staging in Neuropsychiatry: A Heuristic Model for Understanding, Prevention and Treatment. *Neurotox Res*.

McGorry PD, Hickie I B, Yung A R, Pantelis C and Jackson H J (2006) Clinical Staging of Psychiatric Disorders: a Heuristic Framework for Choosing Earlier, Safer and More Effective Interventions. *Aust N Z J Psychiatry* 40:616-622.

McGrath J, Saha S, Welham J, El S O, MacCauley C and Chant D (2004) A Systematic Review of the Incidence of Schizophrenia: the Distribution of Rates and the Influence of Sex, Urbanicity, Migrant Status and Methodology. *BMC Med* 2:13.

- Meltzer HY (1999) The Role of Serotonin in Antipsychotic Drug Action. *Neuropsychopharmacology* 21:106S-115S.
- Meltzer HY (2004) What's Atypical About Atypical Antipsychotic Drugs? *Curr Opin Pharmacol* 4:53-57.
- Meltzer HY, Alphs L, Green A I, Altamura A C, Anand R, Bertoldi A, Bourgeois M, Chouinard G, Islam M Z, Kane J, Krishnan R, Lindenmayer J P and Potkin S (2003a) Clozapine Treatment for Suicidality in Schizophrenia: International Suicide Prevention Trial (InterSePT). *Arch Gen Psychiatry* 60:82-91.
- Meltzer HY, Li Z, Kaneda Y and Ichikawa J (2003b) Serotonin Receptors: Their Key Role in Drugs to Treat Schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:1159-1172.
- Meltzer HY, Matsubara S and Lee J C (1989) Classification of Typical and Atypical Antipsychotic Drugs on the Basis of Dopamine D-1, D-2 and Serotonin₂ PKi Values. *J Pharmacol Exp Ther* 251:238-246.
- Meyer G (2008) Comparative Anatomy and Evolutionary Roles of Reelin, in *Reelin Glycoprotein: Structure, Biology and Roles in Health and Disease* (Fatemi SH ed) pp 69-87, Springer, Minneapolis.
- Meyer JM (2007) Antipsychotic Safety and Efficacy Concerns. *J Clin Psychiatry* 68 Suppl 14:20-26.
- Meyer-Lindenberg AS, Olsen R K, Kohn P D, Brown T, Egan M F, Weinberger D R and Berman K F (2005) Regionally Specific Disturbance of Dorsolateral Prefrontal-Hippocampal Functional Connectivity in Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 62:379-386.
- Millan MJ, Marin P, Bockaert J and Mannoury la C C (2008) Signaling at G-Protein-Coupled Serotonin Receptors: Recent Advances and Future Research Directions. *Trends Pharmacol Sci* 29:454-464.
- Millar RP and Newton C L (2010) The Year in G Protein-Coupled Receptor Research. *Mol Endocrinol* 24:261-274.
- Milligan G (2003a) Constitutive Activity and Inverse Agonists of G Protein-Coupled Receptors: a Current Perspective. *Mol Pharmacol* 64:1271-1276.
- Milligan G (2003b) Principles: Extending the Utility of [³⁵S]GTP Gamma S Binding Assays. *Trends Pharmacol Sci* 24:87-90.
- Milligan G (2004) G Protein-Coupled Receptor Dimerization: Function and Ligand Pharmacology. *Mol Pharmacol* 66:1-7.
- Milligan G (2008) A Day in the Life of a G Protein-Coupled Receptor: the Contribution to Function of G Protein-Coupled Receptor Dimerization. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1:S216-S229.
- Milligan G (2009) G Protein-Coupled Receptor Hetero-Dimerization: Contribution to Pharmacology and Function. *Br J Pharmacol* 158:5-14.

- Milligan G and Kostenis E (2006) Heterotrimeric G-Proteins: a Short History. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S46-S55.
- Milligan G and Smith N J (2007) Allosteric Modulation of Heterodimeric G-Protein-Coupled Receptors. *Trends Pharmacol Sci* 28:615-620.
- Missale C, Nash S R, Robinson S W, Jaber M and Caron M G (1998) Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* 78:189-225.
- Mita T, Hanada S, Nishino N, Kuno T, Nakai H, Yamadori T, Mizoi Y and Tanaka C (1986) Decreased Serotonin S2 and Increased Dopamine D2 Receptors in Chronic Schizophrenics. *Biol Psychiatry* 21:1407-1414.
- Miyamoto S, Duncan G E, Goff D C and Lieberman J A (2002) Therapeutics of schizophrenia, in *Neuropsychopharmacology: the Fifth Generation of Progress* (Davis KL, Charney D, Coyle TJ and Nemeroff C eds) pp 775-807, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Miyamoto S, Duncan G E, Marx C E and Lieberman J A (2005) Treatments for Schizophrenia: a Critical Review of Pharmacology and Mechanisms of Action of Antipsychotic Drugs. *Mol Psychiatry* 10:79-104.
- Miyamoto S, LaMantia A S, Duncan G E, Sullivan P, Gilmore J H and Lieberman J A (2003) Recent Advances in the Neurobiology of Schizophrenia. *Mol Interv* 3:27-39.
- Miyata T, Nakajima K, Mikoshiba K and Ogawa M (1997) Regulation of Purkinje Cell Alignment by Reelin As Revealed With CR-50 Antibody. *J Neurosci* 17:3599-3609.
- Mohammad-Zadeh LF, Moses L and Gwaltney-Brant S M (2008) Serotonin: a Review. *J Vet Pharmacol Ther* 31:187-199.
- Moller HJ (2003) Amisulpride: Limbic Specificity and the Mechanism of Antipsychotic Atypicality. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27:1101-1111.
- Mustafi D and Palczewski K (2009) Topology of Class A G Protein-Coupled Receptors: Insights Gained From Crystal Structures of Rhodopsins, Adrenergic and Adenosine Receptors. *Mol Pharmacol* 75:1-12.
- Nakajima K, Mikoshiba K, Miyata T, Kudo C and Ogawa M (1997) Disruption of Hippocampal Development in Vivo by CR-50 MAb Against Reelin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8196-8201.
- Ngan ET, Yatham L N, Ruth T J and Liddle P F (2000) Decreased Serotonin 2A Receptor Densities in Neuroleptic-Naive Patients With Schizophrenia: A PET Study Using [(18)F]Setoperone. *Am J Psychiatry* 157:1016-1018.
- Nichols CD and Sanders-Bush E (2001) Serotonin Receptor Signaling and Hallucinogenic Drug Action. *The Heffter Rev of Psychedel Res* 2:73-70.
- Nicola SM, Surmeier J and Malenka R C (2000) Dopaminergic Modulation of Neuronal Excitability in the Striatum and Nucleus Accumbens. *Annu Rev Neurosci* 23:185-215.

- Niu S, Renfro A, Quattrocchi C C, Sheldon M and D'Arcangelo G (2004) Reelin Promotes Hippocampal Dendrite Development Through the VLDLR/ApoER2-Dab1 Pathway. *Neuron* 41:71-84.
- Niu S, Yabut O and D'Arcangelo G (2008) The Reelin Signaling Pathway Promotes Dendritic Spine Development in Hippocampal Neurons. *J Neurosci* 28:10339-10348.
- Nygaard R, Frimurer T M, Holst B, Rosenkilde M M and Schwartz T W (2009) Ligand Binding and Micro-Switches in 7TM Receptor Structures. *Trends Pharmacol Sci* 30:249-259.
- Obiols JE and Vicens-Vilanova J (2003) Etiología y Signos De Riesgo En La Esquizofrenia. *International Journal of Psychology and Psychological Therapy* 3(2):235-250.
- Ognibene E, Adriani W, Caprioli A, Ghirardi O, Ali S F, Aloe L and Laviola G (2008) The Effect of Early Maternal Separation on Brain Derived Neurotrophic Factor and Monoamine Levels in Adult Heterozygous Reeler Mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 32:1269-1276.
- Ognibene E, Adriani W, Granstrem O, Pieretti S and Laviola G (2007) Impulsivity-Anxiety-Related Behavior and Profiles of Morphine-Induced Analgesia in Heterozygous Reeler Mice. *Brain Res* 1131:173-180.
- Okubo Y, Suhara T, Suzuki K, Kobayashi K, Inoue O, Terasaki O, Someya Y, Sassa T, Sudo Y, Matsushima E, Iyo M, Tateno Y and Toru M (2000) Serotonin 5-HT₂ Receptors in Schizophrenic Patients Studied by Positron Emission Tomography. *Life Sci* 66:2455-2464.
- Oldham WM and Hamm H E (2006) Structural Basis of Function in Heterotrimeric G Proteins. *Q Rev Biophys* 39:117-166.
- Owen MJ, Craddock N and O'Donovan M C (2005a) Schizophrenia: Genes at Last? *Trends Genet* 21:518-525.
- Owen MJ, O'Donovan M C and Harrison P J (2005b) Schizophrenia: a Genetic Disorder of the Synapse? *BMJ* 330:158-159.
- Padin JF, Rodriguez M A, Dominguez E, Dopeso-Reyes I G, Buceta M, Cano E, Sotelo E, Brea J, Caruncho H J, Isabel C M, Castro M and Isabel L M (2006) Parallel Regulation by Olanzapine of the Patterns of Expression of 5-HT_{2A} and D₃ Receptors in Rat Central Nervous System and Blood Cells. *Neuropharmacology* 51:923-932.
- Palczewski K (2006) G Protein-Coupled Receptor Rhodopsin. *Annu Rev Biochem* 75:743-767.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke C A, Motoshima H, Fox B A, Le T, I, Teller D C, Okada T, Stenkamp R E, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* 289:739-745.
- Panagopoulos NT, Matsokis N A and Valcana T (1993) Cerebellar and Striatal Dopamine Receptors: Effects of Reeler and Weaver Murine Mutations. *J Neurosci Res* 35:499-506.
- Panetta R and Greenwood M T (2008) Physiological Relevance of GPCR Oligomerization and Its Impact on Drug Discovery. *Drug Discov Today* 13:1059-1066.

Park PS, Lodowski D T and Palczewski K (2008) Activation of G Protein-Coupled Receptors: Beyond Two-State Models and Tertiary Conformational Changes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48:107-141.

Pesold C, Impagnatiello F, Pisu M G, Uzunov D P, Costa E, Guidotti A and Caruncho H J (1998) Reelin Is Preferentially Expressed in Neurons Synthesizing Gamma-Aminobutyric Acid in Cortex and Hippocampus of Adult Rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3221-3226.

Pesold C, Liu W S, Guidotti A, Costa E and Caruncho H J (1999) Cortical Bitufted, Horizontal, and Martinotti Cells Preferentially Express and Secrete Reelin into Perineuronal Nets, Nonsynaptically Modulating Gene Expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3217-3222.

Pierce KL, Premont R T and Lefkowitz R J (2002) Seven-Transmembrane Receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:639-650.

Pierri JN, Volk C L, Auh S, Sampson A and Lewis D A (2001) Decreased Somal Size of Deep Layer 3 Pyramidal Neurons in the Prefrontal Cortex of Subjects With Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 58:466-473.

Podhorna J and Didriksen M (2004) The Heterozygous Reeler Mouse: Behavioural Phenotype. *Behav Brain Res* 153:43-54.

Pralong D, Tomaskovic-Crook E, Opeskin K, Copolov D and Dean B (2000) Serotonin(2A) Receptors Are Reduced in the Planum Temporale From Subjects With Schizophrenia. *Schizophr Res* 44:35-45.

Pramatarova A, Ochalski P G, Chen K, Gropman A, Myers S, Min K T and Howell B W (2003) Nck Beta Interacts With Tyrosine-Phosphorylated Disabled 1 and Redistributes in Reelin-Stimulated Neurons. *Mol Cell Biol* 23:7210-7221.

Primus RJ, Thurkauf A, Xu J, Yevich E, McInerney S, Shaw K, Tallman J F and Gallagher D W (1997) II. Localization and Characterization of Dopamine D4 Binding Sites in Rat and Human Brain by Use of the Novel, D4 Receptor-Selective Ligand [3H]NGD 94-1. *J Pharmacol Exp Ther* 282:1020-1027.

Qiu S, Korwek K M, Pratt-Davis A R, Peters M, Bergman M Y and Weeber E J (2006) Cognitive Disruption and Altered Hippocampus Synaptic Function in Reelin Haploinsufficient Mice. *Neurobiol Learn Mem* 85:228-242.

Qiu S and Weeber E J (2011) Reelin and Cognition, in *Reelin Glycoprotein: Structure, Biology and Roles in Health and Disease* (Fatemi SH ed) pp 171-191, Springer, Minneapolis.

Quattrocchi CC, Wannenes F, Persico A M, Ciafre S A, D'Arcangelo G, Farace M G and Keller F (2002) Reelin Is a Serine Protease of the Extracellular Matrix. *J Biol Chem* 277:303-309.

Ramos-Moreno T, Galazo M J, Porrero C, Martinez-Cerdeno V and Clasca F (2006) Extracellular Matrix Molecules and Synaptic Plasticity: Immunomapping of Intracellular and Secreted Reelin in the Adult Rat Brain. *Eur J Neurosci* 23:401-422.

- Rasmussen H, Erritzoe D, Andersen R, Ebdrup B H, Aggernaes B, Oranje B, Kalbitzer J, Madsen J, Pinborg L H, Baare W, Svarer C, Lublin H, Knudsen G M and Glenthøj B (2010) Decreased Frontal Serotonin_{2A} Receptor Binding in Antipsychotic-Naive Patients With First-Episode Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 67:9-16.
- Reynolds GP, Rossor M N and Iversen L L (1983) Preliminary Studies of Human Cortical 5-HT₂ Receptors and Their Involvement in Schizophrenia and Neuroleptic Drug Action. *J Neural Transm Suppl* 18:273-277.
- Rice DP (1999) The Economic Impact of Schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 60 Suppl 1:4-6.
- Rice DS and Curran T (2001) Role of the Reelin Signaling Pathway in Central Nervous System Development. *Annu Rev Neurosci* 24:1005-1039.
- Roberts CR and Perez-Costas E (2008) Ultrastructural Localization of Reelin, in *Reelin Glycoprotein: Structure, Biology and Roles in Health and Disease* (Fatemi SH ed) pp 107-125, Springer, Minneapolis.
- Rogers JT and Weeber E J (2008) Reelin and ApoE Actions on Signal Transduction, Synaptic Function and Memory Formation. *Neuron Glia Biol* 4:259-270.
- Ross CA, Margolis R L, Reading S A, Pletnikov M and Coyle J T (2006) Neurobiology of Schizophrenia. *Neuron* 52:139-153.
- Roth BL, Sheffler D J and Kroeze W K (2004) Magic Shotguns Versus Magic Bullets: Selectively Non-Selective Drugs for Mood Disorders and Schizophrenia. *Nat Rev Drug Discov* 3:353-359.
- Rovira X, Pin J P and Giraldo J (2010) The Asymmetric/Symmetric Activation of GPCR Dimers As a Possible Mechanistic Rationale for Multiple Signalling Pathways. *Trends Pharmacol Sci* 31:15-21.
- Royaux I, Lambert De R C, D'Arcangelo G, Demirov D and Goffinet A M (1997) Genomic Organization of the Mouse Reelin Gene. *Genomics* 46:240-250.
- Ruzicka WB, Zhubi A, Veldic M, Grayson D R, Costa E and Guidotti A (2007) Selective Epigenetic Alteration of Layer I GABAergic Neurons Isolated From Prefrontal Cortex of Schizophrenia Patients Using Laser-Assisted Microdissection. *Mol Psychiatry* 12:385-397.
- Saha S, Chant D, Welham J and McGrath J (2005) A Systematic Review of the Prevalence of Schizophrenia. *PLoS Med* 2:e141.
- Saha S, Welham J, Chant D and McGrath J (2006) Incidence of Schizophrenia Does Not Vary With Economic Status of the Country: Evidence From a Systematic Review. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 41:338-340.
- Salinger WL, Ladrow P and Wheeler C (2003) Behavioral Phenotype of the Reeler Mutant Mouse: Effects of RELN Gene Dosage and Social Isolation. *Behav Neurosci* 117:1257-1275.
- Samama P, Cotecchia S, Costa T and Lefkowitz R J (1993) A Mutation-Induced Activated State of the Beta 2-Adrenergic Receptor. Extending the Ternary Complex Model. *J Biol Chem* 268:4625-4636.

Sanders-Bush E, Fentress H and Hazelwood L (2003) Serotonin 5-Ht2 Receptors: Molecular and Genomic Diversity. *Mol Interv* 3:319-330.

Schiffmann SN, Bernier B and Goffinet A M (1997) Reelin mRNA Expression During Mouse Brain Development. *Eur J Neurosci* 9:1055-1071.

Schmid RS, Jo R, Shelton S, Kreidberg J A and Anton E S (2005) Reelin, Integrin and DAB1 Interactions During Embryonic Cerebral Cortical Development. *Cereb Cortex* 15:1632-1636.

Schrimpf SP, Meskenaite V, Brunner E, Rutishauser D, Walther P, Eng J, Aebersold R and Sonderegger P (2005) Proteomic Analysis of Synaptosomes Using Isotope-Coded Affinity Tags and Mass Spectrometry. *Proteomics* 5:2531-2541.

Seeman P (2001) Antipsychotic Drugs, Dopamine Receptors, and Schizophrenia. *Clin Neurosci Res* 1:53-60.

Seeman P, Bzowej N H, Guan H C, Bergeron C, Reynolds G P, Bird E D, Riederer P, Jellinger K and Tourtellotte W W (1987) Human Brain D1 and D2 Dopamine Receptors in Schizophrenia, Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's Diseases. *Neuropsychopharmacology* 1:5-15.

Seeman P and Kapur S (2000) Schizophrenia: More Dopamine, More D2 Receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7673-7675.

Seifert R and Wenzel-Seifert K (2002) Constitutive Activity of G-Protein-Coupled Receptors: Cause of Disease and Common Property of Wild-Type Receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 366:381-416.

Selemon LD and Goldman-Rakic P S (1999) The Reduced Neuropil Hypothesis: a Circuit Based Model of Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 45:17-25.

Shapiro DA, Renock S, Arrington E, Chiodo L A, Liu L X, Sibley D R, Roth B L and Mailman R (2003) Aripiprazole, a Novel Atypical Antipsychotic Drug With a Unique and Robust Pharmacology. *Neuropsychopharmacology* 28:1400-1411.

Sheldon M, Rice D S, D'Arcangelo G, Yoneshima H, Nakajima K, Mikoshiba K, Howell B W, Cooper J A, Goldowitz D and Curran T (1997) Scrambler and Yotari Disrupt the Disabled Gene and Produce a Reeler-Like Phenotype in Mice. *Nature* 389:730-733.

Shenton ME, Dickey C C, Frumin M and McCarley R W (2001) A Review of MRI Findings in Schizophrenia. *Schizophr Res* 49:1-52.

Smalheiser NR, Costa E, Guidotti A, Impagnatiello F, Auta J, Lacor P, Kriho V and Pappas G D (2000) Expression of Reelin in Adult Mammalian Blood, Liver, Pituitary Pars Intermedia, and Adrenal Chromaffin Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1281-1286.

Smesny S, Rosburg T, Nenadic I, Fenk K P, Kunstmann S, Rzanny R, Volz H P and Sauer H (2007) Metabolic Mapping Using 2D 31P-MR Spectroscopy Reveals Frontal and Thalamic Metabolic Abnormalities in Schizophrenia. *Neuroimage* 35:729-737.

Soares JC and Innis R B (1999) Neurochemical Brain Imaging Investigations of Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 46:600-615.

- Strasser V, Fasching D, Hauser C, Mayer H, Bock H H, Hiesberger T, Herz J, Weeber E J, Sweatt J D, Pramatarova A, Howell B, Schneider W J and Nimpf J (2004) Receptor Clustering Is Involved in Reelin Signaling. *Mol Cell Biol* 24:1378-1386.
- Straub RE and Weinberger D R (2006) Schizophrenia Genes - Famine to Feast. *Biol Psychiatry* 60:81-83.
- Sullivan PF, Kendler K S and Neale M C (2003) Schizophrenia As a Complex Trait: Evidence From a Meta-Analysis of Twin Studies. *Arch Gen Psychiatry* 60:1187-1192.
- Sun J, Han L and Zhao Z (2010) Gene- and Evidence-Based Candidate Gene Selection for Schizophrenia and Gene Feature Analysis. *Artif Intell Med* 48:99-106.
- Sun Y, McGarrigle D and Huang X Y (2007) When a G Protein-Coupled Receptor Does Not Couple to a G Protein. *Mol Biosyst* 3:849-854.
- Takahara T, Ohsumi T, Kuromitsu J, Shibata K, Sasaki N, Okazaki Y, Shibata H, Sato S, Yoshiki A, Kusakabe M, Muramatsu M, Ueki M, Okuda K and Hayashizaki Y (1996) Dysfunction of the Orleans Reeler Gene Arising From Exon Skipping Due to Transposition of a Full-Length Copy of an Active L1 Sequence into the Skipped Exon. *Hum Mol Genet* 5:989-993.
- Takahashi H, Higuchi M and Suhara T (2006) The Role of Extrastriatal Dopamine D2 Receptors in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 59:919-928.
- Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H and Mitaku S (2002) Identification of G Protein-Coupled Receptor Genes From the Human Genome Sequence. *FEBS Lett* 520:97-101.
- Talvik M, Nordstrom A L, Okubo Y, Olsson H, Borg J, Halldin C and Farde L (2006) Dopamine D2 Receptor Binding in Drug-Naive Patients With Schizophrenia Examined With Raclopride-C11 and Positron Emission Tomography. *Psychiatry Res* 148:165-173.
- Tandon R, Keshavan M S and Nasrallah H A (2008a) Schizophrenia, "Just the Facts" What We Know in 2008. 2. Epidemiology and Etiology. *Schizophr Res* 102:1-18.
- Tandon R, Keshavan M S and Nasrallah H A (2008b) Schizophrenia, "Just the Facts": What We Know in 2008 Part 1: Overview. *Schizophr Res* 100:4-19.
- Tandon R, Nasrallah H A and Keshavan M S (2009) Schizophrenia, "Just the Facts" 4. Clinical Features and Conceptualization. *Schizophr Res* 110:1-23.
- Tandon R, Nasrallah H A and Keshavan M S (2010) Schizophrenia, "Just the Facts" 5. Treatment and Prevention Past, Present, and Future. *Schizophr Res*.
- Terrillon S and Bouvier M (2004) Roles of G-Protein-Coupled Receptor Dimerization. *EMBO Rep* 5:30-34.
- Thaker GK and Carpenter W T, Jr. (2001) Advances in Schizophrenia. *Nat Med* 7:667-671.
- Tikhonova IG and Costanzi S (2009) Unraveling the Structure and Function of G Protein-Coupled Receptors Through NMR Spectroscopy. *Curr Pharm Des* 15:4003-4016.

- Tissir F and Goffinet A M (2003) Reelin and Brain Development. *Nat Rev Neurosci* 4:496-505.
- Tordjman S, Drapier D, Bonnot O, Graignic R, Fortes S, Cohen D, Millet B, Laurent C and Roubertoux P L (2007) Animal Models Relevant to Schizophrenia and Autism: Validity and Limitations. *Behav Genet* 37:61-78.
- Torrey EF, Barci B M, Webster M J, Bartko J J, Meador-Woodruff J H and Knable M B (2005) Neurochemical Markers for Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Major Depression in Postmortem Brains. *Biol Psychiatry* 57:252-260.
- Trichard C, Paillere-Martinot M L, ttar-Levy D, Blin J, Feline A and Martinot J L (1998) No Serotonin 5-HT_{2A} Receptor Density Abnormality in the Cortex of Schizophrenic Patients Studied With PET. *Schizophr Res* 31:13-17.
- Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer R E, Richardson J A and Herz J (1999) Reeler/Disabled-Like Disruption of Neuronal Migration in Knockout Mice Lacking the VLDL Receptor and ApoE Receptor 2. *Cell* 97:689-701.
- Tsuang M (2000) Schizophrenia: Genes and Environment. *Biol Psychiatry* 47:210-220.
- Tsuang MT, Bar J L, Stone W S and Faraone S V (2004) Gene-Environment Interactions in Mental Disorders. *World Psychiatry* 3:73-83.
- Tueting P, Costa E, Dwivedi Y, Guidotti A, Impagnatiello F, Manev R and Pesold C (1999) The Phenotypic Characteristics of Heterozygous Reeler Mouse. *Neuroreport* 10:1329-1334.
- Tueting P, Doueiri M S, Guidotti A, Davis J M and Costa E (2006) Reelin Down-Regulation in Mice and Psychosis Endophenotypes. *Neurosci Biobehav Rev* 30:1065-1077.
- Tueting P, Pinna G and Costa E (2008) Homozygous and Heterozygous Reeler Mouse Mutants, in *Reelin Glycoprotein: Structure, Biology and Roles in Health and Disease* (Fatemi SH ed) pp 291-309, Springer, Minneapolis.
- Tune L, Barta P, Wong D, Powers R E, Pearlson G, Tien A Y and Wagner H N (1996) Striatal Dopamine D₂ Receptor Quantification and Superior Temporal Gyrus: Volume Determination in 14 Chronic Schizophrenic Subjects. *Psychiatry Res* 67:155-158.
- Tune LE, Wong D F, Pearlson G, Strauss M, Young T, Shaya E K, Dannals R F, Wilson A A, Ravert H T, Sapp J and . (1993) Dopamine D₂ Receptor Density Estimates in Schizophrenia: a Positron Emission Tomography Study With ¹¹C-N-Methylspiperone. *Psychiatry Res* 49:219-237.
- Umbricht D and Krljes S (2005) Mismatch Negativity in Schizophrenia: a Meta-Analysis. *Schizophr Res* 76:1-23.
- Urban JD, Clarke W P, von Z M, Nichols D E, Kobilka B, Weinstein H, Javitch J A, Roth B L, Christopoulos A, Sexton P M, Miller K J, Spedding M and Mailman R B (2007) Functional Selectivity and Classical Concepts of Quantitative Pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther* 320:1-13.

Utsunomiya-Tate N, Kubo K, Tate S, Kainosho M, Katayama E, Nakajima K and Mikoshiba K (2000) Reelin Molecules Assemble Together to Form a Large Protein Complex, Which Is Inhibited by the Function-Blocking CR-50 Antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9729-9734.

VanOekelen D., Luyten W H and Leysen J E (2003) 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} Receptors and Their Atypical Regulation Properties. *Life Sci* 72:2429-2449.

Veldic M, Caruncho H J, Liu W S, Davis J, Satta R, Grayson D R, Guidotti A and Costa E (2004) DNA-Methyltransferase 1 mRNA Is Selectively Overexpressed in Telencephalic GABAergic Interneurons of Schizophrenia Brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:348-353.

Veldic M, Guidotti A, Maloku E, Davis J M and Costa E (2005) In Psychosis, Cortical Interneurons Overexpress DNA-Methyltransferase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2152-2157.

Venter JC, Adams M D, Myers E W, Li P W, Mural R J, Sutton G G, Smith H O, Yandell M, Evans C A, Holt R A, Gocayne J D, Amanatides P, Ballew R M, Huson D H, Wortman J R, Zhang Q, Kodira C D, Zheng X H, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas P D, Zhang J, Gabor Miklos G L, Nelson C, Broder S, Clark A G, Nadeau J, McKusick V A, Zinder N, Levine A J, Roberts R J, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, bu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di F, V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian A E, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman T J, Higgins M E, Ji R R, Ke Z, Ketchum K A, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov G V, Milshina N, Moore H M, Naik A K, Narayan V A, Neelam B, Nusskern D, Rusch D B, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng M L, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferriera S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers Y H, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint N N, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril J F, Guigo R, Campbell M J, Sjolander K V, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooseph S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang Y H, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N and Nodell M (2001) The Sequence of the Human Genome. *Science* 291:1304-1351.

Verhoeff NP, Meyer J H, Kecojevic A, Hussey D, Lewis R, Tauscher J, Zipursky R B and Kapur S (2000) A Voxel-by-Voxel Analysis of [18F]Setoperone PET Data Shows No

Substantial Serotonin 5-HT(2A) Receptor Changes in Schizophrenia. *Psychiatry Res* 99:123-135.

Villasana LE, Klann E and Tejada-Simon M V (2006) Rapid Isolation of Synaptoneurosome and Postsynaptic Densities From Adult Mouse Hippocampus. *J Neurosci Methods* 158:30-36.

Wang L, Martin B, Brenneman R, Luttrell L M and Maudsley S (2009) Allosteric Modulators of G Protein-Coupled Receptors: Future Therapeutics for Complex Physiological Disorders. *J Pharmacol Exp Ther* 331:340-348.

Wedenoja J, Tuulio-Henriksson A, Suvisaari J, Loukola A, Paunio T, Partonen T, Varilo T, Lonnqvist J and Peltonen L (2010) Replication of Association Between Working Memory and Reelin, a Potential Modifier Gene in Schizophrenia. *Biol Psychiatry* 67:983-991.

Weeber EJ, Beffert U, Jones C, Christian J M, Forster E, Sweatt J D and Herz J (2002) Reelin and ApoE Receptors Cooperate to Enhance Hippocampal Synaptic Plasticity and Learning. *J Biol Chem* 277:39944-39952.

Weis WI and Kobilka B K (2008) Structural Insights into G-Protein-Coupled Receptor Activation. *Curr Opin Struct Biol* 18:734-740.

Whitaker PM, Crow T J and Ferrier I N (1981) Tritiated LSD Binding in Frontal Cortex in Schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 38:278-280.

Whorton MR, Bokoch M P, Rasmussen S G, Huang B, Zare R N, Kobilka B and Sunahara R K (2007) A Monomeric G Protein-Coupled Receptor Isolated in a High-Density Lipoprotein Particle Efficiently Activates Its G Protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7682-7687.

Williams C and Hill S J (2009) GPCR Signaling: Understanding the Pathway to Successful Drug Discovery. *Methods Mol Biol* 552:39-50.

Willins DL, Alsayegh L, Berry S A, Backstrom J R, Sanders-Bush E, Friedman L, Khan N and Roth B L (1998) Serotonergic Antagonist Effects on Trafficking of Serotonin 5-HT_{2A} Receptors in Vitro and in Vivo. *Ann N Y Acad Sci* 861:121-127.

Willins DL, Berry S A, Alsayegh L, Backstrom J R, Sanders-Bush E, Friedman L and Roth B L (1999) Clozapine and Other 5-Hydroxytryptamine-2A Receptor Antagonists Alter the Subcellular Distribution of 5-Hydroxytryptamine-2A Receptors in Vitro and in Vivo. *Neuroscience* 91:599-606.

Wilson JM, Sanyal S and Van Tol H H (1998) Dopamine D₂ and D₄ Receptor Ligands: Relation to Antipsychotic Action. *Eur J Pharmacol* 351:273-286.

Wirshing DA, Spellberg B J, Erhart S M, Marder S R and Wirshing W C (1998) Novel Antipsychotics and New Onset Diabetes. *Biol Psychiatry* 44:778-783.

Wolff-Menzler C, Hasan A, Malchow B, Falkai P and Wobrock T (2010) Combination Therapy in the Treatment of Schizophrenia. *Pharmacopsychiatry* 43:122-129.

Wong AH and Van Tol H H (2003) Schizophrenia: From Phenomenology to Neurobiology. *Neurosci Biobehav Rev* 27:269-306.

Wong DF, Pearlson G D, Tune L E, Young L T, Meltzer C C, Dannals R F, Ravert H T, Reith J, Kuhar M J and Gjedde A (1997) Quantification of Neuroreceptors in the Living Human Brain: IV. Effect of Aging and Elevations of D2-Like Receptors in Schizophrenia and Bipolar Illness. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:331-342.

Wong DF, Wagner H N, Jr., Tune L E, Dannals R F, Pearlson G D, Links J M, Tamminga C A, Broussolle E P, Ravert H T, Wilson A A, Toung J K, Malat J, Williams J A, O'Tuama L A, Snyder S H, Kuhar M J and Gjedde A (1986) Positron Emission Tomography Reveals Elevated D2 Dopamine Receptors in Drug-Naive Schizophrenics. *Science* 234:1558-1563.

World Health Organization (1992) The International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, Tenth Revision (ICD-10). Section Mental and Behavioural Disorders. *World Health Organization*, Geneva.

World Health Organization (2001) Mental Health: New Understanding, New Hope. *World Health Organization*, Geneva.

Wright IC, Rabe-Hesketh S, Woodruff P W, David A S, Murray R M and Bullmore E T (2000) Meta-Analysis of Regional Brain Volumes in Schizophrenia. *Am J Psychiatry* 157:16-25.

Zakzanis KK and Hansen K T (1998) Dopamine D2 Densities and the Schizophrenic Brain. *Schizophr Res* 32:201-206.

Zavitsanou K and Huang X F (2002) Decreased [(3)H]Spiperone Binding in the Anterior Cingulate Cortex of Schizophrenia Patients: an Autoradiographic Study. *Neuroscience* 109:709-716.

Zawarynski P, Tallerico T, Seeman P, Lee S P, O'Dowd B F and George S R (1998) Dopamine D2 Receptor Dimers in Human and Rat Brain. *FEBS Lett* 441:383-386.

Zetler G and Baumann G H (1985) Pharmacokinetics and Effects of Haloperidol in the Isolated Mouse. *Pharmacology* 31:318-327.

La esquizofrenia es una enfermedad mental grave caracterizada por una gran variedad de signos y síntomas y asociada con niveles elevados de carga y coste social, además del sufrimiento de los individuos y sus familias. La heterogeneidad fenotípica, fisiopatológica y etiológica de la esquizofrenia, junto con la presencia de síntomas característicos de la condición humana, han dificultado la obtención de un modelo animal que reproduzca todos los aspectos de la enfermedad lo que ha limitado el conocimiento de los mecanismos que operan en su desarrollo.

Sin embargo, se han desarrollado distintos modelos animales para probar hipótesis o mecanismos fisiopatológicos específicos, entre los que se encuentra el ratón heterocigoto reeler. Este ratón presenta una mutación en el gen que codifica para la proteína reelina que origina una disminución de la expresión de esta proteína similar a la descrita en varias estructuras cerebrales de pacientes esquizofrénicos, lo que lo convierte en un modelo animal interesante para evaluar las consecuencias de la disminución de esta proteína en la psicosis.

En la presente Tesis Doctoral hemos realizado la caracterización en este posible modelo animal de esquizofrenia de los receptores D_2 y $5-HT_{2A}$, implicados en la farmacología de la esquizofrenia. Esta caracterización nos ha permitido establecer una relación entre las alteraciones en la expresión de la reelina en ratones y los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico que señala a estos ratones como un modelo animal *in vitro* para el estudio de la farmacología de la esquizofrenia.

